

Received: 2012.04.25
Accepted: 2012.11.09
Published: 2012.12.07

Identyfikacja krążących komórek nowotworowych jako obiecująca metoda diagnostyki chorób nowotworowych układu moczowo-płciowego

Identification of circulating tumor cells as a promising method of genitourinary cancer diagnosis

Natalia Gurtowska¹, Anna Bajek¹, Joanna Olkowska¹, Tomasz Drewna^{1,2}

¹ Zakład Inżynierii Tkankowej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK Toruń

² Oddział Urologii Ogólnej i Onkologicznej, Szpital im. Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie

Krążące komórki nowotworowe (CTCs – circulating tumour cells) definiuje się jako krążące we krwi komórki, które pod względem profilu antygenowego lub genetycznego odpowiadają charakterystyce określonego rodzaju nowotworu. Podejrzewa się, iż komórki te mają właściwości nowotworowych komórek macierzystych. Dlatego też charakterystyka komórek CTCs we krwi obwodowej może mieć ogromne znaczenie dla współczesnej onkologii. W przypadku chorób we wczesnym stadium, komórki CTCs mogą pomóc w diagnostyce nowotworów złośliwych, ocenie ryzyka przerzutów, a także rokowaniach. U chorych natomiast w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej komórki CTCs mogą mieć znaczenie prognostyczne, a także usprawniać monitorowanie odpowiedzi na leczenie. W ostatnich latach, dzięki niezwykle czułym technikom molekularnym, możliwa stała się analiza krążących komórek nowotworowych z niewielkiej ilości krwi obwodowej. Identyfikacja komórek CTCs w krążeniu oraz odróżnienie ich od komórek krwiotwórczych i prawidłowych komórek nabłonkowych może się odbywać na podstawie fizycznych i biologicznych właściwości, takich jak: wielkość i gęstość komórek oraz ekspresja specyficznych białek. Najpowszechniej stosowanymi metodami izolacji komórek CTCs są techniki immunomagnetyczne. Spośród wielu testów, jedynym zaakceptowanym przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA – Food and Drug Administration) testem do użytku klinicznego jest CellSearch System (CSS).

Celem pracy jest przedstawienie wybranych metod izolacji krążących komórek nowotworowych z krwi obwodowej u pacjentów z rakiem prostaty, pęcherza i nerki.

Słowa kluczowe:

krążące komórki nowotworowe • macierzyste komórki nowotworowe • układ moczowo-płciowy

Summary

Circulating tumor cells (CTCs) are cells circulating in the blood, which in terms of antigenic or genetic profile correspond to a particular type of cancer. It is suspected that CTCs possess properties of cancer stem cells. Detection, quantification and characterization of CTCs in the peripheral blood can be of great importance for modern oncology. In the case of early-stage disease, CTCs may help in cancer detection, estimation of metastasis risk and treatment prognosis. In advanced cancer patients, CTCs may also have prognostic significance and may facilitate monitoring response to treatment. Identification of CTCs in the circulation and their differentiation from hematopoietic cells and normal epithelial cells could be based on physical and biological

properties such as size, density and expression of specific proteins. Immunomagnetic techniques are the most commonly used methods of CTCs isolation. CellSearch System (CSS) is the only test for detecting CTCs in the peripheral blood approved by the Food and Drug Administration (FDA) for clinical use. The paper presents the characteristics of circulating tumor cell isolation methods and the results of studies concerning CTCs isolation in patients with prostate, bladder and kidney cancer.

Key words: circulating tumor cells • cancer stem cells • genitourinary cancer

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1023087>

Word count: 3025

Tables: –

Figures: –

References: 82

Adres autorki: mgr Natalia Gurtowska, Zakład Inżynierii Tkankowej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, ul. M. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: natalia.gurtowska@interia.pl

KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Krażące komórki nowotworowe (CTCs – circulating tumour cells) definiuje się jako krążące we krwi komórki, które pod względem antygenowym lub genetycznym odpowiadają charakterystyce określonego rodzaju nowotworu. Pochodzą one z guza pierwotnego lub miejsc przerzutów i we krwi obwodowej znajdują się w bardzo niewielkiej liczbie ($1/10^5$ – 10^7 komórek jednojądrzastych). Obecność komórek CTCs u pacjentów chorych na raka może świadczyć o agresywnym przebiegu pierwotnego nowotworu lub obecności mikroprzerzutów. Analiza ilościowa i jakościowa komórek CTCs może dostarczyć informacji prognostycznych, pozwala monitorować odpowiedź na zastosowane leczenie oraz poznać biologię komórek nowotworowych odpowiedzialnych za tworzenie przerzutów [17]. Komórki nowotworowe przedostają się do krążenia poprzez istniejące już naczynia lub przez nowo powstałe kapilary guza [19]. W procesie nazywanym „przejściem epithelialno-mezenchymalnym” (EMT – epithelial-mesenchymal transition), fenotyp komórek nowotworowych zmienia się, co ułatwia „ucieczkę” komórek z tkanki guza i przekształcenie ich w komórki inwazyjne [26,59,73,75]. Poprzez modyfikacje białek i zmiany na poziomie transkrypcji, komórki tracą polaryzację typową dla komórek nabłonkowych oraz zdolność przylegania na korzyść nowej morfologii, ułatwiającej przemieszczanie się komórek. Ważnym etapem tego procesu jest częściowa lub całkowita utrata ekspresji E-kadheryny oraz innych swoistych markerów komórek nabłonkowych [73,75]. Inwazyjny potencjał komórek jest zwiększony m.in. przez ekspresję i aktywację różnych metaloproteinaz oraz ciągłe współdziałanie z powierzchnią śródbłonna. Nabycie przez komórki nowotworowe cech charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych umożliwia im migrację z naczynia krwionośnego do środowiska nowej tkanki (tzw. ekstrawazacja) [73,75].

