

Značajke matičnih stanica tumora: biološka funkcija i terapijski pristup

Katić, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:527435>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Značajke matičnih stanica tumora: biološka funkcija i terapijski pristup
Cancer stem cells characteristics: Biological function and therapeutic strategies

SEMINARSKI RAD

Matea Katić

Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: prof.dr.sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2020.

POPIS KRATICA

ABCG2- engl. *ATP-binding cassette transporter G2*; ATP-vezujući prijenosnik G2

ALDH- alkohol dehidrogenaza

AML- akutna mijeloična leukemija

ALL- akutna limfocitna leukemija

bFGF-engl. *basic fibroblast growth factor*; bazični čimbenik rasta fibroblasta

CAF,CAFs- engl. *cancer-associated fibroblast/s*; tumoru pridružen fibroblast/i

CD- *cluster of differentiation*; molekule staničnih površinskih biljega

CSC, CSCs- engl. *cancer stem cell/s*; matične tumorske stanice, tumorske inicirajuće stanice

DHh-engl. *Desert Hedgehog ligand*

DLL1, 2, 4- engl. *delta like ligand (1,2,4)*

DNMT- DNA metiltransferaze

ECM- engl. *extracellular matrix*; izvanstanični matriks

EGF- engl. *epidermal growth factor*; epidermalni čimbenik rasta

FGF- engl. *fibroblast growth factor*; fibroblastni čimbenik rasta

HDAC- engl. *Histone deacetylases*; histonske deacetilaze

HGF-engl. *Hepatocyte growth factor*; hepatocitni čimbenik rasta

HK-1, 2- heksokinaza 1,2

IHh- engl. *Indian Hedgehog ligand*

IL-1, 6, 8- interleukin 1, 6, 8

MHC-I, II- engl. *major histocompatibility complex*; molekule glavnog kompleksa tkivne snošljivosti

MMP- matriks-metaloproteinaze

NECD- engl. *Notch extracellular domain*; Notch izvanstanična domena

NICD- engl. *Notch intracellular domain*; Notch unutarstanična domena

NOD/SCID- engl. *Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency*

PDGF- engl. *Platelet-derived growth factor*; tromboplastni čimbenik rasta

PDK 1- engl. *Pyruvate Dehydrogenase Kinase*; piruvat dehidrogenazna kinaza 1

ROS- engl. *reactive oxygen species*; reaktivne kisikove vrste

SC, SCs- engl. *stem cell/s*; matične stanice, zdrave matične stanice, normalne matične stanice

SCID- engl. *severe combined immunodeficiency*

SHh- engl. *Sonic Hedgehog ligand*

TAM, TAMs- engl. *tumour associated macrophages*; tumoru pridruženi makrofagi

TAN, TANs- engl. *tumour associated neutrophils*; tumoru pridruženi neutrofili

TGF- β - engl. *Transforming growth factor beta*; transformirajući čimbenik rasta beta

TME- engl. *tumor microenvironment*; tumorski mikrookoliš

TNBC- engl. *Triple-negative breast cancer*; trostruko negativni karcinom dojke

TNF- α -engl. *tumor necrosis factor alpha*; čimbenika tumorske nekroze alfa

Tregs- T- regulatorne stanice

VEGF- engl. *Vascular endothelial growth factor*; čimbenika rasta krvožilnog endotela

VEGFR2- engl. *Vascular endothelial growth factor receptor 2*; receptor čimbenika rasta krvožilnog endotela

Mojem najboljem Prijatelju.

Hvala Ti što me neumorno pratiš na mom putu.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. DVA MODELA HETEROGENOSTI TUMORA.....	2
2.1. Klonalni evolucijski (stohastički) model.....	2
2.2. Model matičnih stanica tumora (CSC model).....	3
2.2.1. CSCs i SCs-sličnosti i razlike.....	5
3. CSCs- PROMJENJENE MATIČNE ILI DEDIFERENCIRANE TUMORSKE STANICE?6	
4. METODE IZOLACIJE I KLASIFIKACIJE CSCs.....	7
4.1. Metoda sortiranja stanica na temelju površinskih biljega.....	8
4.2. Metoda izolacije i identifikacije CSCs formiranjem klonova ili sferoida.....	9
4.3. „Side-population“ metoda.....	9
4.4. Metoda izolacije i identifikacije CSCs bazirana na aktivnosti ALDH.....	10
5. BIOLOGIJA MATIČNIH STANICA TUMORA I OSNOVNI CILJEVI U TERAPIJI.....	10
5.1. Imunološke značajke CSCs i ciljevi u terapiji.....	10
5.2. Epigenetske karakteristike CSCs i ciljevi u terapiji.....	11
5.3. Signalni putevi- glavne mete ciljane terapije.....	12
5.3.1. Hedgehog signalni put.....	12
5.3.2. Notch signalni put.....	13
5.3.3. Wnt/ β -katenin signalni put.....	15
5.4. Metabolizam tumorskih matičnih stanica.....	16
6. ULOGA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA U REGULIRANJU FENOTIPA CSCs.....	16
6.1. Utjecaj imunoloških stanica na TME.....	18
6.2. Utjecaj tumoru pridruženih fibroblasta na TME.....	18
6.3. Utjecaj ECM na TME.....	18
6.4. Utjecaj hipoksije i tumorske mikrovaskulature na TME.....	19
7. ZAKLJUČAK.....	20
8. LITERATURA.....	21
9. SAŽETAK.....	24
10. SUMMARY.....	25

1. UVOD

Maligna oboljenja često nazivamo bolestima modernog čovjeka. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije 2018. godine utvrđeno je više od 18 000 000 slučajeva oboljenja od malignih bolesti sa smrtnim ishodom kod više od 9 500 000 ljudi diljem svijeta. Ne čudi stoga pojačano zanimanje znanstvene zajednice za upoznavanjem molekularno-bioloških obrazaca malignih tumora u cilju smanjenja smrtnosti od istih te unaprjeđenja preventivnih tehnika koje uključuju rano otkrivanje malignih oboljenja i široku edukaciju o štetnim čimbenicima koji mogu biti direktan uzrok pojavnosti malignih oboljenja ili promotori u njihovom stupnjevitom napretku.

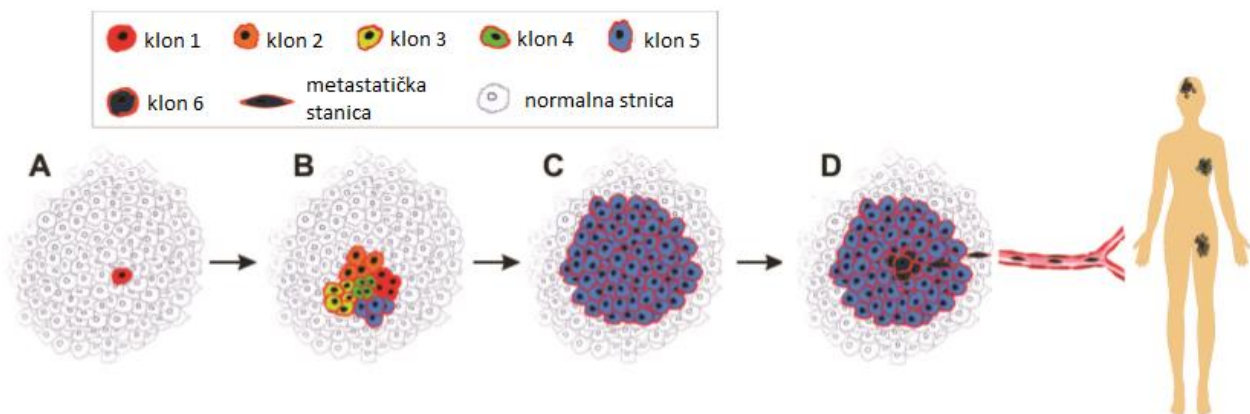
Tumor je heterogena nakupina koja se sastoji od promijenjenih tumorskih stanica (transformirane ili neoplastične stanice), potpornih stanica (stromalnih, endotelnih, imunoloških) te kompleksne mreže izvanstaničnog matriksa¹. Ovakva neoplastična heterogena tvorba nastaje višestupanjskim procesom koji uključuje tri osnovne faze: inicijaciju, promociju i progresiju, popraćene kompleksnim i dinamičnim staničnim događajima². Glavnu snagu malignog tumora predstavljaju prilagodbe malignih stanica na konstitutivno proliferativno signaliziranje, izbjegavanje supresorskih signala za rast, izbjegavanje programirane stanične smrti, indukciju angiogeneze te aktivnu invazivnost i metastaziranje u druga tkiva³.

Dva su modela koja predlažu nastajanje maligne tvorbe. Prvi model odnosi se na klonalni evolucijski model dok drugi predlaže nastajanje tumorske mase modelom matičnih stanica tumora (CSCs)¹. Matične tumorske stanice odnose se na stanice unutar tumorske mase koje posjeduju kapacitet samoobnavljanja i formiranja heterogenih linija tumorskih stanica koje sačinjavaju ostatak tumorske mase⁴ te se smatraju pokretačkom snagom tumorogeneze i metastaziranja, ali i razlogom otpornosti tumora na antitumorsku terapiju⁵.

