

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Vanja Cvijić

**Maligne karakteristike tumorskih
matičnih stanica**

DIPLOMSKI RAD



ZAGREB, 2018

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc.dr. Filipa Sedlića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

Mentor rada: doc. dr. Filip Sedlić, dr.med.

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:

AML-akutna mijeloična leukemija

BCL2 - eng.B-cell lymphoma 2

CDK- kinaze ovisne o ciklinima (eng.cyclin-dependent kinase)

CKII-kazein kinaza II

CSC- tumorske matične stanice (eng.cancer stem cells)

DACT-engl.dishevelledbinding antagonist of beta catenin 2

DHH-eng.desert hedgehog

E2F- eng.E2transcription factor

EBV - Epstein Barrov virus

EMT - epitelno-mezenhimalna tranzicija(eng.epithelial–mesenchymaltransition)

EPO - eritropoetin

ErbB - eng. epidermal growth factor *family* of receptor tyrosine kinases

FGF - fibroblastni čimbenik rasta (eng. fibroblast growth factor)

GBP -eng. GSK3 β binding protein

GSK3 β - engl.glycogen synthase kinase3 β

G-CSF- čimbenik rasta granulocita (eng.granulocyte-colony stimulating factor)

HER2- humani epidermalni receptor čimbenika rasta (eng.human epidermal growth factor receptor2)

HPV- humani papiloma virus

IHH- eng.Indian hedgehog

IGF- inzulinu sličan čimbenik rasta(eng.insulin like growth factor)

JAK-janus kinaza (eng. Janus kinase)

LGR5-eng. L+leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5

MCH-eng. major histocompatibility complex

NF-Kb- eng.nuclearfactor-kappalight-chain-enhancer of activated B cells

NOD- eng.non-obese diabetic

NSC-neoplastične matične stanice (eng. neoplastic stem cells)

PI3K-eng. phosphatidylinositol-3 kinase

RB1- retinoblastomski protein 1

SCID– eng. severe combined immunodeficiency

SHH- eng. sonic hedgehog

SMO- eng. smoothened

STAT- eng.signal transducer of activation

Tp53- tumor protein 53

TCF4/LEF –eng. T cell factor 4/lymphoid enhanced factor

VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta (eng.vascular endothelial growth factor)

Sažetak

Summary

1.Uvod	1
1.1 Maligni tumori	1
1.1.1 Definicija	1
1.1.2 Epidemiologija	1
1.1.3 Etiologija	1
1.1.4 Biologija tumorskih stanica	2
1.1.4.2 Promjene rasta i preživljavanje tumorskih stanica	4
1.1.5 Metastaziranje	5
1.1.6 Tumorska angiogeneza	7
2.Matične stanice.....	8
2.1. Definicija	8
2.2.Uloga matičnih stanica.....	9
3.Tumorske matične stanice	10
3.1 Definicija	10
3.2 Razvoj koncepta tumorskih matičnih stanica	10
3.2.2 Identifikacija i markeri tumorskih matičnih stanica	11
3.3 Modeli karcinogeneze	12
3.3.1 Hijerarhijski model	13
3.3.2 Stohastički model.....	14
3.4.Regulacija rasta i razvoj tumorskih matičnih stanica.....	16
3.4.1 Uloga citokina	17
3.4.2 Signalizacijski putevi tumorskih matičnih stanica	19
3.4.2.1 Wnt / β katenin put.....	20
3.4.2.2 Notch i BMI signalizacijski put.....	21
3.4.2.3 Hedgehog signalizacijski put.....	23
3.4.3 Uloga mikrookoliša i međustaničnih interakcija.....	26
3.4.4 Uloga hipoksije	27
3.5 Udomljenje i abnormalno širenje tumorskih matičnih stanica	28
4.Zaključak	30
5.Zahvale	31
6.Literatura	32
7.Životopis	37

Sažetak

Maligne karakteristike tumorskih matičnih stanica

Cvijić. V.

Maligni tumori su jedna od najučestalijih bolesti modernoga doba. U Hrvatskoj svaka četvrta osoba oboli od nekoga oblika maligne bolesti. U liječenju malignih tumora koristimo najčešće kiruršku terapiju, kemoterapiju (citostatike), hormonsku terapiju, imunoterapiju i radioterapiju. Usprkos svim tim metodama i visoko razvijenim protokolima liječenja recidivi tumora su česti. Povratak tumora nakon određene terapije najvjerojatnije potječe od zaostalih tumorskih stanica koje nisu uklonjene liječenjem. Jedna od ključnih karakteristika tumora je velika raznolikost tumorskih stanica za koju se vjeruje da je nastala mutacijama i klonskom ekspanzijom pojedinih tumorskih stanica. Rezistencija tumora na ne-kirurške oblike liječenja se upravo pripisuje pojedinim podpopulacijama tumorskih stanica. Terapijska intervencija može djelovati kao selekcijski čimbenik čiji je rezultat ekspanzija rezistentnih klonova. Povrh toga, povratak bolesti nakon terapije može se objasniti i postojanjem posebne podpopulacije tumorskih stanica koje se nazivaju tumorske matične stanice (eng. cancer stem cells ili CSC). Tumorske matične prepoznate su u onkologiji kao važna ciljna. U radu će biti prikazane osnovne karakteristike tumorskih i ne-tumorskih matičnih stanica. Prikazat ću i kratki razvoj modela tumorskih matičnih stanica te pojasniti njihove osnovne karakteristike i ulogu u razumjevanju povrata bolesti i rezistencije na kemoterapeutike. Kratko ću prikazati osnovne markere ovih stanica te potencijalne mete za djelovanje kemoterapeutika. Također ću raspraviti i o važnosti nastavka istraživanja tumorskih matičnih stanica u svrhu prevladavanja izazova na putu ka uspješnom liječenju onkoloških bolesnika.

Summary

Malignant properties of cancer stem cells

Cvijic. V

Cancer is one of the most common diseases of the modern era. In Croatia every fourth person is diagnosed with some form of cancer. In treating cancer most common therapeutic approaches are surgical therapy, chemotherapy, hormonal therapy, immunotherapy and radiotherapy. Even though we have all these methods and highly developed protocols for cancer treatment, relapse often occurs. Relapse after certain therapy approach is more likely to be caused by some cancer cells which have not all been eradicated by treatment. Almost all tumors are composed of a heterogeneous cell population, making them difficult to treat. A small cell subpopulation called cancer stem cells (CSCs) with a low proliferation rate and high tumorigenic potential is thought to be responsible for cancer development, metastasis and resistance to therapy. Cancer stem cells have been recognized as a major target cell population in oncology in recent years, and considerable effort has been made to identify novel CSC markers and target expression profiles as well as to measure the response of these cells to various targeted drugs as curative cancer therapy is effective only when a cancer stem cell subpopulation is completely eradicated. This thesis will discuss main characteristics of normal and cancer stem cells and the role of CSC in tumor relapse and resistance to standard chemotherapy protocols. I will also write about the evolution of the CSC model, potential new therapy targets and the importance of continuing the research on CSCs in order to overcome the challenges to successfully treating oncological patients.

1. Uvod

1.1 Maligni tumori

1.1.1 Definicija

Novotvorine su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Nazivaju se još i neoplazmama ili tumorima (lat. tumor – oteklina). Za maligne tumore rabi se i izraz rak. Maligni tumori rastu brže od benignih tumora, rast im je **infiltrativan** pri čemu razaraju okolno tkivo. Osim lokalnog širenja zloćudni tumori se mogu krvlju i limfom proširiti u udaljene dijelove tijela. Takav način širenja se naziva metastaziranje (grč. metastasis - promjena mjesta) (1).

1.1.2 Epidemiologija

Maligni tumori su jedna od najčešćih bolesti modernog doba. Učestalost svakim danom raste. U 2012. godini je zabilježeno 14,1 milijun novooboljelih pacijenata te 8,2 milijuna smrtnih slučajeva u svijetu. Najčešće dijagnosticirani karcinomi su karcinom pluća (1,82 milijuna), karcinom dojke (1,67 milijuna) i kolorektalni karcinom (1,36 milijuna). Tumori sa najvišom stopom mortaliteta su karcinom pluća (1,6 milijuna smrti) rak jetre (745.000 smrti) i rak želuca (723.000 smrti)(2). U Hrvatskoj svaka četvrta osoba oboli odneke zloćudne bolesti. Pojavnost je prešla 21.000 novooboljelih godišnje, a polovica od toga broja godišnje umre od raka. Najviše ljudi u Republici Hrvatskoj oboli od raka pluća, debelog crijeva i dojke. Ono što je zabrinjavajuće da je stopa pojave raka u Hrvatskoj u porastu (3).

1.1.3 Etiologija

Uzroci tumora su brojni, od čega su tek neki su prepoznati. Tumori mogu biti uzrokovani promjenama gena. Sklonost nastanku nekih tumora nasljedna, što je

uvjetovano postojanjem mutacija. Primjeri takvih tumora su tumori ovojnice perifernih živaca u neurofibromatozi tip 1, tumori debelog crijeva u obiteljskoj adenomatoznoj polipozi. Često spominjani uzroci tumora su egzogeni kemijski i fizikalni karcinogeni, na primjer rak pluća u pušača ili tumori kože uzrokovani ultraljubičastim zrakama. Virusi su također opisani kao etiološki čimbenici, na primjer HPV uzrokuje karcinom vrata maternice; EBV virus ima ulogu u nastanku Burkittovog limfoma (1).

1.1.4 Biologija tumorskih stanica

Glavne karakteristike gotovo svih zloćudnih novotvorina mogu se sažeti u nekoliko **glavnih skupina** koje su prepoznali Hannah i Weiberg (Slika 1) (1,4). Neke od njih su stalan poticaj na staničnu proliferaciju (deregulacijom staničnih čimbenika receptora rasta i njihovim izvanstaničnih čimbenika), izbjegavanje usporavanja proliferacije (dva glavna mehanizma su gubitak funkcije proteina/gena odgovornih za usporavanje stanične diobe/supresori tumorskog rasta) i gubitak kontakne stanične inhibicije rasta). Tumorske stanice također mogu izbjeći programiranu staničnu smrt-apoptozu (pomak ravnoteže između proapoptotskih i antiapoptotskih mehanizama). Opažen je i gubitak ograničenja proliferacije (abnormalna aktivnost telomeraza omogućuje neograničenu replikaciju kromosoma). Tumorske stanice imaju sposobnost razvitka novog krvotoka, invazije, metastaziranja i kolonizacije udaljenih organa. Dodatno, tumori pokazuju još jednu razinu složenosti, a to je skupina unovačenih, naočigled normalnih stromalnih stanica koje doprinose razvoju gore navedenih karakteristika stvarajući **tumorski mikrookoliš** (eng. tumor microenvironment) (5).



Slika 1. Glavne karakteristike tumorskih stanica

Preuzeto iz (4).