W komórkach CTCs zachodzi również odwrotny proces przejścia mezenchymalno-epitelialnego, który przywraca im właściwości epithelialne, umożliwia adhezję do nowego środowiska, a także powoduje tworzenie odległych

przerzutów [73,75]. Podejrzewa się, iż ta swoista populacja komórek CTCs ma właściwości nowotworowych komórek macierzystych [54]. Na podstawie analizy komórek CTCs zidentyfikowanych u pacjentów z rakiem piersi, płuc i jelita grubego wykazano, iż większość tych komórek nie podlegała podziałom komórkowym [46,57,58]. Stosowana obecnie chemioterapia, działająca przede wszystkim na szybko dzielące się komórki, nie może mieć zatem wpływu na międzypodziałowe stadium komórek CTCs. Prawdopodobnie istnieje również subpopulacja komórek CTCs, która nie jest zdolna do przejścia EMT. Komórki te również mogą być transportowane przez krew do odległych narządów, ale nie mają właściwości komórek macierzystych, zatem nie tworzą przerzutów [54].

Nowe techniki identyfikacji stwarzają szansę odróżnienia stadium choroby ograniczonej do narządu (którą można wyleczyć chirurgicznie) od choroby rozsianej (którą można leczyć metodami systemowymi). Jednym z możliwych rozwiązań jest śledzenie wędrówki komórek CTCs, odpowiedzialnych za rozsiew choroby nowotworowej. W przypadku choroby rozsianej, komórki nowotworowe krążące w krwiobiegu powinny być jednym z celów leczenia. Samo usunięcie narządu, choć równie konieczne, nie jest zabiegiem wystarczającym do osiągnięcia sukcesu terapeutycznego. Leczenie radykalne pacjenta o niskim stopniu zaawansowania raka przeważnie skutkuje całkowitym wyleczeniem, gdyż jest niewielkie prawdopodobieństwo obecności komórek nowotworowych w krwiobiegu. Zastosowanie natomiast takiego samego leczenia u pacjenta chorego na raka o wysokim stopniu zaawansowania miejscowego nie daje efektu terapeutycznego, bowiem komórki nowotworowe krążą w krwiobiegu. Choroba, mimo niemożności zdiagnozowania przerzutów jest rozsiana [7,10,24,30,32,42,48,51,52,53,67]. Dlatego też ocena lub charakterystyka komórek CTCs może znacznie poprawić wyniki leczenia onkologicznego.

MACIERZYTE KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Komórki macierzyste klasyfikuje się w zależności od ich potencjału do podziału i różnicowania w inne komórki, tkanki,



narządy czy wreszcie cały organizm. Totipotencjalne komórki macierzyste mogą dać początek całemu organizmowi, pluripotencjalne mogą różnicować się w każdy typ komórek (nie są w stanie wytworzyć łożyska, a tym samym i całego organizmu). Multipotencjalne komórki macierzyste różnicują się w komórki, na ogół pochodzące z jednego lista zarodkowego, a unipotencjalne tylko w jeden typ komórek. Zarówno komórki multipotencjalne, jak i unipotencjalne izolowane są z tkanek organizmów dojrzałych, dlatego też często określa się je wspólnie terminem „adult stem cells” [5]. Jednak sugeruje się obecność komórek o właściwościach pluripotencjalnych w organizmach dojrzałych, a także neguje się przedstawiony wyżej hierarchiczny podział komórek macierzystych [31,63,82].

Niedawne badania dotyczące nowotworów hematologicznych i guzów litych sugerują, że w każdym typie nowotworu występuje niewielka populacja komórek, które zostały nazwane nowotworowymi komórkami macierzystymi CSCs (cancer stem cells) [22,29,43]. Nowotworowe komórki macierzyste mają zdolność do samoodnowy, różnicowania i oporności wielolekowej na cytostatyki. Ich istnienie potwierdza to, iż niewielka liczba komórek nowotworowych w obrębie nowotworu jest odpowiedzialna za potencjał przerzutowy. Co więcej, komórki te mają swoisty profil markerów komórkowych oraz zdolność do odtworzenia w hodowli populacji komórek guza pierwotnego [39]. Powstawanie CSCs jest wciąż niewyjaśnione. Jedną z teorii mówi, iż dojrzałe komórki macierzyste mogą zostać przekształcone w nowotwór podczas kolejnych etapów kancerogenezy [33,81].

Ważną rolę w procesie nowotworowym odgrywa środowisko tkankowe, w którym znajduje się guz, czyli tzw. nisza komórek macierzystych. Pojęcie niszy nie jest związane tylko z nowotworami, ale również ze wszystkimi komórkami macierzystymi. Nisza komórki macierzystej oznacza przestrzeń, w której komórki macierzyste utrzymywane są w gotowości do podziałów komórkowych niezbędnych w utrzymaniu homeostazy [11]. W tkankach niezmiennych nowotworowo, komórki tworzące niszę dostarczają sygnały komórkom macierzystym, umożliwiając ich samoodnowę. Wykazano, że brak odpowiednich sygnałów może doprowadzić do szybkich podziałów komórek macierzystych i ich różnicowania. Zaburzenia homeostazy liczby i typu komórek budujących tkankę zwiększają ryzyko kancerogenezy. W tym świetle znaczenie niszy w procesie nowotworzenia nie podlega żadnym wątpliwościom. Nowotworowe komórki macierzyste przeniesione do nietypowej dla nich niszy nie tworzą guza. Jednak prawidłowe komórki macierzyste umieszczone w niszy charakterystycznej dla określonego nowotworu z czasem przekształcają się w nowotwór [12].

