

Mateusz TWARDAWA^{1,2}, Piotr FORMANOWICZ¹

¹Instytut Informatyki, Politechnika Poznańska

² Dział Bezpieczeństwa ICT, Poznańskie Centrum Superkomputerowo-Sieciowe afiliowane przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN

WIELOAGENTOWA SYMULACJA POLARYZACJI MAKROFAGÓW TOWARZYSZĄCYCH NOWOTWOROM*

Streszczenie. Zdolność adaptacji do mikrośrodowiska oraz dynamicznej reakcji na jego zmiany jest kluczową cechą makrofagów, odzwierciedlającą ich ogromną plastyczność fenotypową. Upraszczając można wyróżnić dwa rodzaje makrofagów w stanie aktywnym, tj. M1 oraz M2, jedne i drugie często towarzyszą nowotworom. Podczas gdy makrofagi M1 dążą do eliminacji komórek nowotworu, M2 promują ich wzrost i ułatwiają złośliwienie. W tej pracy zaprezentowano wieloagentowy model polaryzacji makrofagów w obecności komórek nowotworowych. Wyniki symulacji prezentują złożoną dynamikę rozwoju nowotworu w różnych warunkach.

MULTI-AGENT SIMULATION OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES POLARISATION

Summary. The ability to adapt to tissue microenvironment and dynamically respond to changes is the key feature of macrophages, reflecting their enormous phenotypic plasticity. To keep things simple, two types of macrophages in active state may be distinguished, i.e., M1 and M2, both of them are commonly found around tumor cells. While M1 macrophages eliminates tumor cells, M2 promote their growth and facilitate malignancy. This paper presents multi-agent simulation model of macrophages polarization in presence of cancer cells. Simulation results express complex dynamics of cancer development under different conditions.

1. Wprowadzenie

Ogólny podział na makrofagi prozapalne (M1) i antyzapalne (M2) wywodzi się z analogi do polaryzacji limfocytów Th na Th1 i Th2 [13]. Makrofagi w zależności od rodzaju i stężenia różnych molekuł w swoim otoczeniu są w stanie wykształcić odmienne fenotypy, które ciężko jest przypisać do dwóch przeciwstawnych klas [14]. Mimo, iż obecnie wiadomo, że dychotomiczny podział makrofagów na aktywowane klasycznie (M1) i aktywowane alternatywnie (M2) jest dużym uproszczeniem, staje się on bardzo pomocny zarówno w diagnostyce jak i modelowaniu nowotworów [8, 11].

*Badania częściowo sfinansowane ze środków statutowych Politechniki Poznańskiej.

Promujące stan zapalny makrofagi M1 mogą zostać aktywowane przez szereg czynników. Do najbardziej typowych zalicza się między innymi lipopolisacharyd (LPS) i interferon gamma ($\text{INF-}\gamma$). Makrofagi M1 wydzielają szereg cytokin prozapalnych w tym: $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 , IL-23 , $\text{TNF-}\alpha$. Dodatkowo makrofagi M1 są zdolne do fagocytozy innych komórek (w tym nowotworowych), cytotoksyczności komórkowej, produkcji NO i ROS. Dzięki takiemu zestawowi cech są w stanie zwalczać nie tylko infekcje bakteryjne, ale także eliminować komórki nowotworowe [9]. Wysoki udział procentowy tych makrofagów w okolicy guza nowotworowego jest wiązany z lepszą prognozą [8].

Natomiast makrofagi M2 spełniają przeciwstawną rolę. Ten typ makrofagów jest w stanie hamować (regulować) odpowiedź immunologiczną oraz wspierać regenerację tkanek. Aktywowane między innymi przez cytokiny takie jak: IL-4 , IL-10 , IL-13 , $\text{TGF-}\beta$ makrofagi M2 wykształcają antyzapalne właściwości. Za pośrednictwem czynników takich jak np. CCL17 , CCL22 , IL-10 , IL-1RA , EGF , VEGF komórki te mogą regulować odpowiedź immunologiczną, stymulować i uczestniczyć w odnowie, przemodelowaniu tkanek i angiogenezie, a także regulować wzrost i tempo podziałów innych komórek [3, 19]. Jeśli w badaniach stwierdza się przewagę tych makrofagów w okolicy guza nowotworowego, to często skutkuje ona gorszą prognozą [8].