2. DVA MODELA HETEROGENOSTI TUMORA

2.1. Klonalno-evolucijski (stohastički) model

Prema klonalno-evolucijskom modelu, mutacije u individualnim tumorskim stanicama predstavljaju platformu za adaptaciju i selekciju najpogodnijeg klon tumorskih stanica ⁶ (Slika 1.). Prema tome ovaj model objašnjava heterogenost unutar tumora kao rezultat prirodne selekcije. Oni klonovi koji steknu prilagodbe ubrzanog rasta nadvladat će ostale klonove lošijeg fitnesa te će prevladati u ukupnoj tumorskoj masi. Akumulirane prednosti koje jedan klon postiže u odnosu na drugi klon stanica mogu znatno varirati ovisno o mikrookolišu tumora. Tako neki klonovi mogu biti pod pritiskom hipoksičnih uvjeta te se „izabiru“ one stanice koje su akumulirale dostatne mutacije za preživljavanje takvog okoliša. Tijekom višestupanjskog procesa tumorogeneze odnos klonova u tumorskoj masi može se mijenjati prostorno i vremenski što rezultira u kompleksnoj subklonalnoj arhitekturi tumorske mase¹.

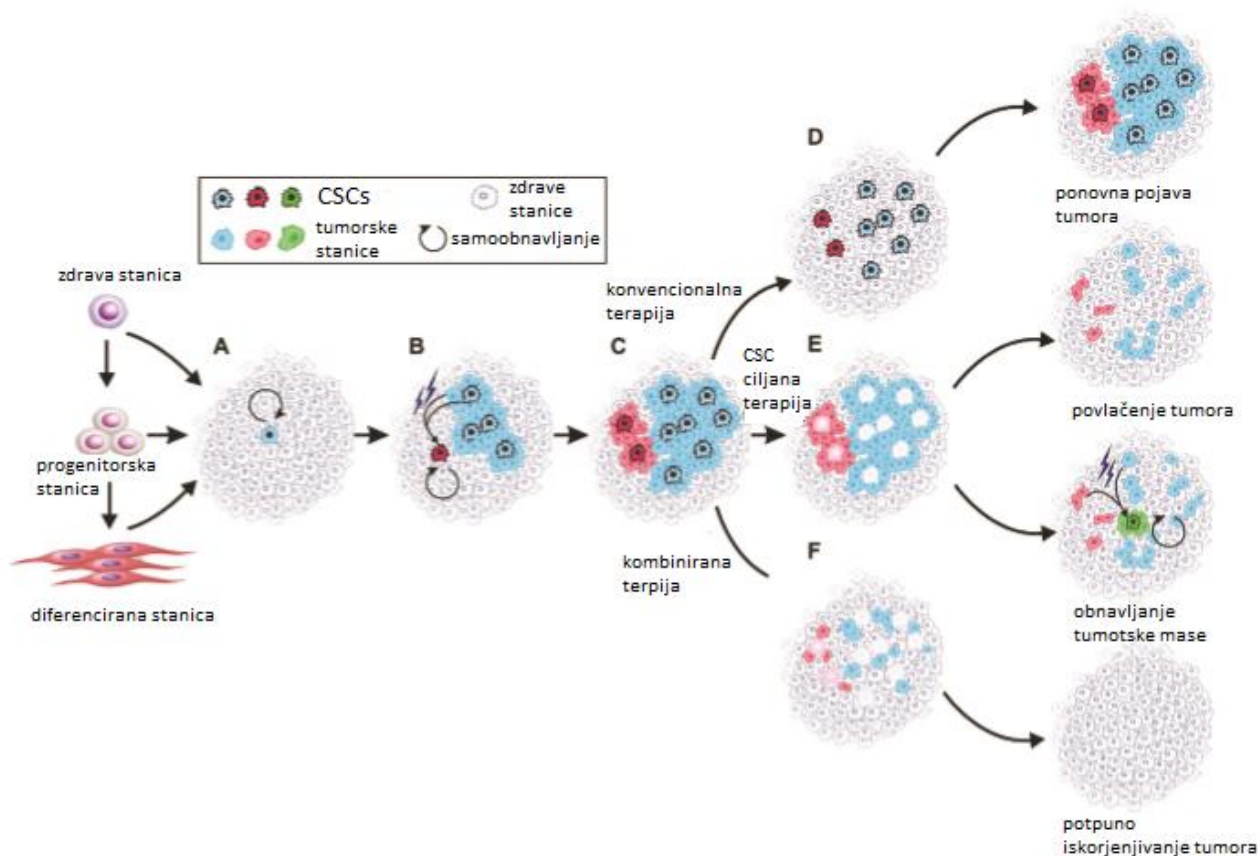


Slika 1. Shematski prikaz klonalno-evolucijskog modela. Svaka tumorska stanica posjeduje sličan tumorogenični kapacitet, a proces tumorogeneze prati Darwinovu teoriju evolucije. **A-** transformacija normalne stanice (označena crvenom bojom) u tumorsku stanicu procesom inicijacije uzrokovane radijacijom, kemijskim karcinogenima ili onkogenim virusima, čime stječe selektivnu prednost u odnosu na okolne stanice. **B-** tumorska stanica proliferira te producira stanični klon (klon 1) i u isto vrijeme, zbog genetičke nestabilnosti, brojne nove klonove (klon 2, 3, 4, 5). **C-** oni klonovi koji ne mogu preživjeti selektivni pritisak mikrookoliša su eliminirani, a onaj klon koji akumulira dovoljno prilagodbi preživljava (klon 5) te dalje proliferira. **D-** procesom tumorske progresije akumuliraju se nove mutacije što dovodi do stvaranja novog klona stanica (klon 6) s agresivnim fenotipom, koji uzrokuje metastaziranje. Preuzeto i prilagođeno iz ⁶.

2.2. Model matičnih stanica tumora (CSCs model)

U posljednjih 20 godina brojna istraživanja pokazala su kako samo mala subpopulacija tumorskih stanica posjeduje tumorsku inicijacijsku snagu te da upravo ta subpopulacija stanica čini ishodište tumorogeneze⁷. Iako su već 1963. godine Bruce i Van Der Gaag prvi dokumentirali da postoji mali broj stanica mišjeg limfoma koje su sposobne formirati kolonije u slezeni⁴ prvi moderni dokaz o ulozi tumorskih matičnih stanica dolazi iz 1994. godine i istraživanja akutne mijeloične leukemije (AML). AML- inicirajuće stanice identificirane su na temelju površinskih biljega (CD34⁺/CD38⁺) nakon transplantacije u imunokompromitiranog (SCID) miša⁸. Tim istraživanjem prvi puta je dokazano da samo određena frakcija tumorskih stanica ima iznimno visoku moć samoobnavljanja što je glavna karakteristika upravo CSCs⁹. Daljnja istraživanja usmjerila su se na dokazivanje tumor-inducirajućih stanica u solidnim tumorima što je dovelo do identifikacije CSCs u tumorima dojke i mozga (u dva nezavisna istraživanja provedena 2003. godine). Do danas, model tumorskih matičnih stanica dokazan je kod tumora debelog crijeva, dojke, gušterače, pluća, prostate, melanoma te glioblastoma⁸.

Ilustracija ovog značajnog modela tumorogeneze prikazana je na Slici 2. CSCs model tumorogeneze predstavlja hijerarhijski model- vrlo mala populacija stanica nalazi se na vrhu hijerarhije i odgovorna je za održavanje cjelokupne populacije stanica tumora što predstavlja analogiju s funkcijom somatskih matičnih stanica u zdravim tkivima⁶.

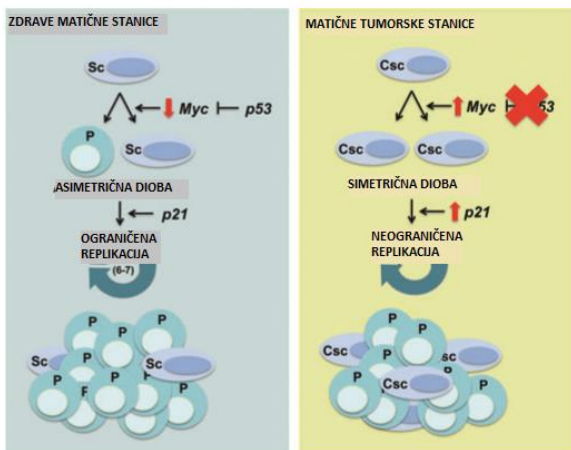


Slika 2. Shematski prikaz modela matičnih stanica tumora. Matične stanice tumora imaju svojstvo samoobnavljanja i neograničene replikacije čime održavaju cijelu tumorsku masu. Tumorske matične stanice pokazuju iznimno visoko svojstvo plastičnosti, pod selekcijskim pritiskom mikrookoliša, koje im omogućava da se iz tumorskih stanica dediferenciraju do stanica sa svojstvima matičnih stanica. **A-** formiranje tumorske matične stanice mutacijama izazvanima u normalnim matičnim stanicama/ progenitorskim stanicama/ diferenciranim stanicama. **B-** tumorska matična stanica asimetričnim diobama generira nove matične tumorske stanice i progenitorske stanice koje sačinjavaju većinu tumorske mase i koje dalje generiraju nove mutacije u procesu progresije tumora. **C-** različiti tipovi tumorskih matičnih stanica u istoj tumorskoj masi (subpopulacije tumorskih matičnih stanica). **D-** konvencionalna terapija ubija većinu stanica koje sačinjavaju tumorsku masu, ali kemorezistentne tumorske matične stanice opstaju što dovodi do ponovne pojave tumora. **E-** ubijanjem matičnih stanica tumora ciljanom terapijom dovodi do postepene pojave tumorskih čvorova koji nastaju zbog opstanka mutiranih matičnih stanica tumora. **F-** ciljana terapija protiv tumorskih matičnih stanica i diferenciranih tumorskih stanica potencijalno dovodi do potpunog iskorjenjivanja tumora. Preuzeto i prilagođeno iz ⁶.