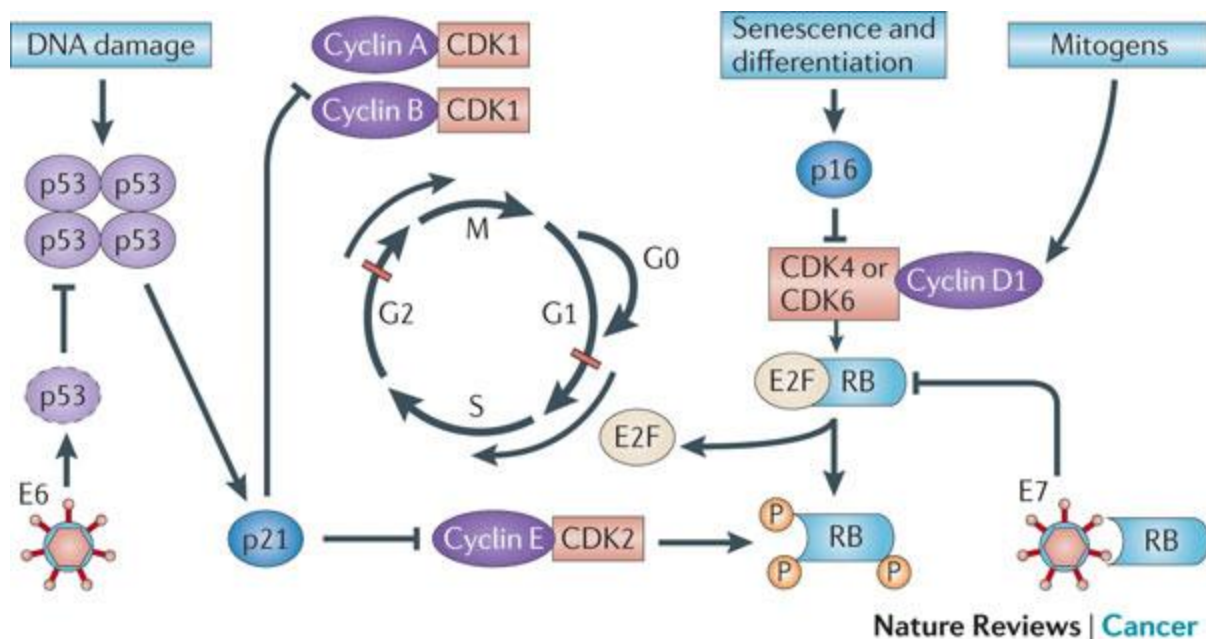
1.1.4.1 Genske promjene

Genske promjene čine bit neoplastične pretvorbe, a mogu se uočiti u benignim i malignim tumorima. Primjerice, svi lipomi imaju tipične kromosomske promjene, budući da se te kromosomske promjene nalaze u svim tumorskim stanicama. Pretpostavlja se da su sve te stanice potekle iz jedne matične tumorske stanice koja je različita od normalnih stanica. Potomci te prvotne matične stanice imaju istovjetan genski ustroj kao i prvotna tumorska matična stanica. Klonalno bujanje je jedna od ključnih značajki svih tumora. Ukupna količina DNA je povećana u jezgrama malignih stanica što se može dokazati kvantitativnim mjerenjem DNA protočnom citometrijom. Citogenetički se mogu dokazati brojne kromosomske abnormalnosti, npr. neke su stanice triploidne ili tetraploidne. Strukturne kromosomske promjene često uključuju

adicije, delecije, translokacije, stvaranje izokromosoma, itd. Genske promjene mogu biti uzrokovane gubitkom, mutacijom ili aktivacijom pojedinih gena, posebice protoonkogeni, normalnih staničnih gena, koji poprimaju funkciju onkogeni i pridonose zloćudnoj pretvorbi stanica. U nekim dolazi do inaktivacije tumor supresorskih gena (1).

1.1.4.2 Promjene rasta i preživljavanje tumorskih stanica

Tumorske stanice često rastu nekontrolirano i slabo reagiraju na vanjske regulatore rasta. Što su stanice manje diferencirane, tumor obično brže raste. Najuočljivije su promjene u regulaciji mehanizma mitoze i apoptoze. U normalnim uvjetima stanice odraslog organizma se ne dijele, nego se nalaze u G0 fazi mitotičkog ciklusa. Tumorske stanice se učestalije uključuju u G1, G2 ili S fazu ciklusa. Te stanice čine **frakciju rasta** tumora. Nakon što stanice uđu u mitozu prelazak iz G1 u S fazu odigrava se u dijelu ciklusa koji se naziva **restrikcijska (R) točka**. Na tom mjestu se provjerava integritet DNA i stanica ulazi u sintetičku fazu tek ako je DNA ispravna. Regulaciju ove kontrole obavljaju ciklini D i E koji aktiviraju čitav niz kinaza ovisnih o ciklinima (CDK). Ovi enzimi fosforiliraju retinoblastomski protein (RB1) pri čemu se oslobađaju proteini iz porodice E2F. Protein E2F promovira prelazak stanice preko R točke, a ako se E2F ne oslobodi zbog djelovanja inhibitora CDK, DNA ozljede ili mutacije, onda se mitozu ne dogodi (Slika 2.). Bitnu ulogu ima i **Tp53**. U normalnim uvjetima on sprječava ulazak u S fazu stanicama koje imaju defektnu DNA. U slučaju inaktivirajuće mutacije, defektni Tp53 ne može djelovati na CDK inhibitore te nestaje kontrola mitotičkog ciklusa. Apoptoza je fiziološki programiran oblik stanične smrti pri kojoj tkiva zadržavaju svoj normalni oblik i obujam. U nekim tumorima prekomjerna ekspresija **BCL2 gena** uzrokuje pojačanu produkciju BCL2 proteina koji je **inhibitor apoptoze**(1).



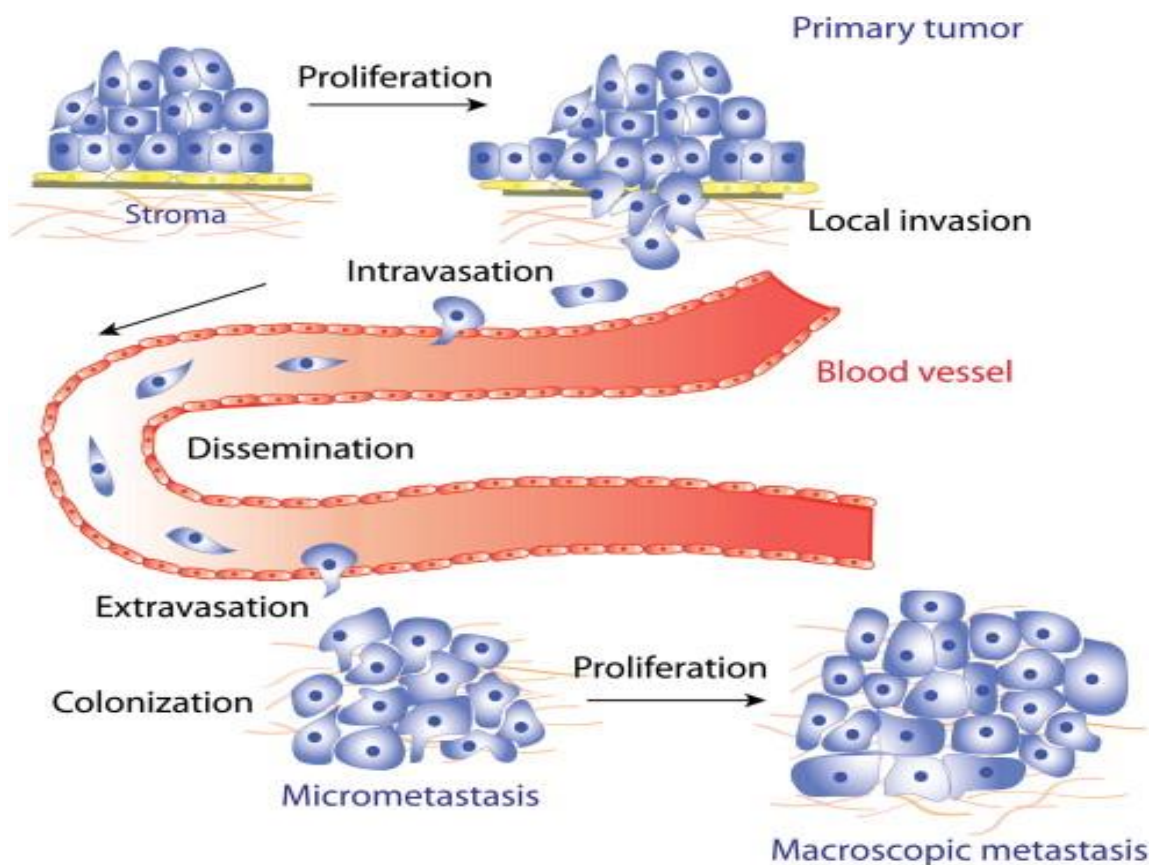
Slika 2. Regulacija mitotičkog ciklusa

Preuzeto iz (6).

1.1.5 Metastaziranje

Metastaziranje tumora je proces pri kojemu se stanice zloćudnog tumora šire u udaljene djelove tijela od mjesta njegova nastanka. Metastaziranje je najpouzdaniji znak da je neki tumor zapravo zloćudan. Iznimka od ovoga pravila opaža se kod zloćudnih tumora mozga koji će zbog svoje intrakranijalne lokalizacije uzrokovati smrt prije nego uspiju metastazirati. Dobročudni tumori **nikada ne metastaziraju**. Širenje zloćudnih novotvorina je složen proces koji se odvija u nekoliko koraka. Relativno dobro su razjašnjeni procesi invazije, cirkulacije te embolizacije prilikom metastaziranja, dok je mehanizam proliferacije stanica u novoj lokaciji slabije objašnjen. Da bi metastaziranje bilo moguće potrebno je da se unutar tumora stvori **klonovi tumorskih stanica koje mogu metastazirati**. Glavna obilježja tih stanica jesu invazivnost i mobilnost. **Invazivnost** se osniva na izlučivanju litičkih enzima koji razgrađuju molekule izvanstaničnog matriksa. **Mobilnost** je osnovana na poboljšanom stvaranju pseudopodija koji tumorskim stanicama omogućavaju prolazak kroz matriks. Čini se da te stanice imaju sposobnost aktivacije makrofaga koji zatim sudjeluju u razgradnji matriksa oslobađajući tako put tim stanicama.

Slijedeći korak jest odvajanje stanica metastatskog klona od glavne tumorske mase i rast prema krvnoj žili, stanice rastu prema krvnoj žili jer iz nje dobivaju kisik i hranjive tvari. Opisani proces se naziva **emigracija**. Nakon emigracije slijedi invazija kroz krvnu žilu te **intravazacija**. Bitnu ulogu u razgradnji bazalne membrane i ostalih molekula izvanstaničnog matriksa imaju enzimi matrične metaloproteaze kao što su kolagenaza tip IV i serinske proteaze kao što je plazmin koji razgrađuje laminin. U normalnim uvjetima u tkivima se nalaze izravni ili neizravni inhibitori tih enzima kao što su inhibitor aktivatora plazminogena i tkivni inhibitor metaloproteaza. Nakon što su tumorske stanice ušle u krvne žile dolaze u kontakt sa trombocitima i čimbenicima zgrušavanja koji pospješuju **agregaciju** stanica u male nakupine i na taj način stanice lakše prežive i odupru se djelovanju imunomehanizama. Skupine tumorskih stanica dopijaju u male krvne žile, gdje se zaustave i zalijepe na endotel kapilara. Bitno je napomenuti da ih većina zapravo ne preživi u cirkulaciji no dovoljno jest da manji broj preživi i stvori novu koloniju. Tumorske stanice će zatim djelovati na endotelne stanice izazivajući njihovu **retrakciju** te djelovanjem litičkih enzima razgraditi bazalnu membranu i dospjeti u međustanični prostor (Slika 3). Čini se da samo neznatan broj stanica koje uđu u tkivo poprimi **proliferativni fenotip**. Poznato je da ga neke tumorske stanice pokažu tek nakon nekoliko godina. Nije potpuno poznato koji čimbenici određuju prelazak iz spavajuće (eng. dormant) u vidljivu metastatsku bolest. Rast tumorskih stanica ovisi o **autokrinim čimbenicima rasta** što ih same luče, ali i čimbenicima rasta u tkivu u koje su se naselile. Da bi si osigurale dovoljno hranjivih tvari i kisika tumorske stanice stimuliraju angiogenezu (1).



Slika 3. Patogeneza metastaziranja

Preuzeto iz (7).