Komórki nowotworowe potrafią drastycznie zmienić swoje środowisko. Wydzielane przez nie związki takie jak cytokiny antyzapalne, czynniki wzrostu, czy stymulatory angiogenezy, wpływają zarówno na nie same, jak i na otaczające je komórki. Dodatkowo szybko rozwijającym się nowotworom towarzyszy często hipoksja i powiązany z nią spadek pH. Nowotwory są też w stanie promować rozkład macierzy międzykomórkowej, co sprawia, że powstawanie przerzutów jest łatwiejsze [5]. Wszystkie te czynniki mają duży wpływ na komórki w otoczeniu, w tym komórki układu immunologicznego.

Makrofagi także mogą zostać zmanipulowane przez środowisko nowotworu i ulec polaryzacji do makrofagów M2 (określa się je często mianem M2-podobnych). Takie makrofagi wspierają nowotwór na wszystkich etapach rozwoju od niegroźnej grupy dzielących się komórek po złośliwy guz kolonizujący nowe narządy. Makrofagi M2 towarzyszące nowotworom poprzez supresję odpowiedzi immunologicznej mogą chronić komórki nowotworowe przed reakcją organizmu. Dodatkowo wspierają wzrost nowotworu wydzielając czynniki wzrostu oraz zapewniają nowotworom ciągły dopływ składników odżywczych i tlenu dzięki sekrecji stymulatorów angiogenezy. Natomiast wydzielane przez M2 metaloproteiny trawią macierz komórkową pozwalając na uwalnianie się pojedynczych komórek nowotworu do krwioobiegu [12]. Makrofagi M2 w niektórych przypadkach mogą stanowić nawet do 50% masy guza nowotworowego [18].

Z drugiej strony, nowotwory mogą zostać wykryte na różnych etapach rozwoju przez układ odpornościowy. Gdy tak się stanie, makrofagi mogą zostać spolaryzowane do fenotypu M1, który eliminuje komórki nowotworowe poprzez promocje stanu zapalnego, cytotoksyczność, wydzielanie $\text{TNF}\alpha$, ROS i NO oraz fagocytozę [19]. Czas wykrycia nowotworu nie jest bez znaczenia i jeśli stanie się to zbyt późno, układ immunologiczny nie jest w stanie samodzielnie go wyeliminować. Zgodnie z modelem immunoredagowania nowotworów można wyróżnić trzy etapy dynamiki rozwoju nowotworu [20]:

- (a) eliminacja – komórki nowotworowe są zabijane, najczęściej na wczesnym stadium;
- (b) równowaga – wzrost nowotworu jest równoważony przez śmiertelność komórek

nowotworowych wynikającą z odpowiedzi układu odpornościowego;

- (c) ucieczka – wydostanie się grupy komórek nowotworowych spod kontroli układu immunologicznego, który nie jest w stanie samodzielnie zwalczyć choroby.

W tej pracy zaprezentowano model symulacyjny rozwoju nowotworu i jego interakcji z układem immunologicznym. Wpływ mikrośrodowiska nowotworu na leukocyty został zamodelowany jako polaryzacja makrofagów. Wyniki symulacji przedstawiają dynamikę eliminacji oraz ucieczki nowotworu spod nadzoru ze strony systemu odpornościowego.

2. Implementacja modelu

Przestrzenny model rozwoju nowotworu z polaryzacją makrofagów zaimplementowano w języku C++ przy wykorzystaniu środowiska PhysiCell (wersja 1.7.0) [7]. Gotowy silnik symulacji zawarty w PhysiCell pozwala na stworzenie realistycznego modelu. PhysiCell posiada definicje komórki i jej interakcji, cyklu komórkowego, programowanej śmierci oraz wykorzystuje OpenMP do zrównoleglenia obliczeń. Ponadto PhysiCell bazuje na BioFVM [6], silniku służącym do symulacji substratów w mikrośrodowisku. Pozwala on na wyliczanie koncentracji substratów w przestrzeni oraz wewnątrz komórek w oparciu o sekrecję komórkową, rozpad i dyfuzję. Szczegółowe informacje dotyczące środowiska i możliwości, jakie oferuje, można znaleźć w jego dokumentacji [7].