2.2.1. CSCs i SCs- sličnosti i razlike

S obzirom da ih se smatra „unutarnjim gorivom“ odgovornim za rast tumorskog čvora, CSCs dijele neka zajednička svojstva sa normalnim matičnim (SC) stanicama koja im omogućavaju takvu nevjerovatnu proliferativnu moć.

Najvažnije svojstvo koje CSCs dijele sa SCs je mogućnost samoobnavljanja. Normalne matične stanice imaju karakteristična svojstva staničnog ciklusa koja im omogućavaju generiranje dviju stanica s različitim potencijalima daljnjeg razvoja- mirujuća stanica s matičnim svojstvima i proliferirajuća progenitorska stanica s kapacitetom nekoliko diobi prije terminalne diferencijacije. Za takav stanični ciklus odgovorna je asimetrična stanična dioba (Slika 3.) koja omogućava samoobnavljanje matičnih stanica, ali sprječava ekspanziju njihovog broja¹⁰. Kod matičnih stanica tumora zamijećena je deregulacija samoobnavljajućeg ciklusa te one ulaze u simetričnu staničnu diobu. Ovakvom diobom nastaju dvije stanice kćeri istog potencijala čime se značajno povećava masa stanica, što je poželjno prilikom razvoja embrija ili u tkivnom odgovoru na ozljedu, ali u slučaju tumorogeneze vodi do znatnog porasta malignih stanica. Smatra se kako CSCs mogu povećavati svoju staničnu brojnost simetričnim diobama koje nastaju zbog narušene regulacije p53-Myc osi, koja je ključna za regulaciju asimetričnog staničnog ciklusa kod SCs¹⁰ (Slika 3.).



Slika 3. Regulacija procesa samoobnavljanja kod SCs i CSCs. Normalne matične stanice dijele se uglavnom asimetričnom diobom što rezultira novim matičnim stanicama (SCs) i progenitorskim stanicama (P). Ovaj proces reguliran je intrinzičnim čimbenicima te se zaustavlja kada stanice prijeđu limit od 6-7 diobi. Kod zdravih matičnih stanica p53 ovisna regulacija c-Myc protoonkogena odgovorna je za asimetrični tip diobe dok je p21 zaslužan za održavanje samoobnavljanja. Kod CSCs regulacija ciklusa diobi potpuno je narušena. Gubitak p53 rezultira prelaskom na simetrični način diobe, a up-regulacija p21 dodatno poboljšava samoobnavljajuća svojstva CSCs- neograničenim brojem staničnih diobi znatno povećavaju staničnu brojnost. Preuzeto i prilagođeno iz¹⁰.

3. CSCs- PROMJENJENE MATIČNE ILI DEDIFERENCIRANE TUMORSKE STANICE?

Porijeklo matičnih stanica tumora do danas ostaje neriješeno. Dvije su hipoteze porijekla CSCs- jedna navodi da su izvorišne stanice za CSCs normalne matične stanice, dok druga hipoteza navodi da CSCs potječu od terminalno diferenciranih stanica koje se akumulacijom mutacija postepeno dediferenciraju¹¹.

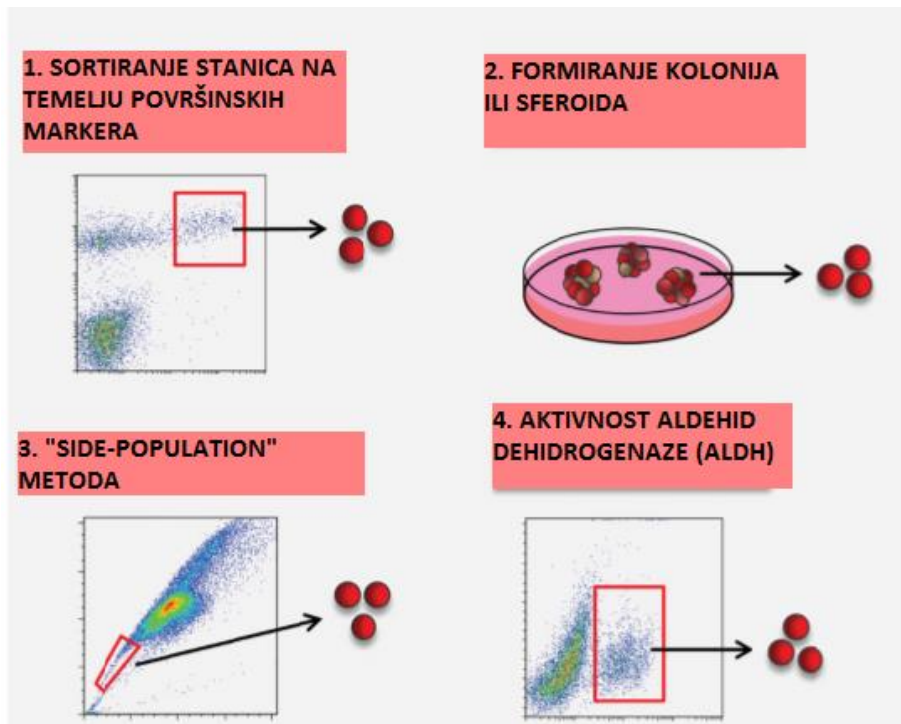
S obzirom da imaju mogućnost samoobnavljanja i produkcije progenitorskih stanica koje daljnjim diobama i diferencijacijom potiču ekspanziju tumorske mase, mnogi autori smatraju kako CSCs potječu upravo iz zdravih matičnih stanica². Još jedan dokaz u prilog ovoj hipotezi je i aktivirana telomeraza, svojstvo koje CSCs također dijele sa SCs, dok terminalno diferencirane stanice nemaju aktiviranu telomerazu zbog čega i podliježu procesu replikativnog starenja¹¹.

Premda je intuitivno da CSCs potječu iz transformiranih ili zdravih matičnih stanica brojna istraživanja ukazuju kako njihovo izvorište mogu biti i terminalno diferencirane stanice. Maligna svojstva takve stanice stječu genetskim i epigenetskim disregulacijama čime potencijalno mogu steći svojstva svojevrsna matičnim stanicama. Primjer takvih promjena, u terminalno diferenciranim stanicama, predstavljaju epigenetske promjene koje dovode do narušavanja signalnih puteva- Wnt, Notch, Myc i Hedgehog, koji kontroliraju samoobnavljanje i diferencijaciju u zdravim stanicama¹, čime se diferencirana stanica dediferencira i pokazuje svojstva slična matičnim stanicama.

Usprkos nedostatku direktnih eksperimentalnih dokaza, posljednjih godina oblikovana je još jedna hipoteza o porijeklu tumorskih matičnih stanica. Prema ovoj hipotezi CSCs mogu nastati fuzijom matične stanice i neoplastične stanice (hematopoetska matična stanica fuzionira sa stanicom epitelnog tumora)¹¹. Takav fuzijski stanični produkt zadržava mogućnost samoobnavljanja, ali i vrlo visok stupanj malignosti.

4. METODE IZOLACIJE I KLASIFIKACIJE CSC

S obzirom da se smatraju inicijacijskim stanicama tumora i stanicama odgovornima za metastaziranje i kemorezistenciju, izolacija i detaljna karakterizacija tumorskih matičnih stanica nužna je kako u laboratorijskim tako i u kliničkim istraživanjima. Do danas je utvrđeno nekoliko standardiziranih metoda za izolaciju analizu i detaljnu karakterizaciju CSCs (Slika 4.), a njihov detaljan pregled iznesen je u daljnjem tekstu.