Odkrycie nowotworowych komórek macierzystych diametralnie zmieniło podejście badaczy do procesów nowotworzenia i chemioterapii. Obecnie uważa się, że to komórki CSCs odpowiedzialne są za powstanie i rozrost tkanki zmienionej nowotworowo. Nowotworowe komórki macierzyste są odporne na większość schematów chemioterapii z powodu ich „uspionej” natury. Prawdopodobnie dlatego też tradycyjnie stosowane chemioterapeutyki redukują jedynie masę guza, pozwalając tym samym na nawrót choroby nowotworowej [34,38,64,72].

WYBRANE METODY IZOLACJI KRAŻĄCYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Metody izolacji opierające się o właściwości fizyko-chemiczne

Wykrywanie komórek CTCs wymaga wyjątkowo czułych i swoistych metod analitycznych. Identyfikacja komórek CTCs w krążeniu oraz ich odróżnienie od komórek krwiotwórczych i prawidłowych komórek nabłonkowych odbywa się na podstawie fizycznych i biologicznych właściwości, takich jak: wielkość, gęstość i ekspresja specyficznych białek. Metoda izolacji nabłonkowych komórek nowotworowych na podstawie ich wielkości (ISET – isolation by size of epithelial tumor cells) pozwala na izolację komórek CTCs większych niż 8 μm [59,77]. Przeprowadzone do tej pory badania nie potwierdziły jednak hipotezy, iż wszystkie komórki CTCs są większe niż 8 μm [45]. Uważa się, że komórki guza mają mniejszą gęstość niż inne komórki w krążeniu, dlatego też istnieją komercyjnie dostępne metody (Ficoll-Hypaque; Lymphoprep, Nycomed Pharma, Norwegia, OncoQuick; Greiner Bio-One GmbH Niemcy) opierające proces izolacji na wirowaniu w gradiencie gęstości [59]. Metody te nie są jednak wystarczająco czułe, a podczas procesu izolacji dochodzi do utraty wielu komórek CTCs [4].

Izolacja immunomagnetyczna

Najpowszechniej stosowanymi metodami izolacji CTCs są techniki immunomagnetyczne, takie jak MACS Systems (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Niemcy), RARE (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada) [40,45,59,68]. Metodami tymi można „wylapać” komórki CTCs z krążenia dzięki specyficznym markerom powierzchniowym. Niektóre z tych metod wykorzystują negatywną selekcję jednojądrowych komórek z użyciem przeciwciała anty-CD45, inne pozytywną selekcję opartą na identyfikacji nabłonkowych markerów komórek guza przez przeciwciała monoklonalne [35]. Selekcja pozytywna przeprowadzana jest najczęściej z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko cząsteczce adhezyjnej komórek nabłonkowych EpCAM [56]. Metodom immunomagnetycznym brak jest jednak automatyzacji powtarzalnych procedur laboratoryjnych, a oparcie procesu izolacji tylko na identyfikacji markerów powierzchniowych daje często fałszywie dodatnie i ujemne wyniki.

Metody kombinowane

Ze względu na niewielką czułość i swoistość testów opartych o pojedynczą metodę detekcji opracowano metody kombinowane.

Jedną z nowszych technologii molekularnych AdnaTest (AdnaGen AG, Niemcy) łączy immunomagnetyczną selekcję komórek MUC1/HER2/EpCAM+ z identyfikacją genetyczną komórek CTCs za pomocą panelu trójgenowego i RT-PCR (RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Wyselekcjonowane komórki CTCs poddawane są lizie w celu izolacji mRNA, które jest następnie analizowane pod względem markera HER2 (receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu) i powierzchniowych glikoprotein MUC1 i GA733-2 za pomocą

ilościowego RTqPCR. Ograniczeniem tej metody jest to, iż ekspresja HER2 występuje również na aktywowanych limfocytach T [3,20].

Wśród metod detekcji komórek CTCs należy wymienić także test EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT, Francja), który po wyeliminowaniu komórek CD45+, identyfikuje tylko żywe komórki [70]. Technika ta identyfikuje komórki CTCs na podstawie wydzielanych lub uwalnianych przez nie białek (rak piersi – CK19, MUC1, Cath-D, jelito grube – CK19, prostata – PSA, tarczycza – tyreoglobulina) w ciągu 48-godzinnej hodowli *in vitro* [1,55]. Ograniczeniem tej metody jest trudność uzyskania dużej liczby komórek oraz ich hodowla *in vitro*, a także niewystarczająca powtarzalność wyników. Metoda ta jest weryfikowana w badaniu klinicznym u pacjentów z miejscowym rakiem prostaty.

Inną metodą izolacji komórek jest metoda CAM (Collagen Adhesion Matrix, Vita-Assay™, Vitatex Inc., Stony Brook, NY, USA) identyfikująca komórki CTCs na podstawie ich inwazyjnych właściwości *in vitro* [37]. Czułość tej metody nie została do tej pory potwierdzona w badaniach na dużą skalę.

Najnowszą opisaną metodą izolacji jest platforma mikroprzepływa CTC-chip opracowana w Massachusetts General Hospital Center for Engineering in Medicine. W metodzie tej krew przepływa przez płytkę z mikrosłupkami pokrytymi przeciwciałami anti-EpCAM. Płytką z komórkami nowotworowymi jest następnie wybarwiana i analizowana z pomocą mikroskopu fluorescencyjnego [47]. Metoda ta nie jest jednak dostępna komercyjnie.