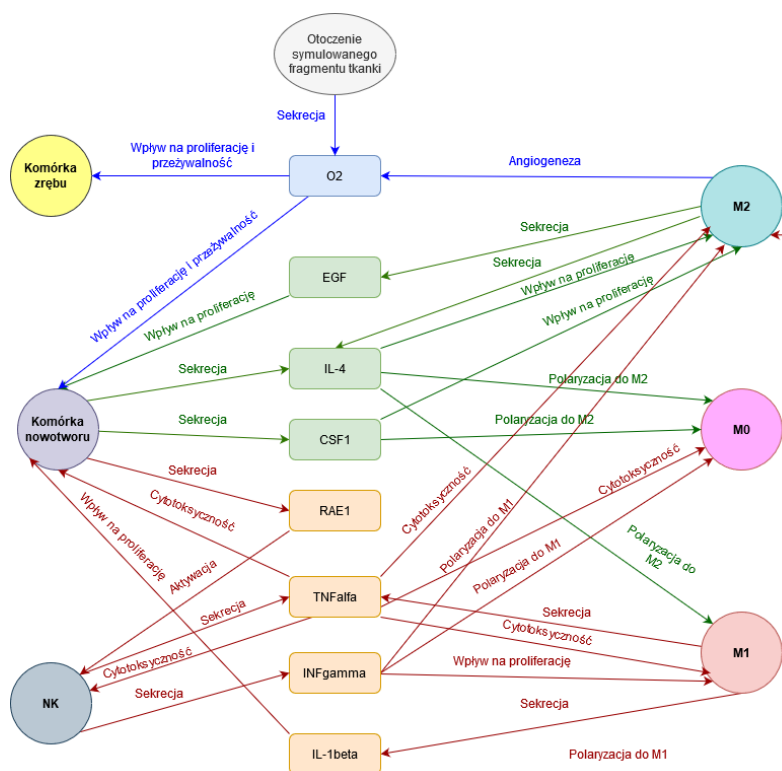
W modelu uwzględniono następujące typy komórek: komórka nowotworowa, makrofag M0 (nieaktywowany), makrofag M1, makrofag M2, komórka NK, komórka zrębu tkanki. Komórki wchodzą ze sobą w interakcje poprzez wydzielanie do mikrośrodowiska różnych związków (głównie cytokin) i odpowiedź na nie w zależności od ich lokalnego stężenia. Poniżej opisano poszczególne komórki i ich funkcje. W tabeli 1 zamieszczono informacje o związkach komórek z cytokinami. Dodatkowo na rysunku 1 zaprezentowano graf interakcji pomiędzy typami komórek w modelu.

Tempo podziałów i śmiertelność komórek nowotworowych są uzależnione przede wszystkim od lokalnego stężenia tlenu. Komórki nowotworowe wydzielają trzy cytokiny: IL-4, CSF-1 oraz RAE1. IL-4 reprezentuje szereg antyzapalnych cytokin, które są w stanie polaryzować makrofagi i wzmacniać ich podziały. Podobną funkcję ma CSF-1, który stymuluje makrofagi M2 do sekrecji EGF oraz stanowi dla nich oprócz hipoksji dodatkowy czynnik chemotaktyczny. RAE1 jest związkiem wykrywanym przez komórki NK, który powstaje w trakcie intensywnych i nieprawidłowych podziałów, co stanowi sygnał do aktywacji komórek NK. Dziewicze makrofagi M0 są aktywowane alternatywnie (do M2) przez CSF-1 i IL-4, wydzielane przez nowotwór, natomiast aktywacja klasyczna (do M1) odbywa się za pośrednictwem wydzielanego przez komórki NK $INF-\gamma$. Komórki NK oraz makrofagi M1 produkują $TNF\alpha$, który reprezentuje cytotoksyczne związki, pozwalające na zabicie innych komórek (w tym przede wszystkim reaktywne formy tlenu i tlenek azotu), przy czym zbyt wysokie stężenie $TNF\alpha$ jest w stanie zabić także komórki go wydzielające. Ponadto $IL-1\beta$ zmniejsza tempo podziałów komórek nowotworowych. Komórki zrębu nie są zaangażowane w interakcje z resztą typów komórek, stanowią natomiast element mechaniczny symulacji, wpływając na poruszanie się komórek, taksję w kierunku niskich stężeń tlenu oraz stanowią przeszkodę dla rozrastającej się populacji komórek nowotworowych.