Slika 4. Standardne metode izolacije i karakterizacije CSCs. 1. CSCs moguće je izolirati staničnim sortiranjem temeljenim na kombinaciji specifičnih površinskih biljega. 2. s obzirom na svojstvo samoobnavljanja, CSCs iz leukemije formiraju kolonije u metilceluloznom mediju, dok one CSCs iz solidnih tumora formiraju karakteristične sferoidne nakupine u mediju bez seruma pri neadherirajućim uvjetima. 3. kada su tumorske stanice izložene Hoechst 33342 i podvrgnute UV-zračenju (uz popratno stanično sortiranje), izolirana CSCs subpopulacija odgovara dijelu označenom crvenim pravokutnikom na priloženom grafu protočne citometrije. 4. CSCs imaju izražajnu aktivnost ALDH pa prema tome mogu biti izolirane uz stanično sortiranje bazirano na zelenom signalu emitiranom nakon tretiranja tumorskih stanica Bodipy-konjugiranim aminoacetaldehidom. Preuzeto i prilagođeno iz ⁴.

4.1. Metoda sortiranja stanica na temelju površinskih biljega

Nakon što su prvi puta identificirane kod pacijenata oboljelih od AML, na temelju površinskih biljega kao CD34⁺ / CD38⁻ stanice, njihova identifikacija i izolacija nastavila se kod solidnih tumora. Upotrebom protočne citometrije i staničnog sortiranja (Slika 4.) identificirani su površinski biljezi za CSCs tumora dojke (CD44⁺/CD24^{-/low}), prostate (CD44⁺/CD24⁺), debelog crijeva (CD133⁺, EpCAM^{hi}, CD44⁺), gušterače (CD44⁺, CD24⁺, ESA⁺) te brojnih drugih solidnih tumora⁴ (Tablica 1.).

Stanice izolirane iz tumora i klasificirane prema površinskim biljezima testiraju se na tumorogeničnost unosom u imunokompromitiranog miša (npr. NOD/SCID). Ukoliko izazivaju tumore u pokusnoj životinji smatraju se stanicama s mogućnošću začetka tumorske mase. Ovakav način izolacije i klasifikacije te dokazivanja tumor-inicirajućih svojstava smatra se „zlatnim standardom“ u istraživanjima biologije CSCs⁵. Međutim, važno je naglasiti kako do danas nije identificiran univerzalan CSC biljeg. Svi trenutačno opisani biljezi tipični za CSCs pojedinih tipova malignih tumora mogu se detektirati na normalnim matičnim stanicama pa čak i somatskim stanicama zdravih tkiva. Upravo iz tog razloga ciljanje ovih površinskih biljega specifičnim antitijelima, u vidu antitumorske terapije, još uvijek nije moguće⁵.

Tablica 1. CSCs površinski biljezi identificirani u različitim solidnim tumorima¹¹.

TIP KARCINOMA	POVRŠINSKI BILJEZI
KARCINOM PLUĆA	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺
KARCINOM JETRE	CD90 ⁺ , CD45 ⁻ , CD44 ⁺
KARCINOM JAJNIKA	CD44 ⁺ , CD117 ⁺
KARCINOM DEBELOG CRIJEVA	EpCAM ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , CD166 ⁺ , ALDH1 ⁺
KARCINOM GUŠTERAČE	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ESA ⁺
MELANOM	ABC5 ⁺
EWINGOV SARKOM	CD133 ⁺
GLIOM	CD133 ⁺
SARKOMI	CD105 ⁺ , CD44 ⁺ , Stro1 ⁺
KARCINOM DOJKE	CD24 ^{-/low} , CD44 ⁺
KARCINOM PROSTATE	Sca1 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺

4.2. Metoda izolacije i identifikacije CSC formiranjem klonova ili sferoida

Premda je metoda *in vivo* izazivanja tumorogeničnosti u pokusnim životinjama različitim klasama CSCs temeljenim na površinskim biljezima dugo smatrana središnjom metodom u karakterizaciji CSCs ona je izuzetno skupa i vremenski duga metoda (minimalno šest mjeseci potrebno je za provedbu eksperimenta) te je stoga uspostava *in vitro*, standardizirane, brže i jeftinije metode bila je nužna⁶. Jedna od takvih metoda je i metoda formiranja kolonija ili sferoidnih nakupina stanica, koja se zasniva na sposobnosti samoobnavljanja CSCs⁴ (Slika 4.). Ova metoda uključuje nasađivanje stanica tumora, iz stanične suspenzije, na medij bez seruma uz dodatak FGF-a i EGF-a (potiču rast stanica) te uzgajanjem do pojave staničnih sferoida (nakupine približno 50 stanica). Stvaranje primarne nakupine stanica ne može se direktno pripisati utjecaju CSCs jer progenitorske stanice svojim diobama također doprinose stvaranju ukupne stanične mase te je stoga za izolaciju CSCs potrebo provesti nekoliko pasaža. Primarni, sekundarni pa čak i tercijarni sferoidi izoliraju se i ponovno nasađuju na svježi medij čime se „istroši“ diobeni kapacitet progenitorskih stanica, a najveći udio sferoida čine upravo CSCs^{4,6}.

4.3. „Side-population“ metoda

Ova metoda koristi se za izolaciju normalnih ili tumorskih stanica sposobnih izlučiti različite tvari izvan stanice zahvaljujući posebnim prijenosnicima na staničnoj membrani. Zamijećeno je kako male populacije stanica izražavaju ABCG2 membranske prijenosnike koji su odgovorni za rezistenciju stanica tumora na različite kemoterapeutike (aktivno „izbacivanje“ lijeka iz stanice)⁴. Srž ove metode je tretiranje tumorskih stanica DNA-interkalirajućom bojom Hoechst 33342 te pobuđivanje istih fluorescencijom ili UV-zračenjem. Mala subpopulacija koja ne pokazuje fluorescentnu emisiju detektirana je upravo kao „side populacija“ na grafičkom prikazu protočne citometrije (Slika 4.). Takva populacija stanica nije primila boju u stanice (zahvaljujući posebnim membranskim prijenosnicima) te posjeduje znatnu tumorogeničnu sposobnost (u usporedbi s ostalim tretiranim tumorskim stanicama). Važnost ove metode najbolje se očituje prilikom izolacije CSCs za koje još ne postoje utvrđeni površinski biljezi⁴.

4.4. Metoda izolacije i identifikacije CSC bazirana na aktivnosti ALDH

Metoda aktivnosti aldehid dehidrogenaze (ALDH) široko je upotrebljavana metoda identifikacije i evaluacije CSCs (Slika 4.). ALDH je citoprotektivni enzim koji katalizira ireverzibilnu konverziju retinaldehida u retinoičnu kiselinu čime znatno doprinosi staničnoj proliferaciji i diferencijaciji⁴. Visoke razine ALDH aktivnosti dovode se u vezu s pojačanom rezistencijom na kemoterapiju što je uočeno kod CSCs izoliranih iz karcinoma dojke i jajnika. Kod ovih karcinoma dokazano je kako kombinirana metoda karakterizacije CSCs na temelju površinskih biljega i aktivnosti ALDH rezultira izolacijom CSCs većeg tumorogeničnog potencijala nego u slučaju kada su iste izdvojene samo sortiranjem na temelju površinskih biljega⁴.

5. BIOLOGIJA MATIČNIH STANICA TUMORA I OSNOVNI CILJEVI U TERAPIJI

Tradicionalne metode liječenja malignih tumora, koje uključuju kemoterapiju i radoterapiju, uspješno eliminiraju većinu tumorske mase, ali usprkos tomu, ponovno pojavljivanje tumora nakon terapije nije rijetkost. Upravo pojačana rezistencija CSCs na primijenjenu terapiju smatra se odgovornom za ponovnu pojavu tumorske mase kod onih tumora kod kojih je do danas CSCs model tumorogeneze eksperimentalno dokazan. Za kemorezistenciju matičnih tumorskih stanica zaslužna je njihova dinamična biologija koja uključuje epigenetičke promjene, izmijenjene obrasce normalnih signalnih puteva koji održavaju diferencijaciji i samoobnavljanje SCs, te metaboličke i imunološke prilagodbe. Važno je, stoga, dobro razumijevanje biologije ovih stanica u cilju dizajniranja specijaliziranih lijekova koji ciljaju upravo one biološke značajke svojstvene samo CSC što, uz kombinaciju s konvencionalnim oblicima antitumorske terapije, posljedično može dovesti do potpunog iskorjenjivanja tumorske mase i sprječavanja ponovne pojave tumora¹².

U nastavku su navedene osnovne biološke karakteristike CSCs i pripadajući terapijski pristup.

5.1. Imunološke značajke CSCs i ciljevi u terapiji

Istraživanja na CSCs izdvojenima iz glioblastoma, melanoma i karcinoma debelog crijeva utvrđene su karakteristike ekspresije MHC molekula (MHC-I, MHC-II) na staničnim površinama CSCs. Zamijećena je manja ekspresija MHC-I kod CSCs izoliranih iz glioblastoma za razliku od ne-CSCs stanica izoliranih iz istog tumora, dok su aberantni MHC-II kompleksi

zamijećeni kod CSCs melanoma. Niska ekspresija MHC-I i aberantni MHC-II izričaj na staničnim površinama CSCs povezuje se s preživljenjem CSCs mehanizmom „bijega“ od T-stanica¹³.