Jedynym testem zaakceptowanym przez FDA do zastosowania klinicznego jest CellSearch System CSS (Veridex, USA). W metodzie tej komórki CTCs wychwytywane są przez kulki magnetyczne pokryte przeciwciałem anti-EpCAM. Wychwycone komórki nabłonkowe są znakowane za pomocą przeciwciała przeciwko cytokeratynom (CK): 8, 18, 19. Przeciwciała anti-CD45 znakuje natomiast limfocyty, a jądra komórkowe wybarwiane są DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol). Liczba komórek CK+/DAPI+/CD45- oceniana jest z użyciem czterokolorowego półautomatycznego mikroskopu fluorescencyjnego CellTracks Analyzer II (Immunicon, USA) [49,62]. System CellSearch pozwala na dokładne określenie liczby komórek CTCs w próbce krwi do 72 h od czasu pobrania (swoistość równa jest 99,99% dla poziomu CTCs ≥ 5). Zaletą tej metody jest też to, iż wyizolowane komórki zachowują swoją strukturę i mogą być poddane dalszej analizie. Ponadto metoda ta została pomyślnie oceniona w wielu dużych badaniach klinicznych. Badając te same próbki w różnych ośrodkach uzyskano wysoką powtarzalność wyników. Mimo wielu zalet metoda ta jest droga i pozwala tylko na identyfikację komórek CTCs wykazujących ekspresję białka EpCAM, która może zostać obniżona podczas przejścia EMT. System ten został po raz pierwszy zastosowany przez Allarda i wsp., którzy przeanalizowali 900 próbek krwi pochodzących od pacjentów z różnymi nowotworami przerzutowymi [2]. Technika ta okazała się dokładna, a wyniki powtarzalne. Dwie lub więcej komórek CTCs w 7,5 ml krwi zidentyfikowano u 57% pacjentów z rakiem prostaty, 37% pacjentek z rakiem piersi i 30% pacjentów z rakiem jelita grubego. W wielu badaniach z użyciem systemu CellSearch,

obecność komórek CTCs zapewniła wiarygodną ocenę progresji choroby oraz czasu przeżycia pacjenta znacznie wcześniej niż tradycyjne metody obrazowe [13,14,16]. Co więcej, liczba komórek CTCs korelowała ze stadiem guza [55,69] i była wyższa u pacjentów z większą liczbą miejsc przerzutów [21]. W badaniach, które przeprowadzono przed rozpoczęciem leczenia, liczba komórek CTCs większa niż 2–5 CTCs/7,5 ml krwi wiązała się z gorszym rokowaniem i progresją choroby [14,44,69].

Izolacja komórek CTCs umożliwia ich molekularną analizę rzucając nowe spojrzenie na biologię komórek nowotworowych. Komórki CTCs mogą być charakteryzowane na poziomie DNA, RNA i białek. Charakterystyka ta jest szczególnie ważna w identyfikacji celu terapeutycznego, który mógłby być użyty do eliminacji potencjalnych komórek prekursorowych wywołujących przerzuty. W analizie komórek CTCs zastosowanie znalazły m.in. takie metody molekularne, jak FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization), CGH (Comparative Genomic Hybridization) czy immunobarwienie oraz RT-PCR [54].

KRĄŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE W RAKU PĘCZERZA

Leczenie operacyjne chorych z rakiem pęcherza sposobem radykalnej cystektomii obarczone jest niebezpieczeństwem zakwalifikowania do tego zabiegu pacjenta z chorobą rozsianą. Metody diagnostyczne pozwalające na prawidłową ocenę rozsiewu nowotworu są zbyt niskiej czułości i specyficzności. To powoduje, iż do leczenia, które ma być z założenia radykalne, czyli uwolnić pacjenta od choroby nowotworowej, kwalifikowani są chorzy z dużą liczbą krążących komórek nowotworowych na etapie, w którym nie można ich wykryć metodami klasycznej radiologii. Celem poprawienia tej diagnostyki stosowano próby pooperacyjnej oceny mikroprzerzutów w węzłach chłonnych. Metoda ta daje jednak pozytywne wyniki jedynie wówczas, gdy w węzle znajduje się powyżej 50000 komórek nowotworowych. Wydaje się, że nawet taka metoda jest zbyt mało dokładna, aby zaproponować pacjentowi leczenie radykalne. Jednym z rozwiązań jest możliwość zastosowania pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) przed planowaną operacją, jednak i ta metoda oceny ryzyka rozsiewu nie ma wystarczającej swoistości.

Metody izolacji komórek CTCs u pacjentów z rakiem pęcherza nie są powszechnie stosowane w praktyce klinicznej z powodu braku standaryzacji przygotowywania próbek, a także ich analizy. Na uwagę zasługuje to, iż komórki CTCs raka pęcherza nie zostały zidentyfikowane w krążeniu zdrowych osób. W związku z tym detekcja tych komórek we krwi pacjenta może sugerować ryzyko odległych przerzutów [50]. W 1999 r. Kaneda i wsp. po raz pierwszy odnotowali obecność komórek CTCs używając nested RT-PCR – metody stosowanej, gdy dysponuje się niewielką liczbą matryc DNA [28]. Gazzangia i wsp. [23] identyfikację komórek CTCs oparli na ekspresji receptora endotelialnego czynnika wzrostu EGFR, którą porównali z ekspresją CK20 i CK19 za pomocą RT-PCR i analizy Southern blot. Badanie to wskazało, że identyfikacja komórek CTCs z krwi na podstawie ekspresji cytokeratyn jest trudna z powodu fałszywie dodatnich wyników u zdrowych osób. W innym badaniu wykorzystującym techniki immunohistochemiczne, użycie przeciwciał anti-CK8, 18,



19 pozwoliło zidentyfikować epithelialne komórki w próbkach krwi u 32 pacjentów z rakiem przejściowokomórkowym (TCC – transitional cell carcinoma). Autorzy nie mogli jednak ocenić stadium choroby [76]. Naoe i wsp. [49] natomiast jako pierwsi przeanalizowali próbki krwi od pacjentów z rakiem pęcherza na obecność komórek CTCs używając CellSearch. Badano pacjentów z przerzutowym rakiem urotelium. Komórki CTCs zidentyfikowano u 57,1% chorych. Nie odnotowano tej populacji komórek u pacjentów z nieprzerzutowym nowotworem. W podobnym badaniu komórki CTCs zidentyfikowano u 44% pacjentów, z czego większość miała ich więcej niż 5 [21]. Kolejne badanie przeprowadzili Rink i wsp. [66]: u 30% pacjentów z rakiem pęcherza bez potwierdzonych przerzutów zidentyfikowano komórki CTCs.

KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE W RAKU PROSTATY

Powodzenie radykalnego leczenia chorych na raka stercza, czy to metodą operacyjną czy też za pomocą radioterapii zależy od właściwego zakwalifikowania pacjenta do leczenia. Jednym z głównych elementów właściwej kwalifikacji jest wykluczenie rozsiewu choroby nowotworowej u pacjentów mających być leczonymi radykalnie. Obecne metody diagnostyczne, zarówno MRI, jak i scyntygrafia nie pozwalają na wystarczająco dokładną analizę potencjalnych ognisk przerzutowych. Pacjent zagrożony rozsiewem nowotworu nie nadaje się do leczenia radykalnego metodami klasycznej chirurgii lub radioterapii. Istnieje jednak możliwość włączenia terapii systemowej u takich pacjentów, którzy rokują długie przeżycie [18].

Rak prostaty jest szczególnie dokładnie analizowany pod względem obecności komórek CTCs z powodu znanych swoistych dla niego genów (np. PSA i PSMA antygen błonowy swoisty dla prostaty) [35]. De Bono i wsp. [16] badali, czy liczba komórek CTCs przed i po leczeniu cytotoksycznym może prognozować całkowity okres przeżycia. To wieloosrodkowe badanie wykazało, że liczba komórek CTCs mierzona w różnych odstępach czasu po zastosowanym leczeniu jest najlepszym niezależnym wskaźnikiem całkowitego czasu przeżycia u pacjentów z przerzutowym, opornym na kastrację rakiem prostaty. Danila i wsp. [15] ocenili liczbę komórek CTCs u pacjentów z progresywnym przerzutowym rakiem prostaty opornym na kastrację, którzy byli poddani hormonalnym i cytotoksycznym terapiom. Przeanalizowano zwłaszcza związek między liczbą komórek CTCs, a drogą przerzutów razem z innymi wskaźnikami postępu choroby, takimi jak: poziom PSA czy rozsiew do kości. Wykazano, iż pacjenci z obecnymi przerzutami do kości mieli więcej komórek CTCs we krwi. Moreno i wsp. za pomocą technik immunomagnetycznych wykazali, że 23/37 pacjentów z chorobą przerzutową miało 5 lub więcej komórek CTCs na 7,5 ml krwi. Średni okres przeżycia dla tych chorych wynosił mniej niż 1 rok i był o dwa razy krótszy niż dla pacjentów, u których liczba komórek CTCs była mniejsza niż 5/7,5 ml krwi. U pacjentów z liczbą komórek CTCs mniejszą niż 5, średni okres przeżycia wynosił >4 lata [44].

KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE W RAKU NERKI

Leczenie niezaawansowanych postaci raka nerki, gdy guz nowotworowy nie przekracza 7 cm i jest ograniczony do

narządu nie sprawia trudności diagnostycznych i leczniczych, gdyż w tej fazie choroby nie występuje rozsiew, a jeżeli występuje to bardzo rzadko i na ogół można go zdiaгноzować na etapie przedoperacyjnym. Problematyczne jest leczenie skojarzone zaawansowanych raków nerki. W tym przypadku trudno podjąć decyzję którego pacjenta poddać leczeniu chirurgicznemu i systemowemu tak, aby decyzje były trafne.

Dotąd nie przeprowadzono wielu badań dotyczących identyfikacji i charakterystyki komórek CTCs u pacjentów z rakiem nerki. Bluemke i wsp. [6] przeanalizowali 233 próbki krwi obwodowej pochodzące od 154 pacjentów z rakiem nerki. Większość próbek była pobrana przed usunięciem guza. Komórki CTCs zidentyfikowano u 53% pacjentów. Jednak ich obecność nie korelowała z rozmiarem i stadium guza. Autorzy wykazali natomiast znaczącą korelację między detekcją komórek CTCs, a stopniem zajęcia węzłów chłonnych. Dwa inne badania wskazały również na obecność komórek CTCs u 47 i 49% pacjentów z rakiem nerki [25,41]. W tych badaniach również nie dostrzeżono korelacji między obecnością komórek CTCs, a rozmiarem i stadium guza. Podobnie było w badaniach Shimazui i wsp. [71], którzy zidentyfikowali komórki CTCs u 45% pacjentów.

MACIERZYSTE KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Najnowsze badania wskazują, iż guz rozwija się z niewielkiej subpopulacji komórek macierzystych lub komórek inicjujących guza. Zaproponowano zatem hipotezę, że komórki CTCs inicjujące przerzuty odległe mogą być również komórkami macierzystymi [78]. Niektóre właściwości CTCs są zgodne z fenotypem komórek macierzystych, co może wyjaśniać ich oporność na chemioterapię. Zjawisko to zaobserwowano w kilku badaniach klinicznych [8,46,65,79]. Yang i wsp. [80] jako pierwsi zidentyfikowali krążące macierzyste komórki nowotworowe u pacjentów z rakiem wątroby używając markera CD90 (marker macierzystych/progenitorowych komórek). Komórki CD45-/CD90+ były obecne w próbkach pobranych od 90% pacjentów, ale nie od zdrowych osób i pacjentów z marskością wątroby. Znacząca, pozytywna korelacja była między liczbą komórek CD45-/CD90+ w tkance guza i próbkach krwi. Wyizolowane komórki CD90+ generowały powstawanie guzków nowotworowych u myszy z obniżoną odpornością. Lutsberg i wsp. [36] stosując metodę izolacji zaprezentowaną przez Yanga i wsp. [80] dokonali próby izolacji krążących komórek nowotworowych wykazujących ekspresję (markerów mezenchymalnych komórek macierzystych) z próbek krwi pacjentek ze zlokalizowanym lub rozsianym rakiem piersi. Autorzy wyizolowali komórki CTCs zarówno z próbek od pacjentek ze zlokalizowanym, jak i przerzutowym rakiem piersi. Wszystkie wyizolowane komórki wykazywały ekspresję wimentyny i były CD44+ lub/i EFGR+ [36]. Ostatnie doniesienia wskazują, że subpopulacja komórek CTCs u pacjentów z przerzutowym rakiem piersi wykazuje fenotyp progenitorowych komórek macierzystych [74]. Dowiedziono, iż większość komórek macierzystych z zaawansowaną chorobą wykazywała fenotyp CK+/CD44+/CD24-/low, podczas gdy u innej grupy pacjentek zidentyfikowano komórki CTCs o fenotypie ALDH1high/CD24-/low. Fenotypy te świadczą o macierzystości wyizolowanych komórek oraz ich zwiększonym potencjale do nowotworzenia.