Tabela 1

Sekrecja i oddziaływania zaimplementowanych w modelu związków na różne typy symulowanych komórek.

Typ komórki	Sekrecja	Taksja	Czynniki apoptotyczne	Regulacja tempa podziałów	Aktywacja klasyczna	Aktywacja alternatywna
kom. nowotworowa	RAE1, CSF-1, IL-4	-	TNF α , hipoksja	O ₂ , EGF, IL-1 β	-	-
M0	-	IL-4, INF- γ	TNF α	-	INF- γ	CSF-1, IL-4
M1	TNF α , IL-1 β , INF- γ	RAE1, hipoksja	TNF α	INF- γ	-	IL-4
M2	EGF, IL-4, O ₂	hipoksja, CSF-1	TNF α	CSF-1	INF- γ , IL-1 β	-
NK	TNF α , INF- γ	RAE-1	TNF α	-	RAE1	-
kom. zrębu	-	-	hipoksja	O ₂	-	-



Rys. 1. Graf interakcji pomiędzy komórkami i cytokinami w modelu (chemotaksja nie została uwzględniona).

W modelu używanych jest wiele parametrów, z czego większość z nich jest ustalona na stałą wartość. Najważniejsze parametry modelu zostały przedstawione poniżej w tabeli 2. Podziały i śmiertelność komórek nowotworowych są regulowane głównie przez lokalne stężenie tlenu. W tym przypadku została użyta metoda pochodząca z środowiska PhysiCell (`update_cell_and_death_parameters_O2_based`), która wylicza

automatycznie te współczynniki podziałów i śmiertelności [7]. Wartość współczynnika proliferacji jest dodatkowo modyfikowana w zależności od lokalnej koncentracji IL-1 β oraz EGF. Całość można przedstawić za pomocą wzoru:

$$R_{ntw} = \frac{C_{O_2} - W_{O_2}}{S_{O_2} - W_{O_2}} + a(C_{EGF} - C_{IL-1\beta}) \quad (1)$$

gdzie:

R_{ntw} - współczynnik proliferacji komórek nowotworowych,

C_{O_2} - koncentracja tlenu w miejscu, w którym znajduje się komórka,

W_{O_2} - próg koncentracji tlenu, poniżej którego podziały są zatrzymane, a współczynnik ustalany na 0%,

S_{O_2} - próg koncentracji tlenu, powyżej którego współczynnik proliferacji osiągnie wartość 100%,

C_{EGF} - koncentracja EGF w miejscu, w którym znajduje się komórka,

$C_{IL-1\beta}$ - koncentracja IL-1 β w miejscu, w którym znajduje się komórka,

a - parametr siły wpływu cytokin na podziały komórek nowotworowych.

Współczynnik proliferacji przyjmuje wartość od 0 do 1 i wpływa na długość trwania cyklu komórkowego. Jeśli wynosi on 1, to wcześniej ustalona długość cyklu nie ulega zmianie, natomiast im wartość jest bliższa zero, tym dłużej trwa cykl komórkowy (dla 0 jest on zatrzymany). Parametr regulujący siłę oddziaływania cytokin (a) w modelu ustalono na stałą wartość równą 0.02. Wartości progów pozostawiono na poziomie zaproponowanym przez twórców środowiska Physicell, czyli $W_{O_2} = 5$ mmHg, a $S_{O_2} = 160$ mmHg. Parametry C_{EGF} oraz $C_{IL-1\beta}$ mogą przyjmować wartości od 0 do 10, co jest wynikiem zaimplementowania na tym poziomie progów wartości wysycenia dla cytokin.