Što se tiče proizvodnje specifičnih citokina, zamijećena je uloga IL-6 u promicanju specifičnih svojstava CSCs i preživljenja pod raznim pritiscima mikrookoliša (važna uloga u stvaranju kronične upale). Uloga IL-6 i signalnih puteva u koje je ovaj citokin uključen opisana je na modelu CSCs izoliranih iz tumora glave i vrata, kombiniranom metodom sortiranja stanica površinskim biljezima i ALDH aktivnosti (ALDH^{high}/CD44^{high}). Inhibicija IL-6-signaliziranja s IL-6R inhibicijskim antitijelom (tocilizumab) dovodi do sprječavanja inicijacije tumorogeneze izazvane tumorskim matičnim stanicama. Kod CSCs izoliranih ih karcinoma debelog crijeva blokiranje IL-6 receptora monoklonalnim protutijelom dovodi do redukcije u formiranju sferoida¹² (*in vitro* tehnika za dokazivanje tumorigeničnosti CSCs, Slika 4.).

5.2. Epigenetske karakteristike CSCs i ciljevi u terapiji

Aktivacija staničnih puteva odgovornih za samoobnavljanje kritična je točka inicijacije tumora i sposobnost koja matičnim stanicama tumora omogućava neprestano obnavljanje tumorske mase. U nekoliko nedavnih istraživanja pokazano je kako je ponovna ekspresija samo četiri ciljna gena, koji kodiraju za transkripcijske čimbenike- c-Myc, Oct4, Sox2 i Klf4, dovoljna za ponovnu uspostavu pluripotencije. Ovakva značajna promjena događa se izmjenom epigenetske upute te ireverzibilno dovodi do pojave aberantnih svojstava u prethodno diferenciranim stanicama¹⁴.

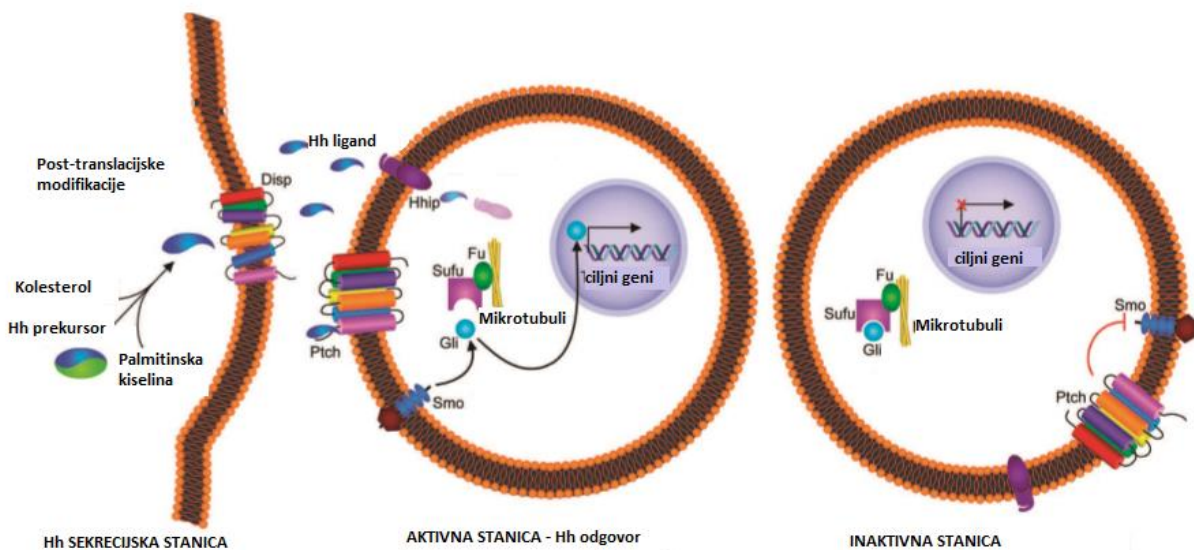
Ciljana epigenetska terapija, kojom se potiče diferencijacija pluripotentnih stanica DNMT ili HDAC inhibitorima, smatra se obećavajućim terapijskim pristupom¹⁴. Inhibitor DNA metiltransferaze, 5-Aza-2'-deoksicitidin, dokazano inhibira proces samoobnavljanja kod CD34⁺ stanica¹⁴.

5.3. Signalni putevi- glavne mete ciljane terapije

Tumorske matične stanice i zdrave matične stanice dijele nekoliko zajedničkih svojstava, a najvažnije je upravo svojstvo samoobnavljanja. Za takva svojstva odgovorna su tri signalna puta- Hedgehog signalni put, Notch signalni put i Wnt/ β -katenin signalni put⁶. Često se na ova tri signalna puta referira kao na „The Holy Trinity“ molekularnog signaliziranja što jasno predstavlja njihovu kritičnu ulogu u procesima samoobnavljanja i diferencijacije stanica⁵.

5.3.1. Hedgehog signalni put

Hedgehog signalni put (Hh signalni put) prvi put je otkriven kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Daljnjim istraživanjima otkrivena su tri homologna liganda Hh signalnog puta - Sonic Hedgehog (SHh), Desert Hedgehog (Dhh) i Indian Hedgehog (Ihh)^{5,15}. SHh je uključen u razvoj središnjeg živčanog sustava, Ihh u diferencijaciju hrskavice, a Dhh je zadužen za razvoj stanica germinativne linije i Schwannovih stanica⁵. Osim navedenih liganda u signalni put uključeni su još i transmembranski receptor Patched (Ptch), G-protein vezujući receptor (SMO) te citoplazmatski proteinski kompleks koji regulira GLI transkripcijske čimbenike¹⁵.



Slika 5. Shematski prikaz Hedgehog signalnog puta. Preuzeto i prilagođeno prema¹⁶.

U prijenosu signala početni korak je vezanje liganda (npr. SHh) za Ptch receptor što dovodi do aktiviranja SMO koji u daljnjoj kaskadi prijenosa signala aktivira GLI obitelj transkripcijskih čimbenika vezanih za proteinski supresorski kompleks SUFU. Aktivirani GLI transkripcijski čimbenici premještaju se do jezgre gdje promoviraju transkripciju Hh ciljnih gena¹⁵ uključenih u proces samoobnavljanja¹¹ i embriogeneze¹⁷ (Slika 5.).

Visoka razina GLI transkripcijskog čimbenika dokazana je kod CD133⁺ CSCs kolorektalnog karcinoma, a blokiranjem aktivnosti SMO gena dolazi do zaustavljanja Hh signalnog puta u tumorskim staničnim linijama kolorektalnog karcinoma i indukcije apoptoze¹⁸.

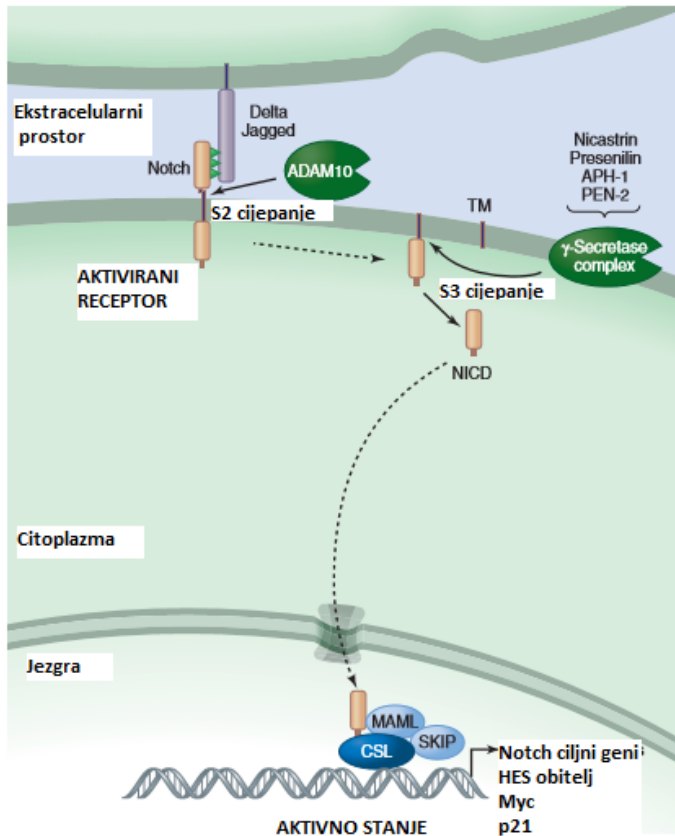
Deregulacija Hh signalnog puta povezana je s brojnim tipovima tumora poput karcinoma prostate i adenokarcinoma želuca⁵, a ciljana terapija upotrebom inhibitora Hh signalnog puta prvi se put počela klinički primjenjivati 2012. godine⁶ za liječenje karcinoma bazalnih stanica. Ova terapija uključuje primjenu Hh inhibitora (Vismodegib) koji se veže za SMO receptor čime sprječava nastanak kaskade prijenosa signala i konačnu aktivaciju transkripcije ciljnih gena¹⁹.