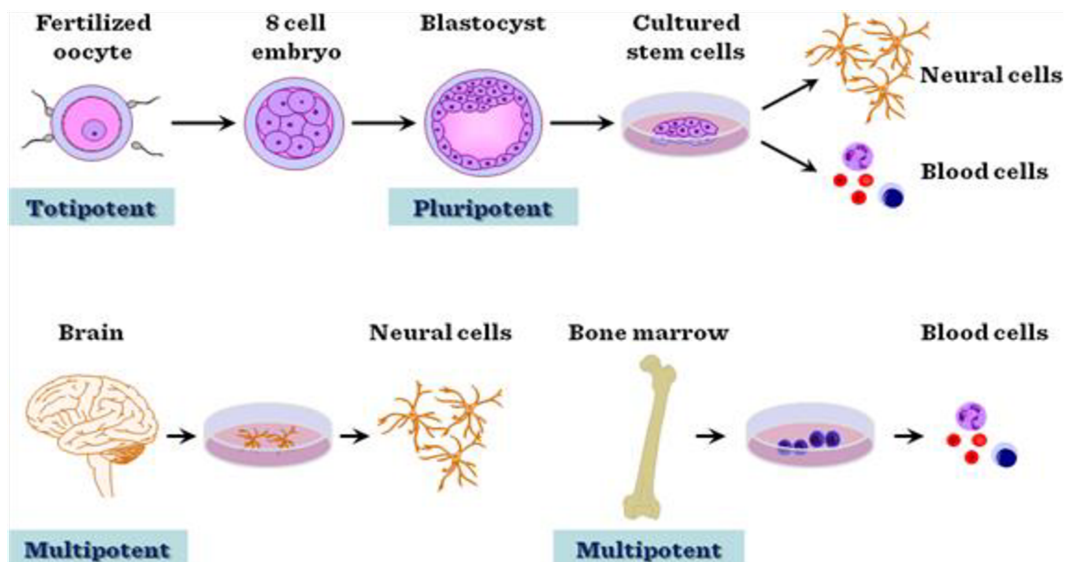
1.1.6 Tumorska angiogeneza

Tumorske stanice ovise o dotoku krvi iz domaćina. Tumori nemaju svoj vlastiti krvotok te tumorske stanice moraju inducirati stvaranje i razvoj krvnih žila u tkivu domaćina. Ova tumorska angiogeneza nalikuje stvaranju krvnih žila u granulacijskom tkivu tijekom cijeljenja rane. **Angiogeneza** nastaje pod djelovanjem čimbenika kao što su angiopoetin i čimbenik koji stimulira rast endotelnih stanica (VEGF). Ti čimbenici su podrijetlom od tumorskih i upalnih stanica posebice makrofaga koje su tumor infiltrirale iz okolnih tkiva (1).

2. Matične stanice

2.1. Definicija

Matične stanice imaju sposobnost neograničenog dijeljenja u kulturi i **samoobnavljanja** te **diferencijacije** u najmanje jedan tip visoko diferencirane stanice(8). Takve sposobnosti imaju zahvaljujući asimetričnoj staničnoj diobi, kojom se proizvodi istovjetna multipotentna jedinka i dodatna progenitorna stanica sa specijaliziranom funkcijom(9). Ovisno o vrstama stanica u koje se mogu diferencirati, matične stanice se mogu podijeliti na totipotentne, pluripotentne, multipotentne i unipotentne. **Totipotentne** matične stanice imaju sposobnost stvaranja bilo koje stanice u tijelu, ali i stanica koje čine ekstraembrionalna tkiva (npr. zigota). **Pluripotentne** matične stanice sposobne su proizvesti sve tipove stanica u tijelu, odnosno sva tri zametna sloja, ali ne mogu proizvesti ekstraembrionalna tkiva (npr. embrionalne stanice). **Multipotentne** matične stanice mogu proizvesti nekoliko vrsta stanica u tijelu (npr. stanice pupkovine), a **unipotentne** samo jednu, (npr. epitelne stanice kože) (Slika 4).

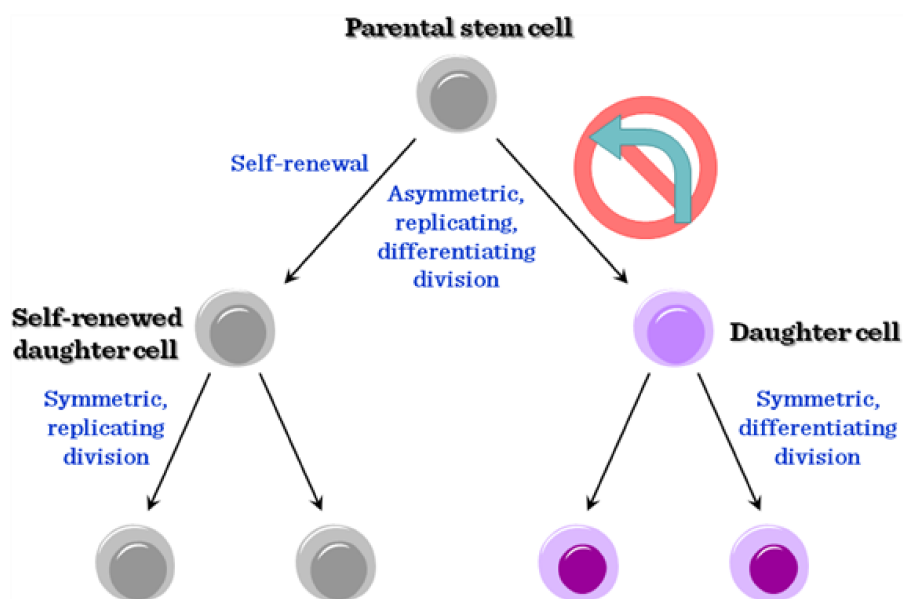


Slika 4. Matične stanice

Preuzeto iz(10).

2.2 Uloga matičnih stanica

U mnogim tkivima matične stanice služe za **obnavljanje** stanica. Dijele se bez ograničenja i zamjenjuju druge stanice za cijelog životnog vijeka organizma. Kada se matična stanica dijeli, svaka stanica potomak može postati ili matična stanica ili diferencirana stanica sa specijaliziranom funkcijom, npr. mišićna stanica, eritrocit ili neuron (**asimetrična dioba**) (Slika 5). U nekim organima poput crijeva ili koštane srži matične se stanice stalno dijele kako bi osigurale popravak oštećenih tkiva. S druge strane u nekim se tkivima matične stanice dijele samo u posebnim okolnostima, kao primjerice u gušterači ili jetri (11). Kada se matične stanice diferenciraju one svakim korakom postaju sve specijaliziranije. **Unutarnji signali** koji utječu na diferencijaciju kontrolirani su genima dok su **vanjski signali** ovisni o mikrookolišu stanice.



Slika 5. Dioba matičnih stanica

Preuzeto iz(10).

3. Tumorske matične stanice

3.1 Definicija

Tumorske matične stanice (CSC) predstavljaju kod brojnih tumora posebnu **podpopulaciju** stanica koja ima sposobnost **samoobnavljanja i klonalne ekspanzije** nasuprot diferenciranijim klonalnim stanicama koji imaju ograničen proliferativni potencijal (12,13). Tumorske matične stanice također pokazuju svojstvo **plastičnosti**- mogu prelaziti između stadija matične stanice i stadija diferenciranije stanice. Sposobne su izbjeći staničnu smrt i metastazirati, iako mogu ostati i u **stadiju mirovanja** (eng. dormant) duže vremena (14). Koncept tumorskih matičnih stanica može pojasniti zašto se maligni tumori nakon terapije vraćaju te zašto se ne postiže dugotrajnija remisija. Opaženo je da citostatici djeluju više na stanice koje su diferenciranije u odnosu na manje diferencirane tumorske matične stanice. Tumorske matične stanice danas su prepoznate kao **velika ciljna skupina stanica** u onkologiji eliminacijom kojih bi se ostvarili bolji rezultati kod terapije malignih tumora (15).

3.2 Razvoj koncepta tumorskih matičnih stanica

Teoriju tumorskih matičnih stanica prvi je opisao Moore 1973 godine (16). Pretpostavlja se da se odrasla matična stanica koja razvije određenu genetsku mutaciju razvije u **izvorišnu tumorsku matičnu stanicu** (eng.cancer stem cell of origin) koja se zatim stjecanjem novih genetskih mutacija razvije u tumorsku matičnu stanicu dovodeći do nastanka malignog tumora (17). Prvi dokazi o postojanju tumorskih matičnih stanica su se pojavili 1997. godine kada su Bonnet i Dick izolirali subpopulaciju leukemijskih stanica koje su bile CD34+ , a CD38-. Utvrdili su da je ta populacija CD34+/CD38- stanica sposobna stvoriti tumorsku masu u NOD /SCID miševima (18). Prilikom istraživanja CSC-a neoplastične stanice se injiciraju intravenski, subkutano ili izravno u ciljane organe pokusnih životinja. Bitno je razlikovati jednostavno održavanje tih presađaka od trajnog primanja presađka koji zapravo upućuje na postojanje samoobnavljajućih tumorskih matičnih stanica (15). Prvi dokazi o postojanju tumorskih matičnih stanica u solidnim tumorima uslijedili su 2002. Godine otkrićem klonalnih stanica izoliranih iz humanih glioma (19). Tumorske

matične stanice su zasada identificirane u tumorima mozga, dojke, kolona, jajnika, prostate, melanoma te multiplog mijeloma (20). Postotak tumorskih matičnih stanica identificiran unutar čitave tumorske populacije nije isti kod različitih tumora, i smatra se da je broj tumorskih matičnih stanica podudaran s prognozom pacijenta. Druga istraživanja su pokazala da tumori koji su histološki isti sadržavaju različit postotak tumorskih matičnih stanica varirajući od 0.03% do približno 100% što upućuje da je broj matičnih stanica zapravo od sumnjive prognostičke vrijednosti. Matične stanice identificirane su raznim tehnikama koje uključuju protutijela za površinske markere kao CD133+. Tumorske matične stanice se sporo dijele te se pretpostavlja da su zaslužne za otpornost tumora na terapiju (21).

3.2.2 Identifikacija i markeri tumorskih matičnih stanica

Postoji nekoliko različitih pristupa koje možemo primijeniti da bismo identificirali i izdvojili populaciju tumorskih matičnih stanica. Široko primjenjivana strategija je uporaba antitijela koji se vežu na određene površinske antigene koji su izraženi na tumorskim matičnim stanicama. Ekspresija antigena se najbolje utvrđuje multicolor protočnom citometrijom. Neki od prepoznatih markera tumorskih matičnih stanica navedeni su u tablici 1. Najbolje je koristiti kombinaciju protutijela kod detekcije i identifikacije tumorskih matičnih stanica. Primjerice CD34 marker je povezan s matičnim stanicama, ali ne nalazi se samo na hematopoetskim matičnim stanicama već i na mastocitima, zametnim stanicama i mijelocitima. Obično se koriste jedan ili dva markera specifična za organ da se potvrdi hematopoetsko podrijetlo stanice ili isključe leukociti u uzorcima dobivenim iz solidnih tumora. Dodatna protutijela se koriste za razlikovanje tumorskih matičnih od diferenciranih stanica. Kod solidnih tumora glavni problem je što markeri za razlikovanje zrelijih i nezrelih stanica nisu dostupni. Kod kolorektalnog karcinoma i nekih drugih solidnih tumora Wnt ciljani gen LGR5 je opisan kao potencijalni marker za tumorske matične stanice. Drugi markeri kao CD44 su izraženi na tumorskim stanicama, ali i na drugim stanicama (leukocitima) koji se nalaze u istom organu. Glavni problem kod prepoznavanja tumorskih matičnih stanica jest njihova plastičnost i heterogenost (15).