Stężenie cytokin w modelu zawiera się w przedziale od 0 do 10. Jest to wynikiem przyjęcia skalowania, które jest niezbędne ze względu na zapewnienie w przyszłości możliwości dopasowywania różnych scenariuszy zakresu wartości dla poszczególnych cytokin. Przykładowe wartości jakie można by było założyć w przypadku nowotworu jelita grubego są podane w tabeli 3. Przy takim skalowaniu wartość bazowa zdrowej tkanki to 0, a wartość wysycenia w rejonie guza to 10. Współczynnik dyfuzji dla wszystkich cytokin ustalono dla uproszczenia na poziomie $1000 \mu\text{m}^2/\text{min}$.

Pozostałe komórki mają stałe tempo podziałów i spontanicznej apoptozy, co zostało pokazane w tabeli 2, która prezentuje wszystkie stałe zawarte w symulacji. Do stałych wlicza się także: szybkość poruszania się komórek, odchylenie od kierunku taksji, ilość wydzielanych i pochłanianych substratów i ich współczynniki dyfuzji oraz degradacji, a także współczynnik adhezji komórek do innych komórek.

3. Symulacje

W ramach badań przeprowadzono symulacje modelu zgodnie z trzema scenariuszami, z których dwa są związane z etapami procesu immunoedytowania. Rozwój nowotworu we wszystkich symulacjach był obserwowany przez 300 dni. Pierwszy scenariusz to sam wzrost komórek nowotworowych, bez odpowiedzi ze strony układu odpornościowego. Jego celem jest nadanie pozostałym symulacjom punktu odniesienia. Pozostałe dwa scenariusze prezentują etapy eliminacji i ucieczki. W scenariuszach immunoedytowania zróżnicowano jedynie czas detekcji komórek nowotworowych przez komórki NK (30 dni w scenariuszu z eliminacją oraz 80 z ucieczką), co zrobiono przez modyfika-

Tabela 2

Najważniejsze domyślne parametry symulacji.

Nazwa parametru	kom. ntw.	M0	M1	M2	NK	kom. zr.
Wsp. proliferacji	0.1	0.001	0.001	0.001	0.001	0.01
Wsp. śmiertelności	0.0001	2×10^{-6}	2×10^{-6}	2×10^{-6}	2×10^{-6}	2×10^{-6}
Wsp. poboru O ₂	10	10	10	10	10	10
Wsp. wydzielania O ₂	0	0	0	3	0	0
Wsp. gęstości dla statucji O ₂	0	0	0	10	0	0
Wsp. wydzielania TNF α	0	0	6	0	10	0
Wsp. gęstości dla statucji TNF α	0	0	10	0	10	0
Wsp. wydzielania IL-1 β	0	0	6	0	0	0
Wsp. gęstości dla statucji IL-1 β	0	0	10	0	0	0
Wsp. wydzielania INF γ	0	0	3	0	10	0
Wsp. gęstości dla statucji INF γ	0	0	7	0	10	0
Wsp. wydzielania EGF	0	0	0	6	0	0
Wsp. gęstości dla statucji EGF	0	0	0	10	0	0
Wsp. wydzielania IL-4	3	0	0	6	0	0
Wsp. gęstości dla statucji IL-4	6	0	0	10	0	0
Wsp. wydzielania CSF1	3	0	0	0	0	0
Wsp. gęstości dla statucji CSF1	7	0	0	0	0	0
Wsp. wydzielania RAE1	3	0	0	0	0	0
Wsp. gęstości dla statucji RAE1	7	0	0	0	0	0
Wsp. odchylenia od kierunku taksji	0	0.4	0.1	0.6	0.4	0
Próg śmiertelności zw. z TNF α	7	10	11.5	10	11.5	-
Próg aktywacji klasycznej	-	1.5	-	9	1	-
Próg aktywacji alternatywnej	-	1.5	13	-	-	-