Badania dotyczące charakterystyki komórek CTCs są nowatorskie. Konieczna jest dalsza, precyzyjna analiza molekularna definiująca wpływ tych komórek na kancerogenezę.

PODSUMOWANIE

Identyfikacja i monitorowanie krążących komórek nowotworowych we krwi obwodowej może stanowić nieinwazyjne narzędzie w diagnostyce chorób nowotworowych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Alix-Panabieres C., Vendrell J.P., Slijper M., Pelle O., Barbotte E., Mercier G., Jacot W., Fabbro M., Pantel K.: Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2009; 11: R39
- [2] Allard W.J., Matera J., Miller M.C., Repollet M., Connelly M.C., Rao C., Tibbe A.G., Uhr J.W., Terstappen L.W.: Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 6897–6904
- [3] Alunni-Fabbroni M., Sandri M.T.: Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods*, 2010; 50: 289–297
- [4] Balic M., Dandachi N., Hofmann G., Samonigg H., Loibner H., Obwaller A., van der Kooi A., Tibbe A.G., Doyle G.V., Terstappen L.W., Bauernhofer T.: Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2005; 68: 25–30
- [5] Becker C., Jakse G.: Stem cells for regeneration of urological structures. *Eur. Urol.*, 2007; 51: 1217–1228
- [6] Bluemke K., Bilkenroth U., Meye A., Fuessel S., Lautenschlaeger C., Goebel S., Melchior A., Heynemann H., Fornara P., Taubert H.: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009; 18: 2190–2194
- [7] Boorjian S.A., Thompson R.H., Siddiqui S., Bagniewski S., Bergstralh E.J., Karnes R.J., Frank I., Blute M.L.: Long-term outcome after radical prostatectomy for patients with lymph node positive prostate cancer in the prostate specific antigen era. *J. Urol.*, 2007; 178: 864–870
- [8] Braun S., Kantenich C., Janni W., Hepp F., de Waal J., Willgeroth F., Sommer H., Pantel K.: Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 2000; 18: 80–86
- [9] 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
- [10] Cheng L., Zincke H., Blute M.L., Bergstralh E.J., Scherer B., Bostwick D.G.: Risk of prostate carcinoma death in patients with lymph node metastasis. *Cancer*, 2001; 91: 66–73
- [11] Chunmeng S., Tianmin C., Yongping S., Xinze R., Yue M., Jifu Q., Shufen L., Hui X., Chengji L.: Effects of dermal multipotent cell transplantation on skin wound healing. *J. Surg. Res.*, 2004; 121: 13–19
- [12] Clarke M.F., Becker M.W.: Stem cells: the real culprits in cancer? *Sci. Am.*, 2006; 295: 52–59
- [13] Cohen S.J., Punt C.J., Iannotti N., Saidman B.H., Sabbath K.D., Gabrail N.Y., Picus J., Morse M., Mitchell E., Miller M.C., Doyle G.V., Tissing H., Terstappen L.W.M., Meropol N.J.: Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26: 3213–3221
- [14] Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J., Stopeck A., Matera J., Miller M.C., Reuben J.M., Doyle G.V., Allard W.J., Terstappen L.W., Hayes D.F.: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 351: 781–791
- [15] Danila D.C., Heller G., Gignac G.A., Gonzalez-Espinoza R., Anand A., Tanaka E., Lilja H., Schwartz L., Larson S., Fleisher M., Scher H.I.: Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13: 7053–7058
- [16] de Bono J.S., Scher H.I., Montgomery R.B., Parker C., Miller M.C., Tissing H., Doyle G.V., Terstappen L.W.W., Pienta K.J., Raghavan D.: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14: 6302–6309
- [17] Dotan E., Coehn S.J., Alpaugh K.R., Meropol N.J.: Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges. *Oncologist*, 2009; 14: 1070–1082
- [18] Drewa T., Styczynski J.: Can conception of prostate cancer stem cells influence treatment dedicated to patients with disseminated disease? *Med. Hypotheses*, 2008; 71: 694–699
- [19] Elshimali Y.I., Grody W.W.: The clinical significance of circulating tumor cells in the peripheral blood. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2006; 15: 187–194
- [20] Fehm T., Hoffmann O., Aktas B., Becker S., Solomayer E.F., Wallwiener D., Kimming R., Kasimir-Bauer S.: Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res.*, 2009; 11: R59
- [21] Gallagher D.J., Milowsky M.I., Ishill N., Trout A., Boyle M.G., Riches J., Fleisher M., Bajorin D.F.: Detection of circulating tumor cells in patient with urothelial cancer. *Ann. Oncol.*, 2009; 20: 305–308
- [22] Gao J. X.: Cancer stem cells: the lessons from precancerous stem cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008; 12: 67–96
- [23] Gazzaniga P., Gradilone A., Frati L., Agliano A.M.: Epidermal growth factor receptor mRNA expression in peripheral blood of bladder cancer patients: a potential marker to detect treatment failure. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 4288–4299
- [24] Gjertson C.K., Asher K.P., Selar J.D., Goluboff E.T., Olsson C.A., Benson M.C., McKiernan J.M.: Local control and long-term disease-free survival for stage D1 (T2-T4N1-N2M0) prostate cancer after radical prostatectomy in the PSA era. *Urology*, 2007; 70: 723–727
- [25] Hioki T., Sugimura Y.: Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 in patients with renal cell carcinoma. *Hinyokika Kyo*, 1999; 45: 577–581
- [26] Hugo H., Ackland M.L., Blick T., Lawrence M.G., Clements J.A., Williams E.D.S., Thompson E.W.: Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.*, 2007; 213: 374–383
- [27] Hurt E.M., Kawasaki B.T., Klarmann G.J., Thomas S.B., Farrar W.L.: CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br. J. Cancer*, 2008; 98: 756–765
- [28] Kaneda T., Hoshi S., Mao H., Takahashi T., Suzuki K., Sato M., Orikasa S.: Detection of urogenital malignant cells in the peripheral blood by nested RT-PCR using keratin 19 mRNA. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 1998; 89: 33–42
- [29] Kelly K., Yin J.J.: Prostate cancer and metastasis initiating stem cells. *Cell. Res.*, 2008; 18: 857–869
- [30] Kroepfl D., Loewen H., Roggenbuck U., Musch M., Klevecka V.: Disease progression and survival in patients with prostate carcinoma and positive lymph nodes after radical retropubic prostatectomy. *BJU Int.*, 2006; 97: 985–991
- [31] Kucia M., Reza R., Campbell F.R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 2006; 20: 857–869
- [32] Kumar S., Shelley M., Harrison C., Coles B., Wilt T.J., Mason M.D.: Neo-adjuvant and adjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2006; 4: CD006019
- [33] Liang Y., Zhong Z., Huang Y., Deng W., Cao J., Tsao G., Liu Q., Pei D., Kang T., Zeng Y.X.: Stem-like cancer cells are inducible by increasing genomic instability in cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 4931–4940
- [34] Lin T.L., Fu C., Sakamoto K.M.: Cancer stem cells: the root of the problem. *Pediatr. Res.*, 2007; 62: 239