Table 1 Cell Surface Phenotypes of Cancer Stem Cells in Different Tumor Types

Tumor Type	Cell Surface Marker on the CSC
Leukemia[18]	CD34+, CD38-, HLA-DR-, CD71-, CD90-, CD117-, CD123+
Breast[7]	ESA+CD44+CD24-/(low)
Brain[19, 20]	CD133+, CD49f+, CD90+
Lung[21,22]	CD133+, ABCG2(high)
Colon[10,23,24]	CD133+, CD44+, CD166+, EpCAM+, CD24+
Pancreatic[25,26]	CD133+, CD44+, EpCAM+, CD24+
Melanoma[11]	CD20+

ABCG2 = ATP-binding cassette subfamily G member 2; CSC = cancer stem cell; EpCAM = epithelial cell adhesion molecule; ESA = epithelial-specific antigen.

Tablica 1. Površinski markeri tumorskih matičnih stanica

Preuzeto iz (22).

3.3 Modeli karcinogeneze

Dugo vremena se smatralo da **intratumorska heterogenost** doprinosi progresiji bolesti, utječe na djelotvornost terapije i na ukupno preživljenje pacijenata. Dva modela, hijerarhijski i stohastički su predloženi za razumijevanje progresije tumora i heterogenosti. Iako ne pridaju jednaku važnost tumorskim matičnim stanicama u progresiji tumora, ova dva modela se međusobno ne isključuju i koncept stanične plastičnosti ih ujedinjuje u jedan model (23). U istraživanju koje su proveli Chafer i suradnici autori su pokazali da tumorske matične stanice kao i normalne matične stanice mogu nastati de novo iz diferenciranih stanica. Ovo otkriće je dodatak hijerarhijskom modelu koji ne uzima u obzir posebni oblik stanične plastičnosti za koju se vjeruje da je posljedica staničnog okoliša (23). Roesch i suradnici su otkrili populaciju stanica (CSC) koja se sporo dijeli te su pokazali da ona može održavati rast melanoma i samobnavljanje (24). Bitno je poboljšati razumijevanje oba modela da bismo dobili bolji uvid u heterogenost i dinamiku različitih subpopulacija stanica u tumoru. Zaključno, glavna razlika stohastičkog i hijerarhijskog modela je da kod stohastičkog svaka stanica tumora ima potencijal da se ponaša kao tumorska matična stanica ako je izložena određenim uvjetima odnosno podražajima dok kod

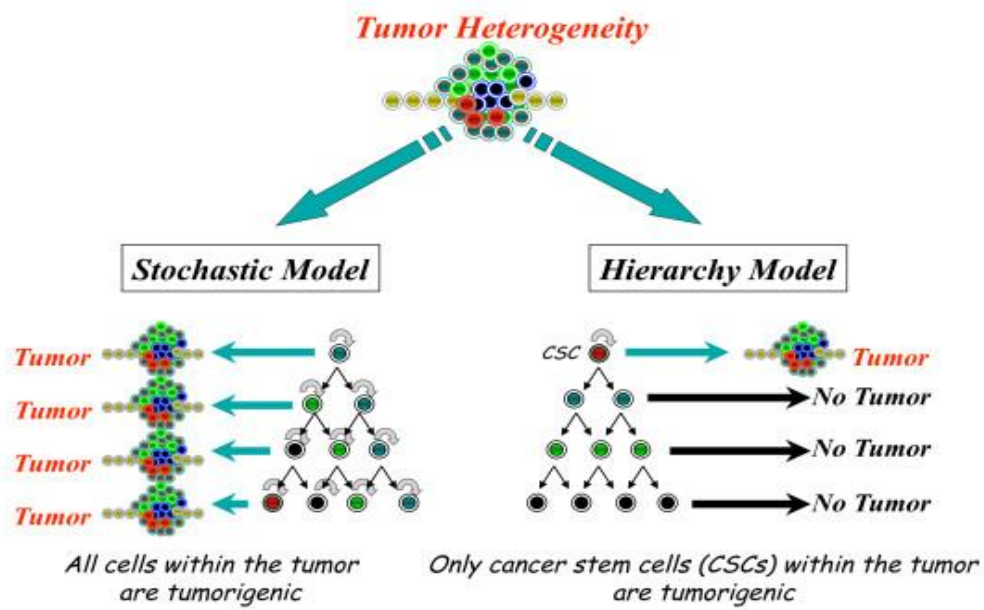
hijerarhijskog modela postoji jedna određena podpopulacija stanica koja ima potencijal da bude tumorska matična stanica(12).

3.3.1 Hijerarhijski model

Hijerarhijski model je prvo prikazan kod akutne mijeloične leukemije (AML) kada je bila prepoznata populacija stanica (leukemijske matične stanice) koja posjeduje sposobnost samoobnavljanja, umnažanja i diferencijacije. Kod solidnih tumora tumorske matične stanice su prvo bile prepoznate kod karcinoma dojke, nakon toga prisutnost tumorskih matičnih stanica je dokazana kod brojnih tumora. Hijerarhijski model predlaže da samo određena skupina stanica (tumorske matične stanice) ima jedinstvenu sposobnost regeneriranja, umnažanja i diferenciranja u druge subpopulacije i dugotrajne sposobnosti stvaranja klonova (eng. clone propagating activity). One se nalaze na vrhu hijerarhije tumorskih stanica (Slika 6), i upravo o njima ovisi **održavanje i propagacija tumora te metastaziranje**. Prema ovom modelu do nastanka malignog tumora dolazi kada matična stanica izbjegne normalne nadzorne mehanizme te nastane tumorska matična stanica, dakle hijerarhijski model pretpostavlja da je da je tumorska matična stanica, stanica podrijetla (eng. cell of origin). Hijerarhijski model predlaže da će samo potpuna eradikacija svih tumorskih matičnih stanica ukloniti i u potpunosti mogućnost relapsa. Tumorske matične stanice **se ne dijele brzo** te to objašnjava dijelom njihovu otpornost na klasičnu kemoterapiju (25). Maligni tumori su obilježeni proliferacijom i ekspanzijom tkiva koja ni anatomski ni funkcionalno ne nalikuju na izvorišni organ; dakle regulacija samoobnavljanja, diferencijacije i proliferacije je poremećena kod tumorskih matičnih stanica. Prema hijerarhijskom modelu iste tumorske matične stanice mogu stvarati različite podtipove tumora unutar određenog organa što dovodi do stanične heterogenosti tumora. Glavno ograničenje ovoga modela jest da ne uzima u obzir mogućnost prelaska između diferenciranog stadija i stadija matične stanice (eng. stem like state) unutar jedne stanice (23).

3.3.2 Stohastički model

Prema stohastičkom modelu svaka stanica unutar tumora ima **jednaku vjerovatnost** da je ishodišna stanica tumora ovisno o intrinzičnim (razina transkripcijskih faktora, singlizacijski putevi) i ekstrinzičnim čimbenicima (mikrookoliš, imunološki odgovor domaćina) i da olakšava inicijaciju i progresiju tumora (Slika 6). Djelovanje ovih čimbenika je nepredvidivo odnosno nasumično te dovodi do heterogenosti kod ekspresije površinskih markera, markera sazrijevanja ili sposobnosti inicijacije tumora. Glavna pretpostavka ovog modela je dakle da su sve stanice **tumora jednako osjetljive** na takve čimbenike te da tumorske stanice mogu prelaziti iz jednog stanja u drugo jer ovi čimbenici ne dovode do trajnih promjena; određena populacija stanica će steći odgovarajući set mutacija i razviti sposobnost progresije i metastaziranja, dakle postati će ishodišne stanice tumora (eng. tumor initiating cells) (25). Stohastički model se oslanja na činjenicu da je rak bolest koja je definirana prekomjernim umnažanjem stanica i stjecanjem mutacija gena staničnog ciklusa što doprinosi klonalnoj ekspanziji u inače normalnim odraslim somatskim stanicama. Napredne tehnike sekvencioniranja genoma pokazale su da je maligni tumor jednoga pacijenta zapravo **heterogena mješavina** genetski različitih subklonova. Iako je mutacijsko opterećenje varijabilno između tipova tumora; tipični tumor sadrži dvije do osam vodećih mutacija koji reguliraju tri glavna stanična procesa: sudbinu stanice, preživljenje i održavanje genoma (23). Većina postojećih terapijskih pristupa jest temeljena na ovome modelu, i usmjerena je na masu tumorskih stanica jer se drži za sve da imaju potencijal biti izvorne stanice tumora, dakle lijekovi djeluju na masu stanica (eng. bulk), a ne na ciljne manje skupine stanica (CSC) (25).



Slika 6 . Modeli karcinogenze

Preuzeto iz (26)

3.4 Regulacija rasta i razvoj tumorskih matičnih stanica

Zasada ne znamo još puno o regulaciji rasta i preživljavanju tumorskih matičnih stanica. Razvojna faza tumorske matične stanice može trajati godinama ako ne i desetljećima. U ranoj fazi (prefazi) razvoja raka tumorske matične stanice mogu biti sporo proliferirajuće stanice koje stvaraju male skupine supklonova. U ovoj fazi razvoja ove stanice zovemo **premalignima neoplastičnim matičnim stanicama** (NSC). Kasnije kada su ove premaligne stanice stekle dovoljan broj mutacija i naučile kako izbjeći normalne nadzorne mehanizme njihove stanice kćeri (eng.progeny) se dijele i stvaraju tumorsku masu, tada te stanice nazivamo tumorskim matičnim stanicama (CSC). Sličnosti i razlike premalignih i malignih tumorskih stanica prikazane su u tablici 2. U toj ranoj fazi razvoja tumorske matične stanice (premaligna faza) mehanizmi i molekule koji reguliraju rast, preživljenje i asimetričnu staničnu diobu mogu biti slični, ako ne i isti kao u normalne matične stanice; to su citokini i njihovi receptori, kemotaktične molekule, receptori za udomljenje, proapoptotičke i antiapoptotičke molekule i signalizacijski putevi koji reguliraju samoobnavljanje i diobu (15).

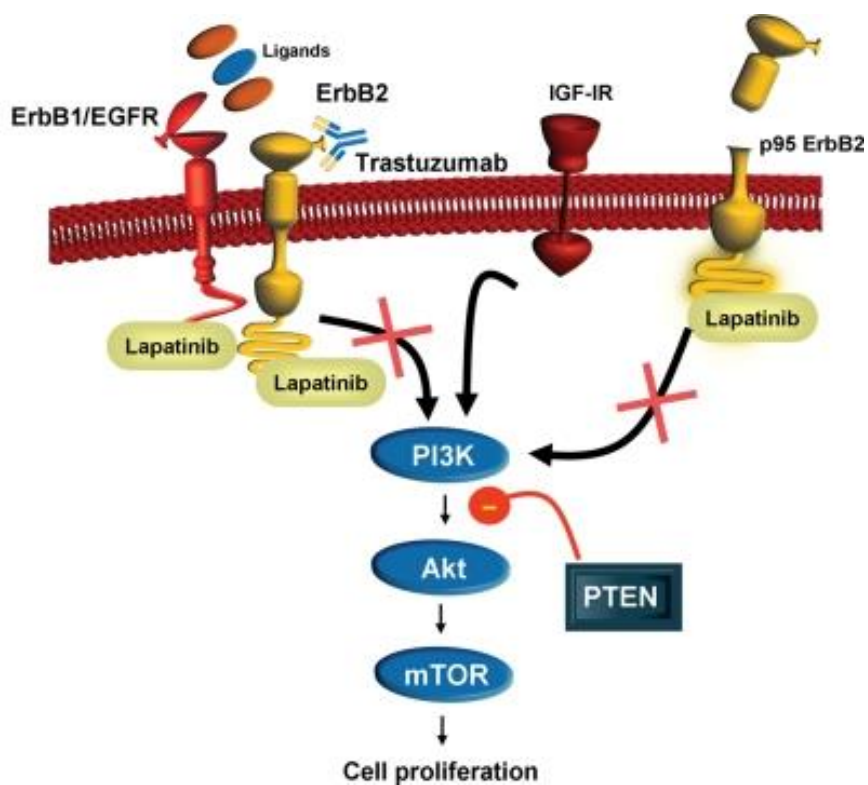
Defining properties	Premalignant NSC	Malignant NSC = CSC/LSC
Self-renewal	Yes	Yes
Cell cycle	Dormant or very slowly cycling	Slowly cycling or more rapidly cycling
Immediate tumor-initiating potential	No ^a	Yes
Long-term tumor-initiating potential	Facultative potential ^a	Yes
Numbers of somatic acquired molecular lesions/ mutations	Relatively low	Relatively high
Drug response	Intrinsic resistance (based in part on quiescence)	Intrinsic and often also acquired resistance in malignant subclones

^aThe potential of a NSC to produce a neoplastic condition does not mean that this cell can form a tumor within a certain time period; however, after a certain latency period, when a sufficient number of molecular lesions have been accumulated, these premalignant NSC may transform to fully malignant NSC (=CSC/LSC) that have immediate tumor-initiating capacity *in vivo* in patients as well as in NSG mice. In a subset of patients, premalignant NSC will never convert into fully malignant NSC (= CSC/LSC). NSC, neoplastic stem cells; CSC/LSC, cancer stem cells/leukemic stem cells.