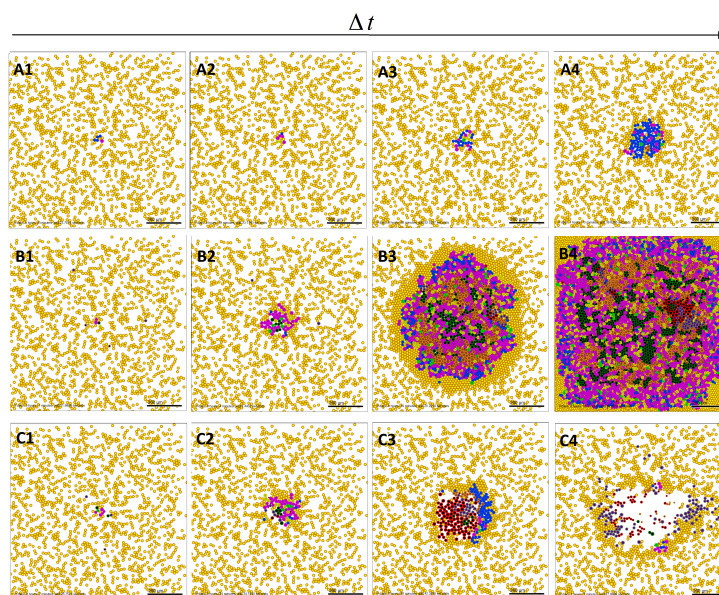
Tabela 3

Przykład ustalenia wartości stężeń dla cytokin w modelu, wykonany dla hipotetycznego nowotworu jelita grubego. Przyjęto, że stężenia w rejonie guza są wartościami maksymalnego wysycenia.

	EGF [1]	IL-4 [2]	CSF-1 [16]	RAE1 [10]	TNF α [21]	INF γ [17]	IL-1 β [4]
Zdrowa tkanka	100 $\frac{pg}{ml}$	10 $\frac{pg}{ml}$	12 $\frac{pg}{ml}$	10 $\frac{pg}{ml}$	100 $\frac{pg}{ml}$	5 $\frac{pg}{ml}$	40 $\frac{pg}{ml}$
Rejon guza	400 $\frac{pg}{ml}$	100 $\frac{pg}{ml}$	120 $\frac{pg}{ml}$	30 $\frac{pg}{ml}$	1500 $\frac{pg}{ml}$	100 $\frac{pg}{ml}$	400 $\frac{pg}{ml}$

cje odległości komórek NK od ogniska nowotworu. Wszystkie symulacje w momencie inicjalizacji składały się z 1600 komórek zrębu, 3 komórek nowotworowych oraz źródła tlenu na granicach symulowanej przestrzeni. W scenariuszach ucieczki i eliminacji dodano po dwie komórki NK i trzy komórki M0.

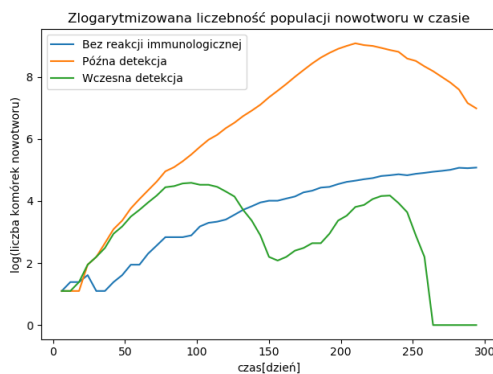
Rozwój nowotworu pozbawiony interakcji z komórkami układu odpornościowego jest wolny. Populacja komórek nowotworowych po osiągnięciu pewnej wielkości zwalnia i stabilizuje tempo swojego wzrostu. Jest to wynikiem hipoksji, która ma bezpośredni wpływ na śmiertelność i tempo podziałów komórek oraz brakiem M2, których rolą jest wydzielanie stymulatorów podziałów takich jak EGF, czy dodatkowych. Na rysunku 2 dokonano wizualizacji symulacji w wybranych momentach dla wszystkich scenariuszy, natomiast tempo wzrostu populacji komórek nowotworowych zostało przedstawione na rysunku 3.



Rys. 2. Wizualizacja przebiegów 3 scenariuszy symulacji: A – bez interakcji immunologicznych, B – z późną detekcją, C – z wczesną detekcją. Dla każdego scenariusza pokazano migawki z symulacji w 4 momentach. Każdy numer przy literze dla scenariusza oznacza konkretny moment w czasie, w jakim została zrobiona migawka (1 – 20 dni po rozpoczęciu symulacji, 2 – 60 dni, 3 – 120 dni oraz 4 – 180 dni). Symulacje trwały nie dłużej niż 300 dni. Każda z komórek na wizualizacji została wyróżniona za pomocą kolorów: fioletowy, niebieski lub zielony – komórka nowotworowa na różnych etapach cyklu komórkowego, żółty – komórka zrębu, jasnoróżowy – makrofag M0, czerwony - M1, ciemnozielony – M2, szary - NK , brązowy – komórka nowotworowa umierająca na skutek hipoksji.