5.3.2. Notch signalni put

Notch signalni put iznimno je konzerviran stanični signalni put uključen u procese diferencijacije, proliferacije i apoptoze, što ga čini snažnim alatom odgovornim za formiranje organa i morfogenezu¹¹. Signalni prijenos aktivira se na dva načina: kanonski (ovisan o Notch ligandu) i nekanonski (neovisan o Notch ligandu) model aktivacije. Kanonski prijenos signala odvija se preko DLL1, DLL2, DLL4 liganada, Jagged 1, Jagged 2 te četiri Notch receptora s velikom izvanstaničnom (NECD) i manjom citoplazmatskom (NICD) domenom.

Vežanjem liganda za receptor dolazi do proteolize izvanstanične domene Notch receptora te nastaje kompleks receptor-ligand. Sekundarno proteolitičko cijepanje događa se na NICD domeni, koja se dalje premješta do jezgre i veže za DNA čime nastaje transkripcijski kompleks odgovoran za prepisivanje Notch gena¹⁵ (Slika 6.).

Deregulacija Notch puta rezultira abnormalnom proliferacijom, reduciranom diferencijacijom te blokiranjem apoptoze što je zamijećeno u brojnim tumorima poput T-stanične akutne limfoblastične leukemije (ALL), melanoma, karcinoma dojke te adenokarcinoma pluća⁵.



Slika 6. Shematski prikaz aktivacije kanonskog modela Notch signalnog puta. Preuzeto i prilagođeno iz²⁰

Istraživanjima CSCs kolorektalnog karcinoma, na animalnim modelima, utvrđeno je kako poliklonalno antitijelo 21M18 blokira ulogu DLL4 u Notch signalnom putu što rezultira značajnom redukcijom tumorske mase i inhibicijom daljnjeg rasta tumorskih matičnih stanica ovog tipa karcinoma¹⁸.

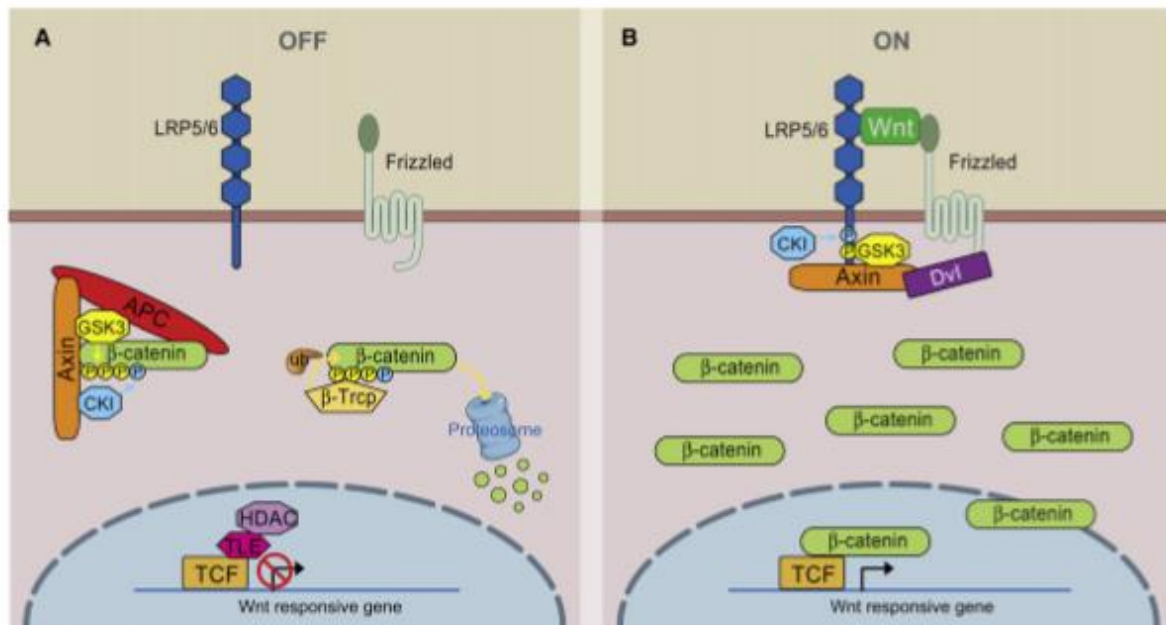
Notch signalni put inducira ekspresiju survivina, antiapoptičkog gena čiji produkt inhibira proces apoptoze. Signaliziranje se uspješno dokida γ -sekretaznim inhibitorima (GSI)-DAPT i RO4929097, koji blokiraju drugo proteolitičko cijepanje Notch receptora i otpuštanje Notch fragmenta¹⁷ što posljedično sprječava inhibiciju apoptoze.

5.3.3. Wnt/ β -katenin signalni put

Wnt signalni put regulira brojne procese uključene u diferencijaciju, staničnu proliferaciju te sudbinu stanica tijekom embriogeneze aktivacijom transkripcijskih čimbenika, a njegova disregulacija smatra se jednim od ključnih čimbenika prilikom inicijacije u brojnim malignim tumorima¹¹. Najvažniji model aktivacije Wnt signalnog puta uključuje kanonski put u čijem je središtu regulacija količine transkripcijskog koaktivatora β -katenina, ključnog za ekspresiju ciljnih gena²¹.

Vežanjem za razne receptore, Wnt ligandi (lipoproteinskog tipa) aktiviraju unutarstanični prijenos signala te prekidaju GSK-3 β -ovisni degradacijski put čime uzrokuju nakupljanje β -katenina u citosolu, odakle se isti premješta u jezgru gdje aktivira Wnt-ciljne gene²¹ (Slika 7.).

Značajna uloga ovog signalnog puta u održavanju fenotipskih karakteristika CSCs dokazana je kod izoliranih tumorskih matičnih stanica iz trostruko negativnog karcinoma dojke (TNBC). Primjenom tocilizumaba na CSCs iz TNBC zamijećeno je kako dolazi do akumulacije β -katenina u citosolu, ali njegovo premještanje u jezgru značajno je smanjeno²² čime je onemogućena ekspresija ciljnih gena.



Slika 7. Shematski prikaz Wnt/ β -katenin staničnog signalnog puta. A- inaktiviran Wnt/ β -katenin signalni put. B- aktiviran Wnt/ β -katenin stanični signalni put. Preuzeto i prilagođeno iz²¹.

5.4. Metabolizam tumorskih matičnih stanica

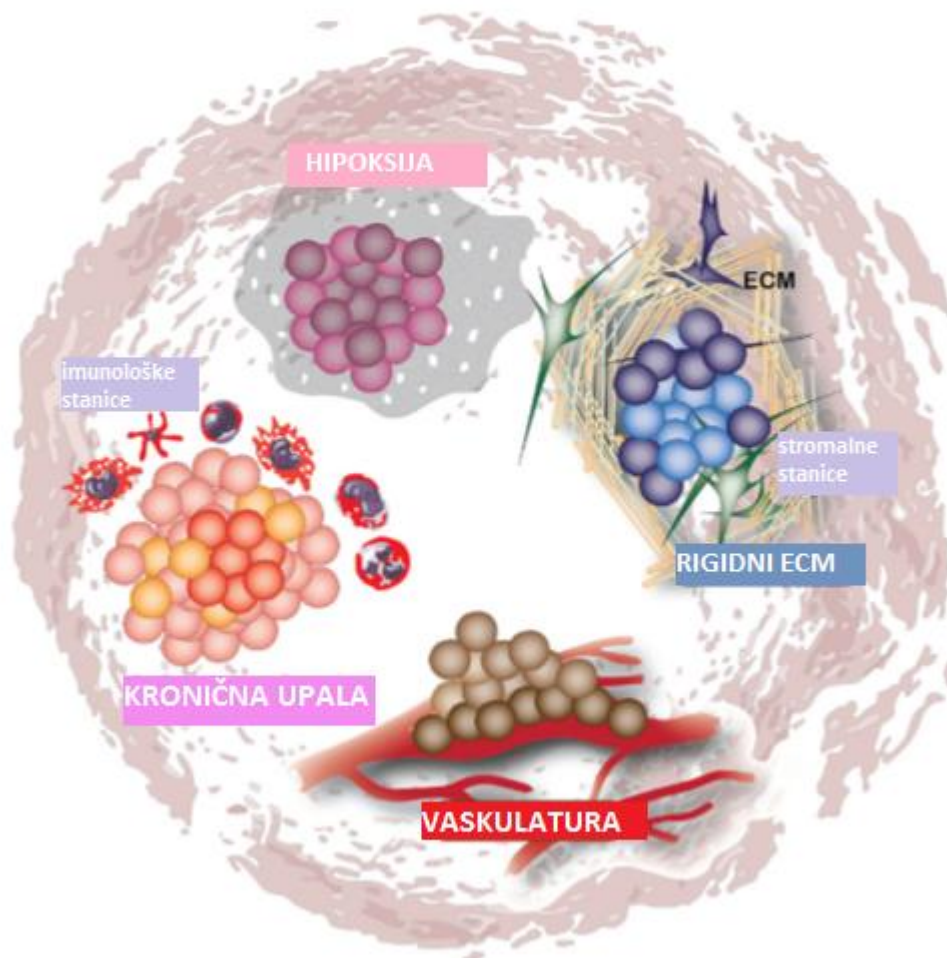
Tumorske stanice koriste posebnu metaboličku strategiju- odabiru glikolitički put kojim metaboliziraju glukozu do laktata. Ovaj „fenomen“ kod populacije tumorskih stanica prvi je uočio i opisao Otto Warburg 1920. godine pa ovakvu metaboličku strategiju nazivamo još i Warburgov efekt²³. Glikolitičkim putem proizvodi se znatno manja količina ATP-a po jedinoj molekuli glukoze, ali proces je puno brži što tumorskim stanicama omogućava ubrzani rast i diobu²⁴. Da bi stanice uspješno kompenzirale manju produkciju ATP-a procijenjeno je kako uzimaju čak dvjesto puta više glukoze nego normalne stanice (pojačana ekspresija GLUT receptora na staničnoj površini)²⁴.