Tablica 2. Sličnosti i razlike malignih i premalignih matičnih stanica (15)

3.4.1 Uloga citokina

Brojna istraživanja ukazuju na to da je **citokinska mreža** bitna komponenta regulacije rasta, samoobnavljanja, preživljenja i diferencijacije tumorskih matičnih stanica. Opisano je da su receptori porodice epidermalnih faktora rasta uključujući **HER2** izraženi i na epitelnim tumorskim matičnim stanicama (15). HER 2 (eng. human epidermal growth factor receptor) je član ErbB porodice transmembranskih receptorskih tirozin kinaza. Njegova ekspresija je povećana kod 20 - 30 % slučajeva invazivnih karcinoma dojke. HER2 signalizacijski put je složena mreža koja se sastoji od membranskih receptora i njihovih liganda, protein kinaza te regulatornih gena koji utječu na brojne stanične funkcije kao što su preživljenje stanica, proliferacija stanica te aktivacija brojnih transkripcijskih puteva. U normalnim tkivima je ekspresija HER2 membranskog proteina niska. Povećana ekspresija je opažena kod karcinoma dojke, jajnika i želuca. Bitan korak nakon dijagnoze karcinoma dojke jest odrediti HER2 status ne bi li se karcinom mogao uspješnije liječiti. Karcinomi koji imaju povećanu ekspresiju HER 2 osjetljiviji su na doksorubicin i otporniji na hormonalnu terapiju. Također se kod pacijentica s HER2 pozitivnom metastatskog bolesti koriste brojni anti HER 2 lijekovi kao što su humanizirana monoklonska protutjela **Trastuzumab** i **Pertuzumab** i inhibitor tirozin kinaze **Lapatinib** (27) (Slika 7). IGF (eng. insulin like growth factor) i FGF (eng. fibroblast growth factor) receptori imaju također bitnu ulogu kod solidnih tumora te su često izraženi na tumorskim matičnim stanicama. Klinički bitno pitanje je da li tumorske ili leukemijske matične stanice sadrže receptore za EPO, G-CSF iz razloga jer su upravo ti citokini često primjenjivani u sklopu terapije anemije vezane uz bolest ili neutropenije koja je posljedica kemoterapije. Primjerice kod akutne mijeloične leukemije, mijelodisplastičnog sindroma, leukemijske matične stanice eksprimiraju receptore za G-CSF, ali nisu opaženi receptori za EPO, ali kod tumorskih matičnih stanica u nekim tumorima (npr. melanom) opažena je ekspresija receptora za eritropoetin (15).



Slika 7. Ciljna mjesta i mehanizam djelovanja Lapatiniba i Trastuzumaba

Preuzeto iz (28).

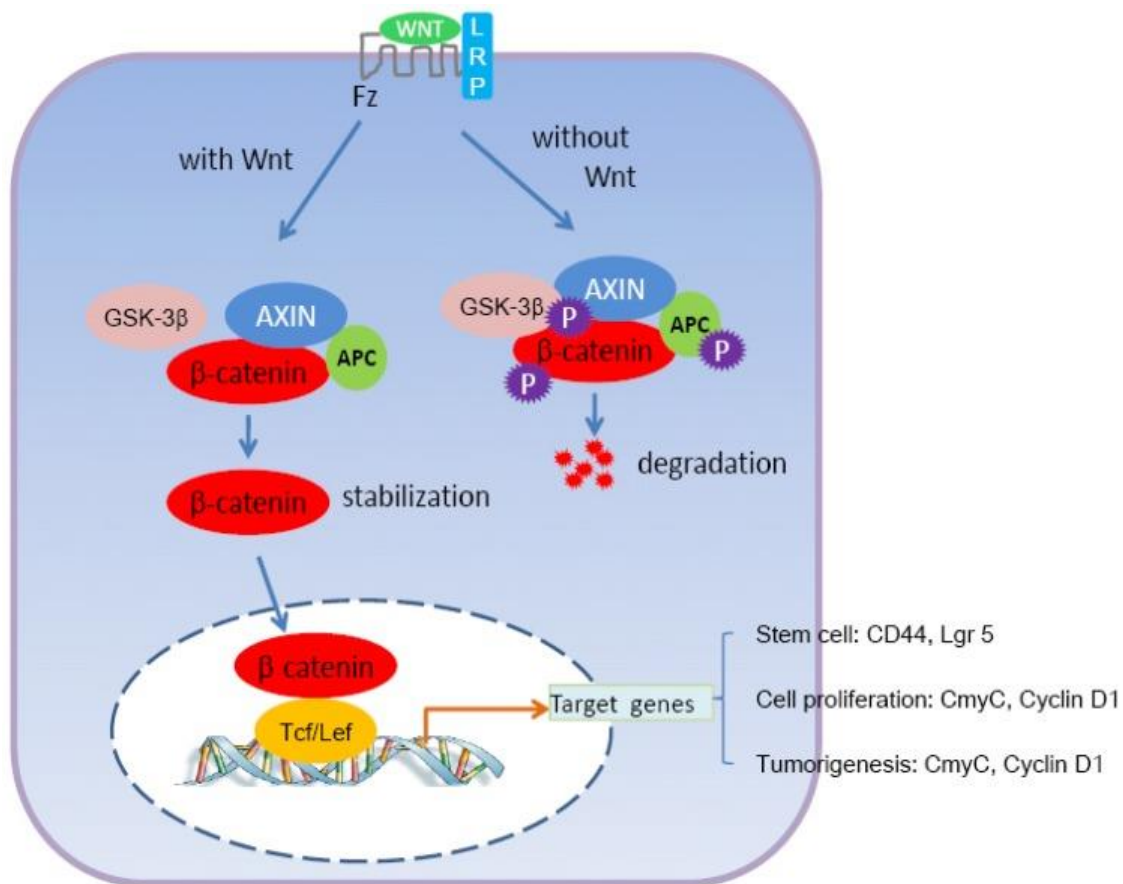
3.4.2 Signalizacijski putevi tumorskih matičnih stanica

Rast, funkcija, sposobnost samoobnavljanja i maligne ekspanzije neoplazmatskih matičnih stanica regulirani su složenom mrežom signalnih kaskada i molekula. Onkogenska signalizacija potječe od tri različite skupine molekula. Prva skupina su vodeće (eng.driver) lezije, odnosno primarne onkogenske kinaze koje su često specifične za neku bolest kao što je to slučaj sa BCR/ABL kod kronične mijeloične leukemije. Druga skupina i treća skupina jesu široko eksprimirane mutirane onkogenske kinaze te citokinima aktivirane kinaze matičnih stanica koje imaju ulogu u rastu i / ili preživljenju neoplazmatske matične stanice. Nizvodna signalizacijska mreža te tri navedene skupine često se preklapa te nadopunjuje ponekada ostvarujući sinergistički učinak na nizvodnu aktivaciju i onkogenezu. U ranom stadiju razvoja malignih tumora vodeća mutacija i ostali inače fiziološki mehanizmi mogu imati vodeću ulogu. Međutim kako bolest napreduje sve više onkogenih signalnih molekula i puteva postaje aktivno, dakle u uznapredovalom stadiju maligne bolesti, dodatne signalne kaskade i mreže sve više dobivaju na važnosti kod ekspanzije i razvoja otpornosti tumorskih matičnih stanica. Sve tri opisane skupine molekula smatramo potencijalnim ciljnim mjestima za djelovanje kemoterapeutika kod solidnih tumora i leukemija. Unatrag zadnjih 15 godina neke vodeće mutacije kinaza (eng.driver kinases) su prepoznate kao glavni ciljevi terapije. Najistaknutiji primjer jest korištenje inhibitora BCR/ABL tirozin kinaze kod kronične mijeloične leukemije koji dovode od značajnog i dugotrajnog odgovora na terapiju. Bitno je napomenuti da tumorske (neoplazmatske) matične stanice ne mogu biti u potpunosti eradikirane uporabom ovih lijekova jer one često prežive i rastu neovisno o glavnoj vodećoj mutaciji što je u ovom slučaju BCR/ABL tirozin kinaza. Nova istraživanja su usmjerena na otkrivanje dodatnih molekularnih lezija i signalnih puteva ne bi li se otkrila nova potencijalna ciljna mjesta djelovanja kemoterapeutika. Brojni novi putevi za koje je dokazano da imaju ulogu kod preživljavanja i održavanja tumorskih matičnih stanica su otkriveni no njih često dijele i normalne matične stanice (15).

3.4.2.1 Wnt / β katenin put

U ljudi postoji 19 gena iz Wnt porodice koji kodiraju evolucijski sačuvane **glikoproteine - ligande**. Wnt signalni put se sastoji od heterodimernog receptora koji je sastavljen od dva tipa transmembranskih proteina na koje se vežu pozitivni ili negativni regulatori staničnog rasta. Ukoliko se vežu pozitivni regulatori, dolazi do translokacije β -katenina u jezgru i aktivacije obitelji o β -kateninu ovisnih transkripcijskih faktora dok vezivanje negativnih regulatora inhibira ovaj proces. Jedan od negativnih regulatora Wnt signalnog puta je proteinski produkt gena **DACT2** (eng. dishevelled binding antagonist of beta catenin 2) koji djeluje kao tumor supresor, stoga je njegova ekspresija smanjena u kolorektalnom karcinomu i karcinomima želuca. WNT put se aktivira putem membranskih receptora Frizzled. Aktivirani receptor u suradnji s LRP5 (engl. low-density lipoprotein receptor related protein 5) aktivira citoplazmatski protein „dishevelled” (od eng. dishevel = stvaranje nereda), koji skupa s GBP (eng. GSK3 β binding protein) inhibira GSK3 β kinazu (eng. glycogen synthase kinase-3 β) (29). GSK3 β kinaza sastavnica je multiproteinskog kompleksa koji se sastoji još od aksina, , konduktina, β -katenina i kazein kinaze II (CKII), koji ima ulogu kod dvostupanjskefosforilacije i posljedične razgradnje β -katenina putem ubikvitinsko-proteasomskog sustava (UPS). Inhibicijom GSK3 β kinaze dolazi do stabilizacije β -katenina, što rezultira njegovim gomilanjem u staničnoj jezgri, stvaranjem kompleksa β -katenina s transkripcijskim čimbenikom TCF4/LEF (eng. T cell factor 4/lymphoid enhanced factor) te konačno pokretanja procesa transkripcije 20-ak različitih gena uključenih u procese staničnog razmnožavanja, apoptoze i metastaziranja. **β -katenin**, osim **aktivacije transkripcije**, ima ulogu i u stabilizaciji međustaničnih spojeva, služeći kao prenosnica između E-kadherina i aktina (30). β -katenin direktno inhibira transkripcijski čimbenik NF- κ B, čime se inhibira niz unutarstaničnih procesa uključenih u apoptozu (31). Wnt/B kateninski put ima ulogu kod održavanja i samoobnavljanja neoplazmatskih matičnih stanica kod leukemija, melanoma te karcinoma dojke, pluća i jetre. Trenutno se razvijaju novi lijekovi koji bi djelovali na izvanstanične Wnt ligande i njihove receptore. Kako cijeli mehanizam signalizacije još uvijek nije potpuno poznat, potrebna su daljnja istraživanja i klinička ispitivanja koja bi dala strategije kojima bi se moglo specifično djelovati na pojedine mutacije ili vrste tumora (32). Budući je Wnt signalizacija uključena u održavanje homeostaze

matičnih stanica i regeneraciju tkiva, posebice u gastrointestinalnom epitelu, epitelu kože i dlačnim folikulima, posljedica djelovanja na tumorske stanice je i znatna nespecifična toksičnost za zdrave stanice, zbog čega su potencijalne nuspojave ozbiljne (33).