W przypadku scenariusza z późną detekcją nowotworu tempo wzrostu jest o wiele wyższe i podobnie jak w poprzednim przypadku, zostaje w pewnym momencie ograniczone przez hipoksję i brak wystarczającej ilości miejsca w symulowanej przestrzeni. Szybkie tempo wzrostu jest wynikiem obecności w okolicy komórek nowotworowych, makrofagów M2-podobnych, które wydzielają czynniki wzrostu (EGF) oraz symulują angiogenezę przez wydzielanie do otoczenia niewielkich ilości tlenu. Jako że tempo podziałów i śmiertelność komórek nowotworowych jest w dużej mierze uzależniona od tlenu, to bezpośrednio wpływa na rozwój nowotworu.

W scenariuszu z szybką detekcją nowotworu komórką NK udaje się szybko spolaryzować makrofagi do fenotypu M1. Prowadzi to do eliminacji komórek nowotworowych, które są atakowane zarówno przez makrofagi M1, jak i komórki NK, a ponadto nowotwór nie jest w stanie wykształcić w pełni swojego mikrośrodowiska, ponieważ makrofagi M0 oraz M2 zostają szybko spolaryzowane do M1. Niszczenie komórek nowotworowych nie przebiega od razu i zdarza się, że część komórek nowotworowych przeżyje atak układu odpornościowego pozostając niewykryta. Taka grupa komórek nowotworowych może odtworzyć nowotwór lub zostać wykryta przez komórki NK i makrofagi M1, które będą dążyć do jej eliminacji.



Rys. 3. Wykres przedstawiający liczebność populacji komórek nowotworowych (logarytm naturalny) w czasie dla trzech scenariuszy symulacji.

4. Podsumowanie

Zaprezentowany w tej pracy model jest jeszcze na wczesnym etapie rozwoju i ma charakter weryfikacji koncepcji (ang. proof of concept). Obecny stan prac pozwolił na odtworzenie podstawowych mechanizmów związanych z polaryzacją makrofagów, wzrostem populacji komórek nowotworach, odpowiedzi ze strony układu immunologicznego oraz na ukazanie wpływu, jaki ma nowotwór na kształtowanie swojego otoczenia, w tym manipulację innymi komórkami (M2). Model potrafi odtworzyć zbliżone do rzeczywistego zachowanie nowotworu i interakcje z układami odpornościowym. W szczególności model oddaje sposób infiltracji nowotworu przez makrofagi oraz wiązanie prognozy dotyczącej dalszego rozwoju choroby z proporcją makrofagów M1 do M2 [8]. Planowane są dalsze prace nad symulacjami, które pozwolą na lepszą parametryzację modelu oraz wprowadzą mechanizmy pozwalające na ewolucję somatyczną nowotworu (dodając genom, mutacje, mapowanie genotypu do fenotypu). Kolejnym usprawnieniem byłoby dodanie do modelu rekrutacji monocytów i innych komórek takich jak limfocyty Th, czy neutrofile. Wytworzenie dobrego modelu dałoby możliwość testowania różnych leków i sprawdzania ich wpływu na polaryzację makrofagów. Skierowanie terapii przeciw mikrośrodkowisku nowotworów staje się obecnie coraz bardziej popularnym tematem badań [15], a docelowy model wpisują się w ten trend.