Nedavna istraživanja na CSCs izoliranima iz tumora mozga pokazala su kako takve stanice pokazuju iznimno nisku razinu oksidativne fosforilacije te kako su te stanice prilagođene glikolitičkom putu u većem obimu od ostalih tumorskih stanica u tumorskom čvoru²³.

Utjecaj pojačanog unosa glukoze na tumorske matične stanice značajan je i u pogledu pojačane ekspresije specifičnih gena važnih za metabolizam glukoze (HK-1, HK-2, PDK-1). Inhibicija produkata navedenih gena dovodi do značajnog pada u CSC populaciji, a osim toga sama odsutnost glukoze izaziva potpunu smrt CSC staničnih linija (na primjeru osteosarkoma)²⁴.

6. ULOGA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA U REGULIRANJU FENOTIPA CSCs

Niše su specijalizirani mikrookoliši⁸ čija je funkcija „usidranje“ stanica u odgovarajući okoliš²⁵. 1889. godine Stephen Paget postavlja hipotezu tumorskog mikrookoliša koja se zasniva na odnosu sjeme (tumorska stanica) - plodno tlo (pogodno tkivo). Prema ovoj hipotezi tumorski okoliš (TME) predstavlja skup raznih staničnih i nestaničnih komponenti²⁶. Staničnu komponentu TME čine vaskularne stanice (endotelne stanice, periciti), imunološke stanice (neutrofili, monociti, makrofagi, mastociti) te tumoru pridruženi fibroblasti (CAFs). Nestanična komponenta odnosi se na izvanstanični matriks (kolagen, fibronektin, laminin) te na posebno stanje hipoksije koje je jedna od važnijih odlika TME²⁶ (Slika 8.).



Slika 8. Prikaz najvažniji staničnih i nestaničnih komponenti koje oblikuju tumorsku nišu. Preuzeto i prilagođeno prema¹.

Utjecaj tumorske niše u iznimno je važan u oblikovanju i regulaciji fenotipskih karakteristika matičnih tumorskih stanica. Različite stanice u CSCs niši svojim specifičnim proizvodima stimuliraju samoobnavljanje CSCs, induciraju angiogenezu te promoviraju inicijaciju i metastaziranje matičnih tumorskih stanica²⁷.

6.1. Utjecaj imunoloških stanica na TME

Imunološke stanice ispuštaju razne pro-upalne citokine poput IL-1, IL-6, IL-8 što dovodi do aktivacije Stat3/NF- κ B signalnog puta odgovornog za održavanje stanja kronične upale¹ koji posljedično dovodi do snažne proliferacije CSCs i poticanja metastaziranja²⁷. Kako bi omogućila tumorogenezu i povećavanje mase tumorskog čvora, tumorska niša mora spriječiti imunološku reakciju, a to uspješno postiže novačenjem raznih staničnih tipova te izazivanjem stanja kronične upale. Najvažnije za imunosupresiju su tumoru-pridruženi makrofagi (TAMs) i tumoru-pridruženi neutrofilni (TANs). Jedan od najboljih primjera za njihovo sudjelovanje u imunosupresiji je lučenje TGF- β koji posljedično regrutira T-regulatorne stanice (Tregs) kao važnu staničnu komponentu imunološke supresije²⁷. Osim toga dokazano je kako TAMs lučenjem TNF- α potiču pojačanu aktivnost NF- κ B signalnog puta i indukciju EMT-transkripcijskih čimbenika (Slug, Snail, Twist) čime promoviraju samoobnavljanje, migraciju i invazivnost CSCs².

6.2. Utjecaj tumoru pridruženih fibroblasta na TME

Tumoru pridruženi fibroblasti (CAFs) stanice su mezenhinskog porijekla, a nastaju iz normalnih fibroblasta pod utjecajem sekretornih molekula iz tumorskih stanica. Lučenjem bazičnog fibroblastnog čimbenika rasta (bFGF), transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β), čimbenika rasta krvnih pločica (PDGF) te IL-6, tumorske stanice transformiraju okolne fibroblaste u CAFs². U usporedbi s normalnim tkivnim fibroblastima CAFs odlikuju pojačanom proliferativnošću, pojačanom proizvodnjom sastojaka ECM te lučenjem specifičnih citokina poput VEGF, PDGF i HGF (uključeni u proces angiogeneze i metastaziranja)²⁷. Istraživanjima karcinoma jetre i debelog crijeva zamijećeno je kako upravo CAFs promoviraju samoobnavljanje i plastičnost CSCs preko parakrine aktivacije Wnt/ β -katenin i Notch signalnog puta².

6.3. Utjecaj ECM na TME

Izvanstanični matriks (ECM) esencijalna je nestanična komponenta staničnih mikrookoliša²⁷. ECM je iznimno važna komponenta i tumorskih mikrookoliša koja regulira maligne fenotipske karakteristike CSCs². Jedan od primjera je deregulacija ekspresije tenascina-C (TNC), proteina ECM uključenog u kontrolu niše normalnih matičnih stanica, koja

nepovratno vodi u pojačanu invazivnost i metastaziranje CSCs. Zbog navedenih utjecaja na tumorsku mikro-nišu, TNC je prepoznat kao potencijalni biljeg za identifikaciju CSCs u glioblastomima². Svojstva ECM važna su i za kemorezistenciju CSCs. Naime, zamijećeno je kako pojačana gustoća i rigidnost sastojaka ECM predstavlja fizičku barijeru koja blokira prodor kemoterapeutika, čime su CSCs dodatno zaštićene²⁷. Važan utjecaj je i djelovanje matriks-metaloproteinaza (MMPs) koje degradacijom komponenti ECM-a u tumorskim nišama uzrokuju oslobađanje brojnih citokina i čimbenika rasta čime se znatno olakšava angiogeneza, tumorska invazivnost i metastaziranje²⁷.

6.4. Utjecaj hipoksije i tumorske mikrovaskulature na TME

Hipoksija je jedan od fenomena tumorskih stanica, a posljednjih godina brojnim istraživanjima utvrđeno je kako ima značajnu ulogu u oblikovanju fenotipa tumorskih matičnih stanica²⁸. Hipoksija je važna odlika TME solidnih tumora kod kojih je prisutna narušena vaskulatura i slaba difuzija kisika²⁷ te se smatra glavnim pokazateljem loše prognoze različitih malignih tumora². Hipoksija inducira ekspresiju VEGF i VEGFR 2 nužnih za migraciju i angiogenezu²⁸, a dokazano je također kako direktno pojačava Notch signalni put²⁷. Hipoksija također promovira preživljavanje CSCs preko reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) aktivacijom stres-ovisnih signalnih puteva- TGF- β i TNF- α ²⁷.

Mikrovaskulatura koja okružuje tumorsku masu značajna je komponenta TME koja direktno promovira tumorski rast. Brojna istraživanja pokazala su kako se CSCs u leukemiji te tumorima mozga, kože i debelog crijeva organiziraju upravo u blizini vaskularnih čvorova. Ovu hipotezu podržavaju i nedavna istraživanja kojima je pokazano kako endotelne stanice krvnih žila promoviraju fenotip CSCs proizvodnjom Notch-liganda DLL4¹.

7. ZAKLJUČAK

Istraživanje uzroka i progresije malignih oboljenja te terapijskog pristupa koji bi doveo do potpunog iskorjenjivanja tumorske mase predstavljaju glavni izazov u biomedicinskim istraživanjima današnjice. Spoznajom kako je tumor višestupanjska bolest otvorila su se vrata istraživanjima detaljne građe tumorskog čvora kao i čimbenika koji posreduju oblikovanju njegovog malignog i često letalnog fenotipa. Danas postoje dva modela (hipoteze) koja objašnjavaju procese tumorogeneze. Prema stohastičkom modelu svaka stanica posjeduje jednaki tumorogenični potencijal, a razvoj tumorske mase prati Darwinovu teoriju evolucije, dok prema modelu tumorskih matičnih stanica samo određene stanice imaju sposobnost samoobnavljanja i produciranja progenitorskih stanica koje „hrane“ tumorsku masu i dovode do metastaziranja i kemo-rezistencije tumora. Potječu li te tumorske matične stanice iz zdravih matičnih stanica ili nastaju iz već diferenciranih stanica, do danas nije jednoznačno određeno.