Slika 5. Wnt signalni put

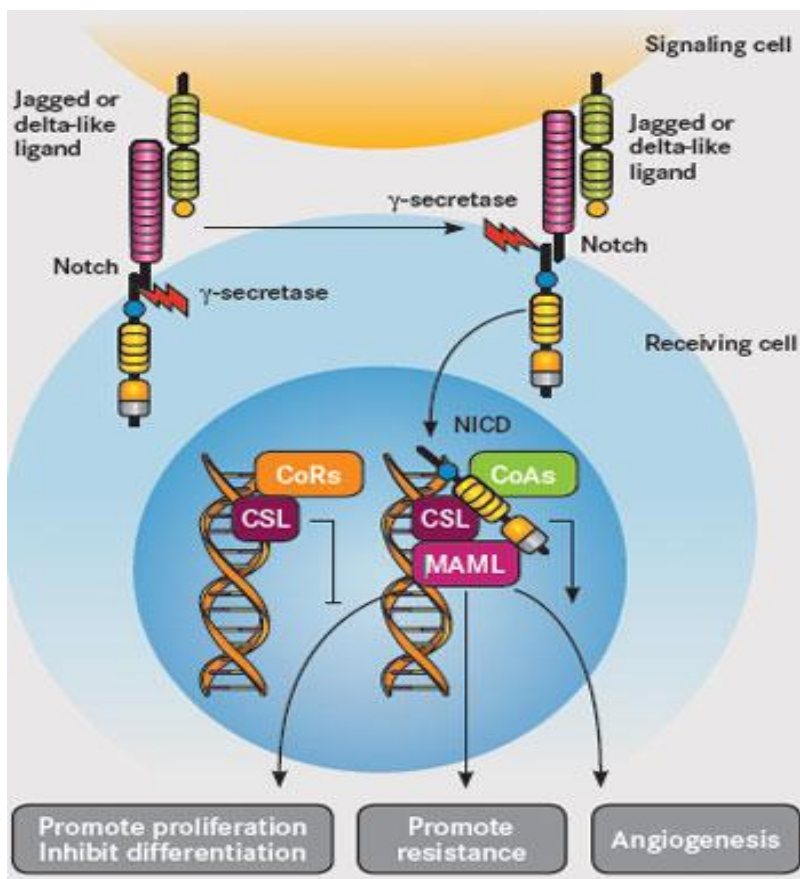
Preuzeto iz (34).

3.4.2.2 Notch i BMI signalizacijski put

Notch signalni put je bitan čimbenik samoobnavljanja kod karcinoma dojke, kolona, glioblastoma, melanoma, adenokarcinoma pluća, jajnika, prostate, endometrija i jednjaka (15). U mnogim tumorima opisana je prekomjerna ili konstitutivna ekspresija **Notch signalnoga puta**, kao posljedica pogrešne regulacije. Notch signalizacija uključena je u određivanje stanične sudbine tijekom embriogeneze i kod odraslih tkiva (35). Ima ulogu u održavanju populacije matičnih (progenitorskih) stanica, ali i u

održavanju ravnoteže između proliferacije, diferencijacije i apoptoze stanica (36). Neodgovarajuća aktivacija dovodi do nastanka signala koji **stimuliraju proliferaciju** stanica, dovode do ograničene diferencijacije i spriječavanja apoptoze tumorskih stanica (37) (Slika 8). Dodatno, deregulacija Notch signalizacijskog puta je povezana sa mobilizacijom i širenjem primarnih tumorskih stanica na udaljene lokacije. Primjerice, kod karcinoma dojke tumorske stanice često metastaziraju u kosti i u mozak gdje tkivni mikrookoliš pojačava metastatski rast tih tumorskih stanica sekrecijom faktora rasta i liganda koji aktiviraju brojne puteve koji su bitni za metastaziranje kao što su to između ostalih Notch, Wnt i Hedgehog. Također je pokazano kako je Notch važan u procesu angiogeneze. Progresivni razvoj i metastaziranje karcinoma uvelike ovise o vaskularnoj opskrbi hranjivim tvarima (38). Notch signalizacijski put pridonosi preživljavanju malignih stanica što rezultira **lošijom prognozom** za pacijente. Notch signalni put dakle ima bitnu ulogu i kod normalnih i tumorskih matičnih stanica. Jednom aktiviran s ligandom, Notch receptor se premješta u jezgru i veže se sa DNA – vežućim proteinima započinjući kaskadnu transdukciju u stanici. Notch signalizacijski put je jedan od najčešće proučavanih ciljnih mjesta djelovanja lijekova kod ciljanja tumorskih matičnih stanica jer su one populacija stanica koje su otporne na standardne metode liječenja kao što su kemoterapija i zračenje, ali su **osjetljive na inhibiciju** signalizacijskih puteva kao što je to Notch signalni put te je razvijeno nekoliko Notch inhibitora, Notch inhibitori mogu poboljšati odgovor na kemoterapiju; dodatno bitno je odrediti koji pacijenti mogu imati najviše koristi od takvog tipa terapije, dakle bitno je definirati **pouzdanе biomarkere** koji mogu mjeriti aktivnost Notch signalizacijskog puta kod tumorskih matičnih stanica (38).

Bitno je napomenuti da Notch ima dvojnu prirodu i ovisno o tipu stanica, staničnom okruženju i opsegu aktivacije (39) može djelovati kao i **tumor supresor**. Biološke osobitosti tog signalnog puta objašnjavaju ovo svojstvo, budući da Notch signalizacija kao takva sudjeluje u diferencijaciji u jednim tkivima, a održavanju fenotipa matičnih stanica u drugima. Tumor supresorska uloga primjećena je kod nekih neuroendokrinih tumora i sitnostaničnog karcinoma pluća, (40).



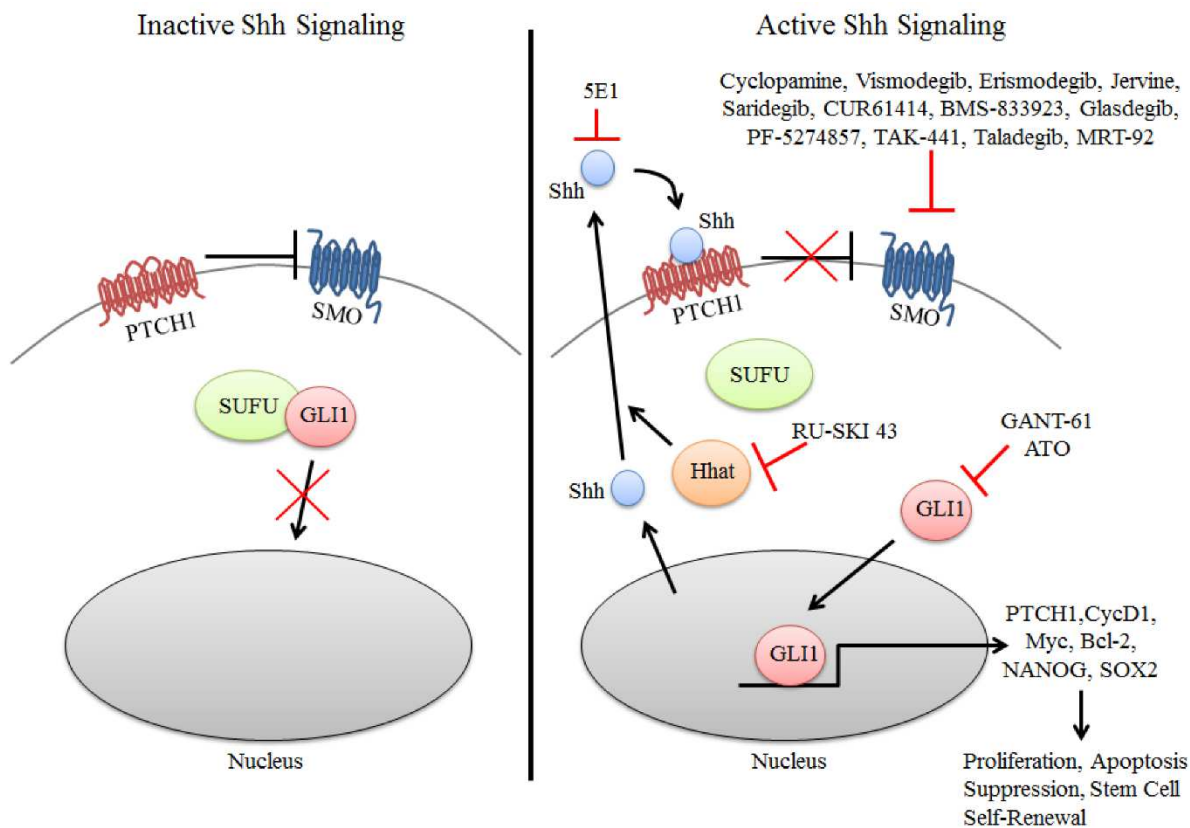
Slika 8. Uloga Notch signalizacijskog puta kod malignih tumora

Preuzeto iz (41).