- [35] Loberg R.D., Fridman Y., Pienta B.A., Keller E.T., McCauley L.K., Taichman R.S., Pienta K.J.: Detection and isolation of circulating tumor cells in urologic cancers: a review. *Neoplasia*, 2004; 6: 302–309
- [36] Lootsberg M.B., Balasubramanian P., Lang J., Chalmers K., Shapiro C.L.: Isolation of circulating tumor cells with mesenchymal and stem cell markers in localized and metastatic breast cancer using a novel negative selection enrichment. AACR 101st Annual Meeting, 17-21.04.2010, Washington, opublikowany w *Cancer Research*, 2010; 70
- [37] Lu J., Fan T., Zhao Q., Zeng W., Zaslavsky E., Chen J.J., Frohman M.A., Golightly M.G., Madajewicz S., Chen W.T.: Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *Int. J. Cancer.*, 2010; 126: 669–683
- [38] Maitland N.J., Collins A.T.: Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 2862–2870
- [39] Marotta L.L., Polyak K.: Cancer stem cells: a model in the making. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2009; 19: 44–50
- [40] Martin V.M., Siewert C., Scharl A., Harms T., Heinze R., Ohl S., Radbruch A., Miltenyi S., Schmitz J.: Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp. Hematol.*, 1998; 26: 252–264
- [41] McKiernan J.M., Buttyan R., Bander N.H., de la Taille A., Stifelman M.D., Emanuel E.R., Bagiella E., Rubin M.A., Katz A.E., Olsson C.A., Sawczuk I.S.: The detection of renal carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9. *Cancer*, 1999; 86: 492–497
- [42] Messing E.M., Manola J., Yao J., Kiernan M., Crawford D., Wilding G., di Sant'Agnes P.A., Trump D., Eastern Cooperative Oncology Group study EST 3886.: Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol.*, 2006; 7: 472–479
- [43] Mizrak D., Brittan M., Alison M.: CD133: molecule of the moment. *J. Pathol.*, 2008; 214: 3–9
- [44] Moreno J.G., Miller M.C., Gross S., Allard W.J., Gomella L.G., Terstappen L.W.: Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology*, 2005; 65: 713–718
- [45] Mostert B., Sleijfer S., Foekens J.A., Gratama J.W.: Circulating tumor cells (CTCs): Detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 2009; 35: 463–474
- [46] Muller V., Stahmann N., Riethdorf S., Rau T., Zabel T., Goetz A., Janicke F., Pantel K.: Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 3678–3685
- [47] Nagrath S., Sequist L.V., Maheswaran S., Bell D.W., Irimia D., Utkus L., Smith M.R., Kwak E.L., Digumarthy S., Muzikansky A., Ryan P., Balis U.J., Tompkins R.G., Haber D.A., Toner M.: Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007; 450: 1235–1239
- [48] Nair B., Wilt T., MacDonald R., Rutks I.: Early versus deferred androgen suppression in the treatment of advanced prostatic cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2002; 1: CD003506
- [49] Naoe M., Ogawa Y., Morita J., Omori K., Takeshita K., Shichijyo T., Okumura T., Igarashi A., Yanaihara A., Iwamoto S., Fukaqai T., Miyazaki A., Yoshida H.: Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the CellSearch System. *Cancer*, 2007; 109: 1439–1445
- [50] Nezos A., Pissimisis N., Lembessis P., Sourla A., Dimopoulos P., Tzelepis K., Koutsilieris M.: Detection of circulating tumor cells in bladder cancer patients. *Cancer Treat. Rev.*, 2009; 35: 272–279
- [51] Nilsson S., Norlén B.J., Widmark A.: A systematic overview of radiation therapy effects in prostate cancer. *Acta. Oncol.*, 2004; 43: 316–381
- [52] Palapattu G.S., Allaf M.E., Trock B.J., Epstein J.I., Walsh P.C.: Prostate specific antigen progression in men with lymph node metastases following radical prostatectomy: results of long-term followup. *J. Urol.*, 2004; 172: 1860–1864
- [53] Palisaar R.J., Noldus J.: The role of surgery in locally advanced prostate cancer. *Urologe A*, 2008; 47: 1417–1423
- [54] Pantel K., Alix-Panabieres C.: Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.*, 2010; 16: 398–406
- [55] Pantel K., Alix-Panabieres C., Riethdorf S.: Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2009; 6: 339–351
- [56] Pantel K., Brakenhoff R.H., Brandt B.: Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat. Rev. Cancer.*, 2008; 8: 329–340
- [57] Pantel K., Izbicki J.R., Angstwurm M., Braun S., Passlick B., Karg O., Thetter O., Riethmuller G.: Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 1993; 53: 1027–1031
- [58] Pantel K., Schlimok G., Braun S., Kutter D., Lindemann F., Schaller G., Funke I., Izbicki J.R., Riethmuller G.: Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993; 85: 1419–1424