LITERATURA

1. Abdulla M.H., Shaik A.S., Vaali-Mohammed M.A., Al Khayal K.A., Traiki T.B., Zubaidi A.M., Al-Johani T., Shakoor Z., Al-Obeed O.A.: Expression of VEGF, EGF and HGF in early- and late-stage colorectal cancer. *Mol Clin Oncol.*, 15(6):251, 2021.
2. Bednarz-Misa I., Diakowska D., Szczuka I., Fortuna P., Kubiak A., Rosińczuk J., Krzystek-Korpaczka M.: Interleukins 4 and 13 and Their Receptors Are Differently Expressed in Gastrointestinal Tract Cancers, Depending on the Anatomical Site and Disease Advancement, and Improve Colon Cancer Cell Viability and Motility, *Cancers*, 12(6):1463, 2020
3. Cheng H., Wang Z., Fu L., Xu T.: Macrophage Polarization in the Development and Progression of Ovarian Cancers: An Overview. *Front Oncol.*, 9:421, 2019 p. 1-11.
4. Coccia M., Harrison O.J., Schiering C., Asquith M.J., Becher B., Powrie F., Maloy K.J., IL-1 β mediates

- chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells, *J Exp Med*, 27:0209(9), 2012 p. 1595-1609.
5. Douglas H., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer - Perspectives for cancer medicine, *Oxford Textbook of Oncology*, Oxford University Press p. 3-10.
 6. Ghaffarizadeh A., Friedman S.H., Macklin P.: BioFVM: an efficient, parallelized diffusive transport solver for 3-D biological simulations, *Bioinformatics*, 32(8), 2016, p. 1256–1258.
 7. Ghaffarizadeh A., Heiland R., Friedman S.H., Mumenthaler S.M., Macklin P.: PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems. *PLoS Comput Biol* 14(2), 2018, p. 1-31.
 8. Jayasingam S.D., Citartan M., Thang T.H., Mat Zin A.A., Ang K.C. and Ch'ng E.S.: Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front. Oncol.*, 9:1512, 2020, p. 1:9.
 9. Juhas U., Ryba-Stanisławowska M., Szargiej P., Myśliwska J.: Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 69, 2015, p. 496-502.
 10. Kobayashi Y., Masuda T., Fujii A., Shimizu D., Sato K., Kitagawa A., Tobo T., Ozato Y., Saito H., Kuramitsu S., Noda M., Otsu H., Mizushima T., Doki Y., Eguchi H., Mori M., Mimori K.: Mitotic checkpoint regulator RAE1 promotes tumor growth in colorectal cancer, *Cancer Sci.*, 112(8), 2021, p. 3173-3189.
 11. Li X., Jolly M.K., George J.T., Pienta K.J. and Levine H.: Computational Modeling of the Crosstalk Between Macrophage Polarization and Tumor Cell Plasticity in the Tumor Microenvironment. *Front. Oncol.*, 9:10, 2019 p. 1-12.
 12. Lin Y., Xu J. and Lan H.: Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol* 12(76), 2019, p. 1-16.
 13. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M.: M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 2000, p. 6166–6173.
 14. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., et al.: Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 2014, p. 14-20.
 15. Roma-Rodrigues C., Mendes R., Baptista P.V., Fernandes A.R.: Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.*20(4):840, 2019, p. 57–69.
 16. Ryan G.R., Dai X.M., Dominguez M.G., Tong W., Chuan F., Chisholm O., Russell R.G., Pollard J.W., Stanley E.R.: Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis, *Blood*, 1:98(1), 2001 p. 74-84
 17. Schuhmann D., Godoy P., Weiss C., Gerloff A., Singer M.V., Dooley S., Böcker U.: Interfering with interferon- γ signalling in intestinal epithelial cells: selective inhibition of apoptosis-maintained secretion of anti-inflammatory interleukin-18 binding protein, *Clin Exp Immunol.*, 163(1), 2011 p. 65-76
 18. Solinas G., Germano G., Mantovani A., Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 86, 2019, p. 1065-1073.
 19. van Dalen F.J., van Stevendaal M.H.M.E., Fennemann F.L., Verdoes M., Iliina O.: Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. *Molecules*. 24(1):9. 2018, p. 1 - 25.
 20. Vesely M.D., Kershaw M.H., Schreiber R.D., Smyth M.J.: Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer, *Annual Review of Immunology* 29(1), 2011, p. 235-271.
 21. Wang Y., Han G., Wang K., Liu G., Wang R., Xiao H., Li X., Hou C., Shen B., Guo R., Li Y., Chen G.: Tumor-derived GM-CSF promotes inflammatory colon carcinogenesis via stimulating epithelial release of VEGF, *Cancer Res.*,74(3) 2014 p. 716-26.