3.4.2.3 Hedgehog signalizacijski put

Tijekom normalnog razvoja, Hh signalni put sudjeluje u proliferaciji stanica, polarnosti tkiva i njihovoj diferencijaciji u različite organe. U odrasloj dobi djeluje kao regulator aktivnosti matičnih stanica, stimulirajući samoobnavljanje u mnogobrojnim tkivima. Kod sisavaca postoje **tri Hedgehog gena** koji kodiraju za ligande: sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH) i desert hedgehog (DHH) od kojih svaki ima karakterističnu ulogu. Oni su eksprimirani u različitim tkivima u različitim stadijima razvoja organizama. IHH se povezuje sa diferencijacijom hrskavice dok je DHH povezan sa razvojem zametnih i Schwannovih stanica. SHH je razvojni morfogen u ljudi uključen u formiranje gradijenta koji određuje razvoj udova centralnog živčanog sustava, aksijalnog skeleta i važan je signal tijekom razvoja probavila u kralježnjaka (21). Ukoliko ligandi nisu prisutni, signalni je put inaktiviran. Vezanjem bilo kojeg od

ova tri liganda na transmembranski proteinski receptor Patched (Ptch) dolazi do aktivacije signalne kaskade (51). Prestaje inhibicija drugog transmembranskog receptora i proto-onkoproteina *smoothed* (Smo) i dolazi do otpuštanja i translokacije transkripcijskih faktora Gli (Gli1, Gli2 i Gli3) koji posjeduju domenu s cinkovim prstima u jezgru. Tamo dolazi do aktivacije ciljanih gena koji utječu na proliferaciju i preživljavanje stanica (42). Slika 9. prikazuje aktivaciju Hh puta. Gli1 i Gli2 djeluju kao aktivatori, dok Gli3 djeluje uglavnom kao represor. Gli transkripcijski faktori djeluju na mnoge nizvodne gene, među kojima su VEGF koji sudjeluje u angiogenezi, transformirajući faktor rasta, ciklini i drugi, od kojih neki djeluju kao onkogeni (43). **Hedgehog** signalni put ima ulogu kod **samoobavljanja** u brojnim malignim bolestima kao što su karcinom dojke, karcinom kolona, glioblastom, karcinom gušterače, leukemija, meduloblastom i bazocelularni karcinom. Aberantna aktivacija ovog signalnog puta dovodi do razvoja malignih tumora transformirajući adultne matične stanice u tumorske. Signal s hedgehog receptora se nizvodno prenosi signalnim molekulama, a većina tih molekula je trenutno predmet istraživanja (21) (Slika 9). Mnogi inhibitori Hh signalnog puta, poput **Vismodegib-a** i **Sonigegib-a** danas se koriste u liječenju karcinoma te predstavljaju obećavajuću skupinu lijekova posebice u pacijenata s lošom prognozom (Slika 9) (44). Pokazalo se kako inhibicija Hh signalnog puta djeluje suprimirajuće na rast tumorskih stanica, njihovu sposobnost invazije okolnih tkiva i staničnu pokretljivost. Također dovodi do indukcije programirane stanične smrti i de-diferencijacije(42). **Vismodegib** je oralni inhibitor Hh signalnog puta i najdalje je dospio u kliničkim istraživanjima. Početna klinička istraživanja kod bazocelularnog karcinoma i meduloblastoma su bila uspješna te je lijek odobren u SAD-u za liječenje uzapredovalih stadija bazocelularnog karcinoma. Detaljni mehanizmi djelovanja Hh signalizacije još uvijek su nepoznati i zahtijevaju daljnja istraživanja. Budući da u različitim tipovima tumora ovaj signalni put može biti aktiviran različitim mehanizmima, razumijevanje specifičnog djelovanja u određenim tumorima može pomoći kod odabira optimalne strategije liječenja putem inhibicije signalnog puta (44).



Slika 9. Pojednostavljeni prikaz Hedgehog signalizacijskog puta

Preuzeto iz (45).

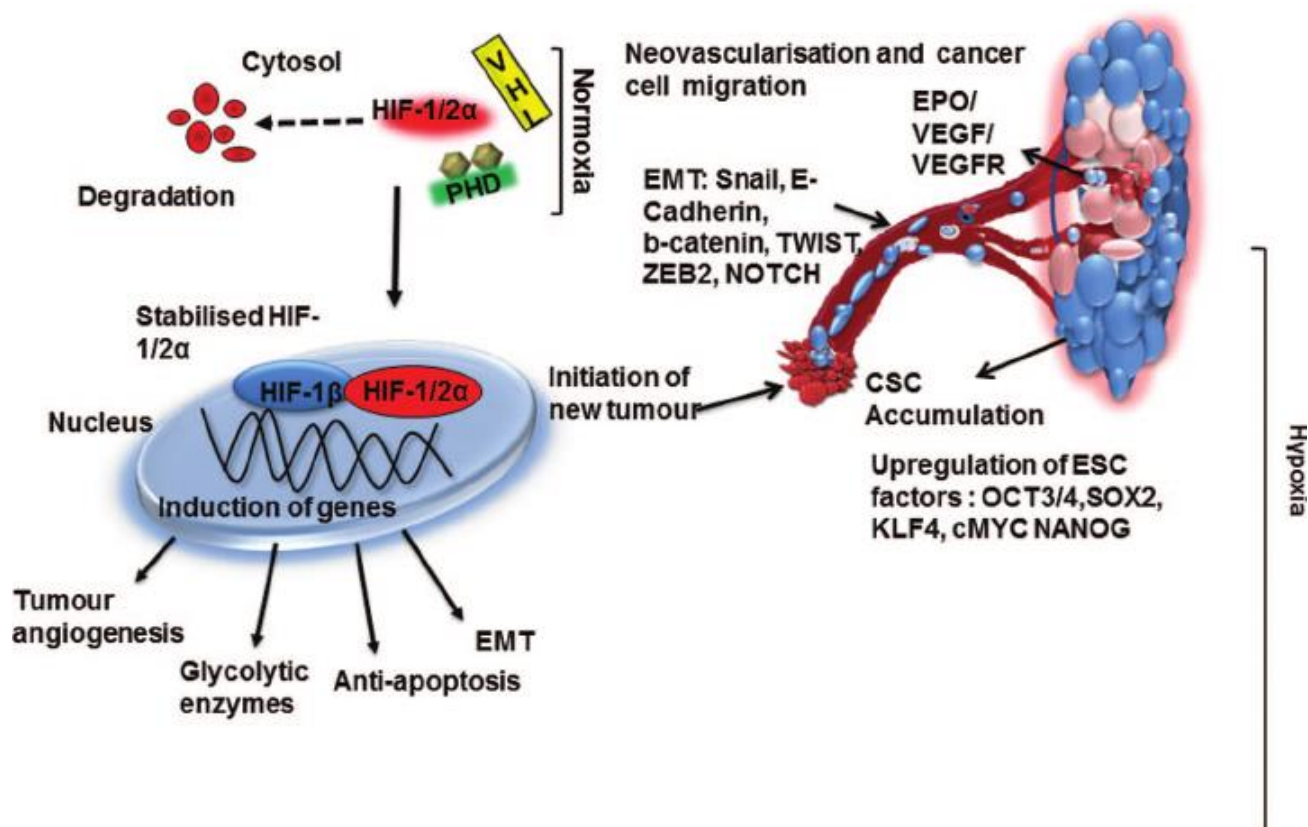
Bitno je još spomenuti **BMI-1 signalni put** koji je povezan sa samoobnavljanjem i diferencijacijom humanih matičnih stanica. Najznačajniji učinci su povezani s hematopoezom, razvojem skeleta i živčanog sustava. Pojačana ekspresija i amplifikacija BMI-1 signalnog puta otkrivena je u brojnim malignim bolestima poglavito leukemijama i limfomima. Druge studije povezuju BMI-1 signalni put sa gliomima, nazofaringealnim karcinomima i tumorima jajnika. Nedavno pronađena je poveznica između Hedgehog signalnog puta i BMI-1 gena kod malignih tumora dojke, bazocelularnog carcinoma, meduloblastoma i karcinoma jednjaka. Predloženo je da je kod karcinoma dojke BMI-1 gen prisutan kod nizvodne signalizacije Hh puta (21). Signalni putevi za koje se još vjeruje da bi mogli biti važni kod preživljavanja, diobe i diferencijacije tumorskih matičnih stanica jesu PI3 kinaza mTOR put, RAS-RAF-MEK-EKR put i JAK STAT (15).

3.4.3 Uloga mikrookoliša i međustaničnih interakcija

Ovisno o stadiju razvoja i tipu maligne bolesti rast i samoobnavljanje tumorskih matičnih stanica se oslanjaju na **permisivni mikrookoliš**. U normalnim uvjetima matične stanice se nalaze u posebnom mikrookolišu (eng. stem cell niche) koji ima ulogu u regulaciji održavanja i samoobnavljanja i diferencijacije matičnih stanica sekrecijom parakrinih čimbenika ili direktnim kontaktom (eng. cell to cell). U ranom stadiju razvoja maligne bolesti mikrookoliš može regulirati rast i samoobnavljanje premalignih neoplazmatskih stanica na sličan način kao i normalnih matičnih stanica. Dakle, tumorske matične stanice također se nalaze unutar svog mikrookoliša (eng. cancer stem cell niche) koji ima ulogu u održavanju populacije tumorskih matičnih stanica. Molekule koje imaju bitnu ulogu kod interakcije mikrookoliša i tumorskih matičnih stanica jesu adhezijske molekule, kemotaktični faktori, citokini i receptori faktora rasta. Bitne komponente tumorskog mikrookoliša jesu još vezivne stanice, imunosne stanice i izvanstanični matriks. Bitno je napomenuti da su tumorske stanice sposobne izbjeći **imunosti nadzor** tj. citotoksično djelovanje NK i CD8+ limfocita privlačenjem imunosupresivnih stanica, proizvodnjom imunosupresivnih faktora i aktivacijom imunosnih kontrolnih točaka (eng. immune checkpoints) koje dovode do anergije i apoptoze T limfocita. Ekspresija MCH -1 i MCH -2 proteina koji su neophodni za prepoznavanje od strane T-limfocita je kod tumorskih matičnih stanica smanjena. Također, hipoksija i gradijent kalcija mogu doprinijeti interakciji tumorskih matičnih stanica i okoline i samoobnavljanju matičnih stanica u normalnim i (pre)malignim uvjetima. Nabrojani čimbenici skupno održavaju matičnost (eng. stemness) tumorskih matičnih stanica svojim utjecajem na signalizacijske puteve koji reguliraju samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju, kao što su Wnt B katenin, Hedgehog ili Notch (15,25).

3.4.4 Uloga hipoksije

Kisik je bitan regulator staničnog metabolizma, preživljavanja i diobe stanica. U uvjetima smanjene koncentracije kisika kao odgovor stanice na hipoksiju povećava se **aktivnost inducibilnih faktora hipoksije (HIF)**. Hipoksija je kod malignih tumora posljedica brzog rasta tumorskih stanica za čiji metabolizam dostupna opskrba kisikom više nije dostatna. HIF-ovi reguliraju brojne signalne puteve vezane uz glikogenolizu, angiogenezu, apoptozu i invaziju (Slika 10.). U solidnim tumorima područja hipoksije su široko rasporstana zbog abnormalne vaskularizacije i područja nekroze (46). HIF1 α i HIF2 α su ključni posrednici kod učinaka hipoksije u malignih tumora (47). Zasad se malo zna kojim točno mehanizmom hipoksija regulira samoobnavljanje i proliferaciju tumorskih matičnih stanica. Hipoksija promiče matičnost aktivacijom gena i de-diferencijacijom. Povećana ekspresija HIF-ova povezana je u konačnici sa lošijim ishodom, otpornosti na kemoterapiju i agresivnijim fenotipom tumora. Dakle hipoksični mikrokoliš kao ciljno mjesto djelovanja kemoterapije može povećati uspješnost liječenja eliminirajući subpopulaciju tumorskih matičnih stanica. Hipoksične tumorske matične stanice koče proliferaciju i aktivaciju i inhibiraju imunonadzor CD8⁺ limfocita. Hipoksija štiti tumorske matične stanice od kemoterapije i radioterapije i olakšava preživljavanje tumorskih matičnih stanica putem signalnih puteva aktiviranih reaktivnim spojevima kisika (eng. reactive oxygen species, ROS) (23). Bitno je uočiti da hipoksija povećava ekspresiju ne samo HIF-ova već i nekoliko citokina koji reguliraju rast i angiogenezu primjerice SDF-1 ili VEGF. Navedeni citokini potiču tumorsku angiogenezu. Važno je istaknuti da hipoksija može potaknuti stvaranje ROS-a u neoplazmatskim matičnim stanicama što dovodi do lomova DNA i **povećava mutagenezu** potičući stvaranje malignijih supklonova. Zaključno, hipoksija može biti okidač onkogeneze i maligne progresije kao i otpornosti tumorskih matičnih stanica. Hipoksija također potiče podpopulaciju tumorskih stanica koje imaju invazivni metastatski fenotip i sposobnost metastaziranja (23).



Slika 10. Učinci hipoksije kod tumorskih matičnih stanica

Preuzeto iz (48).