S obzirom da ih se smatra važnom pokretačkom snagom rasta i invazivnosti malignih tumora, upoznavanje njihove biologije i fenotipskih karakteristika, koje oblikuju njihovo ponašanje u organizmu predstavlja srž brojnih istraživanja. Prvi korak u takvim istraživanjima je izolacija i identifikacija CSCs iz tumorskih masa, koja se danas može vršiti brojnim standardiziranim metodama. Važno je svakako napomenuti kako niti jedna od tih metoda nije univerzalna metoda za njihovu potpunu izolaciju i identifikaciju, već je potrebno upotrijebiti kombinirane metode kako bi se donekle osigurala preciznost u njihovoj izolaciji.

Proučavanjem biologije ovih stanica utvrđeno je kako dijele neka vrlo važna svojstva sa SCs, a najvažnije od njih je svakako proces samoobnavljanja. Visoku stopu samoobnavljanja i proliferativnosti i nisku stopu diferencijacije ove stanice duguju procesu simetrične diobe i narušenim signalnim putevima odgovornima za normalan stanični rast i diferencijaciju (Hh, Notch, Wnt signalni putevi). Osim toga za formiranje njihovog posebnog fenotipa zaslužan je i tumorski mikrookoliš. Sastavnice mikrookoliša svojim produktima značajno utječu na transformaciju tumorskih stanica i pogoduju pojačanoj invazivnosti i sposobnosti metastaziranja.

Sva ova saznanja poslužila su kao sjajna platforma za proučavanje ciljane terapije, koja bi uz konvencionalnu terapiju potencijalno mogla dovesti do potpunog „iskorjenjivanja“ malignih tumora i sprječavanje njegove ponovne pojave.

8. LITERATURA

1. Prasetyanti, P. R. & Medema, J. P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol. Cancer* **16**, (2017).
2. Ayob, A. Z. & Ramasamy, T. S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J. Biomed. Sci.* **25**, (2018).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
4. Sugihara, E. & Saya, H. Complexity of cancer stem cells. *Int. J. Cancer* **132**, 1249–1259 (2013).
5. Ciurea, M. E. *et al.* Cancer stem cells: Biological functions and therapeutically targeting. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 8169–8185 (2014).
6. Wang, T. *et al.* Cancer stem cell targeted therapy: Progress amid controversies. *Oncotarget* **6**, 44191–44206 (2015).
7. Eun, K., Ham, S. W. & Kim, H. Cancer stem cell heterogeneity: Origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep.* **50**, 117–125 (2017).
8. Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P. & Pestell, R. G. Cancer stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2144–2151 (2012).
9. Capp, J. P. Cancer stem cells: From historical roots to a new perspective. *J. Oncol.* **2019**, (2019).
10. Verga Falzacappa, M. V., Ronchini, C., Reavie, L. B. & Pelicci, P. G. Regulation of self-renewal in normal and cancer stem cells. *FEBS J.* **279**, 3559–3572 (2012).
11. Jiang, W., Peng, J., Zhang, Y., Cho, W. C. S. & Jin, K. The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 16636–16657 (2012).

12. Codd, A. S., Kanaseki, T., Torigo, T. & Tabi, Z. Cancer stem cells as targets for immunotherapy. *Immunology* **153**, 304–314 (2018).
13. MacCalli, C., Volontè, A., Cimminiello, C. & Parmiani, G. Immunology of cancer stem cells in solid tumours. A review. *Eur. J. Cancer* **50**, 649–655 (2014).
14. Vincent, A. & Van Seuning, I. On the epigenetic origin of cancer stem cells. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1826**, 83–88 (2012).
15. Borah, A. & Kumar, D. S. Targeting the hedgehog and notch signaling pathways in cancer stem cells. in *Oncogenomics: From Basic Research to Precision Medicine* 103–120 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811785-9.00008-9.
16. Velcheti, V. & Govindan, R. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2**, 7–10 (2007).
17. Cho, Y. & Kim, Y. K. Cancer Stem Cells as a Potential Target to Overcome Multidrug Resistance. *Front. Oncol.* **10**, (2020).
18. Ma, Y. S. *et al.* Targeting Colorectal Cancer Stem Cells as an Effective Treatment for Colorectal Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **19**, (2020).
19. Aditya, S. & Rattan, A. Vismodegib: A smoothed inhibitor for the treatment of advanced basal cell carcinoma. *Indian Dermatol. Online J.* **4**, 365–368 (2013).
20. Kopan, R. Notch signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
21. MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26 (2009).
22. Alraouji, N. N. *et al.* Tocilizumab potentiates cisplatin cytotoxicity and targets cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Mol. Carcinog.* **59**, 1041–1051 (2020).

23. Deshmukh, A., Deshpande, K., Arfuso, F., Newsholme, P. & Dharmarajan, A. Cancer stem cell metabolism: A potential target for cancer therapy. *Mol. Cancer* **15**, (2016).
24. Chae, Y. C. & Kim, J. H. Cancer stem cell metabolism: Target for cancer therapy. *BMB Rep.* **51**, 319–326 (2018).
25. Li, L. & Neaves, W. B. Normal stem cells and cancer stem cells: The niche matters. *Cancer Res.* **66**, 4553–4557 (2006).
26. Roy Choudhury, A., Gupta, S., Chaturvedi, P. K., Kumar, N. & Pandey, D. Mechanobiology of cancer stem cells and their niche. *Cancer Microenviron.* **12**, 17–27 (2019).
27. Plaks, V., Kong, N. & Werb, Z. The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* **16**, 225–238 (2015).
28. Ye, J., Wu, D., Wu, P., Chen, Z. & Huang, J. The cancer stemcell niche: Cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. *Tumor Biol.* **35**, 3945–3951 (2014).

9. SAŽETAK

Tumor je heterogena nakupina tumorskih stanica, potpornih stanica te kompleksne mreže izvanstaničnog matriksa. Proces formiranja tumorske mase objašnjavaju dva modela. Prvi model odnosi se na klonalno-evolucijski model prema kojem svaka tumorska stanica ima jednak tumorogenični potencijal i svojim diobama, pod stalnim selekcijskim pritiskom tumorskog mikrokoliša, stimulira rast tumorske mase. Drugi model odnosi se na model tumorskih matičnih stanica koji predlaže kako samo određena populacija stanica ima sposobnost samoobnavljanja i proizvodnje progenitorskih stanica čime se povećava tumorska masa. Prema tome matične stanice tumora (CSC) smatraju se tumorskim-inicijatorskim stanicama, odgovornima za visoku proliferativnu moć tumora te invazivnost i metastaziranje. Metode za njihovu izolaciju i identifikaciju predstavljaju početni korak u istraživanjima njihove biologije, a danas postoji nekoliko standardiziranih metoda. Za njihovu detaljnu izolaciju i karakterizaciju često se koriste kombinirane metode koje omogućavaju precizno izoliranje CSC populacija iz početne tumorske mase. Kompleksna biologija ovih stanica oblikuje njihove fenotipske karakteristike zaslužne za svojstva pojačane invazivnosti i kemorezistencije. Među najvažnijim biološkim karakteristikama CSCs izdvajaju se načini regulacije staničnih signalnih putova odgovornih za samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju (Hedgehog, Notch i Wnt/ β -katenin) te utjecaj tumorskog mikrokoliša na oblikovanje malignog fenotipa. Specijalizirana terapija koja cilja upravo CSCs, uz primjenu konvencionalne terapije, mogla bi dovesti do smanjenja ukupne mase tumora, ali i ubijanja same unutrašnje pokretačke snage tumora što bi spriječilo ponovno pojavljivanje tumora.

10. SUMMARY

Tumor is a heterogeneous cell population that consists of transformed tumor cells, stromal cells, and complex extracellular matrix. Tumor formation is explained by two models. First model is a clonal evolution model. This model suggests that every tumor cell has the same tumorigenic potential and that these cells, by multiple self-divisions, under the constant tumor-niche selection pressure create heterogeneous tumor. Second model is a cancer stem cell model (CSC model). This model explains tumor formation by small subpopulation of cells that can self-renew and produce cell progenies which can form heterogeneous tumor. Thus, cancer stem cells (CSCs) are thought to be tumor-initiating cells responsible for tumor high proliferative power and its invasiveness. Methods for CSCs isolation and identification represent the first step in their multi-step investigation process. Today, there are few standardised methods for CSC isolation, but very often combined methods are used to precisely isolate CSCs from tumor of origin. CSCs complex biology creates phenotypic features responsible for high invasiveness and chemoresistance. Among the most responsible for those features is regulation of specialised signal-transduction pathways responsible for self-renew, proliferation and differentiation (Hedgehog, Notch i Wnt/ β -catenin) and the impact of tumor-niche in creating malignant phenotype. Specialised therapy that targets CSCs, combined with conventional anticancer therapy, could lead to tumor shrinkage, tumor-core power eradication and inhibition of tumor relapse.