- [59] Paterlini-Brechot P., Benali N.L.: Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett.*, 2007; 253: 180–204
- [60] Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R., Li H., Bhatia B., Tang S., Reilly J.G., Chandra D., Zhou J., Claypool K., Coghlan L., Tang D.G.: Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, 2006; 25: 1696–1708
- [61] Plotkin M.D., Goligorsky M.S.: Mesenchymal cells from adult kidney support angiogenesis and differentiate into multiple interstitial cell types including erythropoietin-producing fibroblasts. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2006; 291: F902–F912
- [62] Racila E., Euhus D., Weiss A.J., Rao C., McConnell J., Terstappen L.W., Uhr J.W.: Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 4589–4594
- [63] Ratajczak M.Z., Machalinski B., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M.: A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*, 2007; 21: 860–867
- [64] Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001; 414: 105–111
- [65] Riethdorf S., Muller V., Zhang L., Rau T., Loibl S., Komor M., Roller M., Huober J., Fehm T., Schrader I., Hilfrich J., Holms F., Tesch H., Eidtmann H., Untch M., von Minckwitz G., Pantel K.: Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the Neoadjuvant GepaQuattro Trial. *Clin. Cancer Res.*, 2010; 16: 2634–2645
- [66] Rink M., Chun F.K.H., Minner S., Friedrich M., Mauermann O., Heinzer H., Hauland H., Fisch M., Pantel K., Riethdorf S.: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU Int.*, 2011; 107: 1668–1675
- [67] Roberts S.G., Blute M.L., Bergstralh E.J., Slezak J.M., Zincke H.: PSA doubling time as a predictor of clinical progression after biochemical failure following radical prostatectomy for prostate cancer. *Mayo Clin. Proc.*, 2001; 76: 576–581
- [68] Ross J.S., Slodkowska E.A.: Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2009; 132: 237–245
- [69] Sastre J., Maestro M.L., Puente J., Veganzones S., Alfonso R., Rafael S., Garcia-Saenz J.A., Vidaurreta M., Martin M., Arroyo M., Sanz-Casla M.T., Diaz-Rubio E.: Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann. Oncol.*, 2008; 19: 935–938
- [70] Schwarzenbach H., Alix-Panabieres C., Muller I., Letang N., Vandrell J.P., Rebillard X., Pantel K.: Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 1032–1038
- [71] Shimazui T., Yoshikawa K., Uemura H., Kawamoto R., Kawai K., Uchida K., Hirao Y., Saga S., Akaza H.: Detection of cadherin-6 mRNA by nested RT-PCR as a potential marker for circulating cancer cells in renal cell carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 2003; 23: 1049–1054
- [72] Soltysova A., Altanerova V., Altaner C.: Cancer stem cells. *Neoplasma*, 2005; 52: 435–440
- [73] Steeg P.S.: Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer.*, 2003; 3: 55–63
- [74] Theodoropoulos P.A., Polioudaki H., Agelaki S., Kallergi G., Saridaki Z., Mavroudis D., Georgoulas V.: Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett.*, 2010; 288: 99–106
- [75] Thiery J.P.: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.*, 2002; 2: 442–454
- [76] Ts'o P.O., Panek J., Wang Z.P., Lesko S.A., Bova G.S., Partin A.W.: Detection of intact prostate cancer cells in the blood of men with prostate cancer. *Urology*, 1997; 49: 881–885
- [77] Vona G., Sabile A., Louha M., Sitruk V., Romana S., Schutze K., Capron F., Franco D., Pazzagli D., Vekemans M., Lacour B., Brechot C., Paterlini-Brechot P.: Isolation by size of epithelial tumor cells: A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am. J. Pathol.*, 2000; 156: 57–63

- [78] Wicha M.S., Liu S., Dontu G.: Cancer stem cells: an old idea – a paradigm shift. *Cancer Res.*, 2006; 66: 1883–1890
- [79] Wiedswang G., Borgen E., Karesen R., Qvist H., Janbu J., Kvalheim G., Nesland J.M., Naume B.: Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin. Cancer. Res.*, 2004; 10: 5342–5348
- [80] Yang Z.F., Ngai P., Ho D.W., Yu W.C., Ng M.N., Lau C.K., Li M.L., Tam K.H., Lam C.T., Poon R.T., Fan S.T.: Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*, 2008; 47: 919–928
- [81] Yun K., Tennent B.: Cancer stem cells. *Drug. Discov. Today. Dis. Models*, 2007; 4: 47–52
- [82] Zipori D.: The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*, 2005; 23: 719–726

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