3.5 Udomljenje i abnormalno širenje tumorskih matičnih stanica

Udomljenje ili utkivljenje (eng. homing) matičnih stanica je fiziološki proces. Primjerice hematopoetske matične stanice se mogu izolirati iz periferne krvi i podliježu procesu udomljenja u brojnim organima. U većini solidnih organa matične stanice ne prolaze proces redistribucije i udomljenja osim ako se ne transformiraju u metastazirajuće tumorske matične stanice. Metastaziranje i invazija tumorskih matičnih stanica je složeni proces. Kod solidnih tumora bitnu ulogu imaju citoadhezijski receptori uključujući integrine, selektine, CD44 ili članove kadherinske obitelji. Većina ovih receptora za udomljenje uključujući kemokinske receptore i ligande molekula matriksa kao što su L1 ili CD44 su otkriveni na tumorskim matičnim

stanicama. L1 je eksprimiran na rubovima invazivnog karcinoma kolona i njegovih metastaza. Isto vrijedi i za CD44 i CD133 što upućuje da ove molekule imaju ulogu kod invazije i progresije bolesti. Za vrijeme progresije bolesti tumorske matične stanice prestaju biti ovisne u interakcijama sa specifičnim mikrokolišem te se šire u druge organe (metastaziranje). U epitelnih tumora redistribucija tumorskih matičnih stanica je olakšana **epitelno-mezenhimalnom tranzicijom(EMT)**, procesom koji je povezan sa gubitkom specifičnih adhezijskim veza između stanica karcinoma i okoline. L1 i E-kadherin su povezani sa procesom epitelno mezenhimalne tranzicije kod solidnih tumora (15). Pretpostavlja se da se metastatske tumorske matične stanice jednostavno razviju iz tumorskih matičnih stanica koje su evoluirale kroz progresiju tumora (23). Osobine potrebne za samo metastaziranje razlikuju od onih koje su bitne za pojavu metastatske bolesti mjesecima ili godinama kasnije. **Stadij mirovanja** je ključan problem kod povrata bolesti i metastatskog širenja maligne bolesti nakon dugih perioda latencije ,primjerice kod melanoma,karcinoma dojke i leukemije. Budući da se stanice koje su u stadiju mirovanja **jako sporo dijele** (eng. proliferatively quiescent) radi čega prežive kemoterapiju što dovodi do relapsa. Zaključno , malo se zna o tome na koji točno način mikrokoliš regulira izlazak iz stadija mirovanja, o signalizacijskim putevima koji su tada aktivni te to i dalje ostaje problem koji je potrebno riješiti da bismo uspješnije liječili oboljele od malignih tumora (23).

4. Zaključak

Tumorske matične stanice predstavljaju podpopulaciju stanica unutar tumora koje imaju sposobnost samoobnavljanja, diferencijacije i tumorigeneze. Koncept tumorskih matičnih stanica kao ishodišnih stanica tumora je danas široko prihvaćen. Bitnu ulogu u regulaciji svojstava tumorskih matičnih stanica ima citokinska mreža, hipoksija i mikrookoliš. Iako još ne postoje odgovori na brojna pitanja o signalnim putevima i svojstvima tumorskih matičnih stanica, brojna istraživanja ukazuju na to da je terapija kurativna samo kada su tumorske matične stanice u potpunosti eradicirane. U zadnjih nekoliko godina razvijeni su novi protokoli liječenja koji su usmjereni na tumorske matične stanice s ciljem ostvarenja boljih rezultata kod liječenja onkoloških pacijenata. Zbog sličnosti signalnih puteva tumorskih i normalnih matičnih stanica nuspojave tih lijekova često su ozbiljne te je potrebno nastaviti istraživanja s ciljem otkrivanja lijekova sa selektivnijim djelovanjem na tumorske matične stanice. Terapija usmjerena isključivo na tumorske matične stanice nije dovoljna da spriječi relaps i metastaziranje. Samo kontinuirani razvoj i kombinacija kemoterapeutika i ostalih oblika liječenja koji djeluju na različita ciljna mjesta može dovesti do poboljšanja preživljenja i boljih ishoda liječenja pacijenata s malignim tumorima uz manje nuspojave. Trenutačni terapijski protokoli kontroliraju proliferaciju stanica i rast tumora, ali ne eliminiraju u potpunosti sve stanice jer se tumorske matične stanice sporo dijele, preživljavaju te dovede do relapsa.

5.Zahvale

Puno hvala mentoru doc.dr. Filipu Sedliću , na strpljenju, pristupačnosti i odličnim i konstruktivnim prijedlozima koji su omogućili i uvelike olakšali nastanak ovoga diplomskog rada. Jednako tako zahvaljujem i članovima komisije prof.dr.sc Maji Sirotković Skerlev i prof.dr.sc Jasenki Markeljević na vremenu uloženom u čitanje i ocjenjivanje ovoga rada.

Zahvaljujem se i svim profesorima i docetima sa Katedre za patofiziologiju koji su me zainteresirali za ovo područje medicine i proširili uvelike moje znanje o brojnim temama.

Na posljetku , veliko hvala mojim roditeljima Ranku i Mirjani bez kojih ne bih bila ovdje gdje jesam, na moralnoj i financijskoj potpori, razumijevanju te poglavito strpljenju i svim poticajima koje su mi pružili kroz život i školovanje.

6. Literatura

1. S. Jukić, M. Nola, I. Damjanov, Z. Gatalica, S. Seiwert Novotvorine In: PATOLOGIJA 4. 4th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. p. 149–91.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* [Internet]. 2015;136(5):E359-386. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>
3. (<http://www.onkologija.hr/sto-je-rak/>).
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74.
5. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. Vol. 14, *Cell Stem Cell*. 2014. p. 275–91.
6. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(1):9–22. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2982>
7. Saxena M, Christofori G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. Vol. 7, *Molecular Oncology*. 2013. p. 283–96.
8. Watt FM, Hogan BLM. Out of eden: Stem cells and their niches. Vol. 287, *Science*. 2000. p. 1427–30.
9. KG S, MT L. Stem cells: Review and update. *Arch Surg* [Internet]. 2004;139(1):93–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.139.1.93>
10. Bartis D, Pongrácz J. Three dimensional tissue cultures and tissue engineering. *Univ Pecz*. 2011;11.
11. (<http://stemcells.nih.gov>).
12. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. In: *Cancer Research*. 2006. p. 9339–44.

13. Nguyen L V, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev cancer*. 2012;12(2):133–43.
14. Kreso A, O'Brien CA, Van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AMK, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* (80-). 2013;339(6119):543–8.
15. Schulenburg A, Blatt K, Cerny-Reiterer S, Sadovnik I, Herrmann H, Marian B, et al. Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: can we translate into clinical application? *J Hematol Oncol* [Internet]. 2015;8(1):16. Available from: <http://www.jhoonline.org/content/8/1/16>
16. Moore MAS, Williams N, Metcalf D. In Vitro Colony Formation by Normal and Leukemic Human Hematopoietic Cells: Characterization of the Colony-Forming Cells. *J Natl Cancer Inst*. 1973;50(3):603–23.
17. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* [Internet]. 2006;66(4):1883-90-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16488983>
18. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730–7.
19. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002;39(3):193–206.
20. (https://en.wikipedia.org/wiki/Cancer_stem_cell).
21. Ciurea ME, Georgescu AM, Purcaru SO, Artene S-A, Emami GH, Boldeanu MV, et al. Cancer stem cells: biological functions and therapeutically targeting. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014;15(5):8169–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821540>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4057726>
22. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park)*. 2014;28(12):1101–1107,1110.
23. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? Vol. 16, *Cell Stem Cell*. 2015. p.

- 225–38.
24. Roesch A. Melanoma stem cells. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft* [Internet]. 2015;13(2):118–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ddg.12584>
 25. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112(13):4793–807.
 26. Chandler JM, Lagasse E. Cancerous stem cells: Deviant stem cells with cancer-causing misbehavior. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(2).
 27. Dedić Plavetić N, Kulić A, Vrbanec D. Role of HER2 signaling pathway in breast cancer: Biology, detection and therapeutical implications. *Period Biol*. 2012;114(4):505–10.
 28. Vogel, Charles , arlene chan B gril. Management of ErbB2-positive Breast Cancer: Insights from Preclinical and Clinical Studies with Lapatinib. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;
 29. Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. Vol. 205, *Journal of Pathology*. 2005. p. 130–44.
 30. Roura S, Miravet S, Piedra J, García De Herreros A, Duñachl M. Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1999;274(51):36734–40.
 31. Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, et al. β -catenin interacts with and inhibits NF- κ B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell*. 2002;2(4):323–34.
 32. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. Vol. 36, *Oncogene*. 2017. p. 1461–73.
 33. Novellasdemunt L, Antas P, Li VSW. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2015;309(8):C511–21. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpcell.00117.2015>

34. Sun J. Enteric bacteria and cancer stem cells. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2010;3(1):285–97. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/1/285/htm>
35. Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*. 2013;34(7):1420–30.
36. Miyamoto S, Nakanishi M, Rosenberg DW. Suppression of colon carcinogenesis by targeting notch signaling. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2415–23.
37. Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L. Rational targeting of Notch signaling in cancer. Vol. 27, *Oncogene*. 2008. p. 5124–31.
38. Espinoza I, Pochampally R, Xing F, Watabe K, Miele L. Notch signaling: Targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. Vol. 6, *OncoTargets and Therapy*. 2013. p. 1249–59.
39. Qiao L, Wong BCY. Role of notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(12):1979–86.
40. Dumont AG, Yang Y, Reynoso D, Katz D, Trent JC, Hughes DP. Anti-tumor effects of the Notch pathway in gastrointestinal stromal tumors. *Carcinogenesis*. 2012;33(9):1674–83.
41. (<https://www.onclive.com/publications/oncology-live/2013/february-2013/notch-signaling-tackling-a-complex-pathway-with-a-new-generation-of-agents>).
42. Liao X, Siu MKY, Au CWH, Wong ESY, Chan HY, Ip PPC, et al. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: Effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis*. 2009;30(1):131–40.
43. Dormoy V, Béraud C, Lindner V, Coquard C, Barthelmebs M, Brasse D, et al. Vitamin D3 triggers antitumor activity through targeting hedgehog signaling in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2012;33(11):2084–93.
44. Gupta S, Takebe N, Lorusso P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2010;2(4):237–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789137>

45. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: Review of smoothed and GLI inhibitors. Vol. 8, *Cancers*. 2016.
46. Heddleston J, Li Z, Lathia J, Bao S, Hjelmeland A, Rich J. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2010;102:789–95.
47. Li Z, Rich JN. Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;345(1):21–30.
48. Philip B, Ito K, Moreno-Sánchez R, Ralph SJ. HIF expression and the role of hypoxic microenvironments within primary tumours as protective sites driving cancer stem cell renewal and metastatic progression. Vol. 34, *Carcinogenesis*. 2013. p. 1699–707.

7. Životopis

Imam 24.godine i rođena sam 27.09.1993 u Ljubljani. Pohađala sam OŠ Ljudevita Gaja Nova Gradiška potom sam završila Opću gimnaziju Nova Gradiška također sa odličnim uspjehom. Sudjelovala sam na županijskim natjecanjima iz biologije i engleskoga jezika te državnom natjecanju iz prve pomoći. U 2012. godini sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te ga završavam u roku 2018. godine s odličnim uspjehom. Bila sam demonstrator na kolegijima Medicinska biologija i Pedijatrija. Već treću godinu sam demonstrator na kolegiju Patofiziologija. Tečno govorim engleski jezik , a služim se njemačkim i španjolskim. Bila sam na kulturnoj razmjeni u SAD-u 2016. U slobodno vrijeme bavim se trčanjem, treniram za polumaratone, a volim i putovati.