

Nové trendy vo výskume biológie nádorových buniek – naše výskumné aktivity

Mgr. Lucia Kučerová¹, PhD., RNDr. Miroslava Matúšková¹, PhD., Mgr. Erika Ďuriníková¹,
RNDr. Katarína Szabová¹, PhD., RNDr. Soňa Čierniková², PhD., doc. RNDr. Vladimír Zajac², CSc.,
RNDr. Ján Sedlák¹, DrSc.

¹Oddelenie molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

²Oddelenie molekulárnej genetiky, Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

Vývoj poznatkov o nádorových ochoreniach za posledné obdobie priniesol hlbšie pochopenie biologických odlišností medzi podskupinami nádorových buniek a zodpovedajúcich molekulárnych mechanizmov, ktoré určujú ich diverzitu. Výskum sa zameriava na pochopenie nádorovej heterogenity, identifikáciu vhodných a funkčných markerov. V stredobode vedeckého záujmu ostáva sledovanie komplexných interakcií medzi nádorovými kmeňovými bunkami, nádorovou masou, s nimi susediacimi nemalígnymi štruktúrami, organizmom a jeho mikrobiómom. Vedci Ústavu experimentálnej onkológie disponujú unikátnym spektrom vedomostí aj vhodnou infraštruktúrou na to, aby mohli prispieť originálnymi poznatkami k výskumu súčasných aktuálnych problémov v biológii nádorových buniek a ich aplikácii do klinickej praxe.

Kľúčové slová: nádorová bunka, nádorová kmeňová bunka, exozómy, nádorové mikroprostredie, mikrobióm, cytoanalytika.

New research trends in the tumor cell biology – our research activities

Recent development in the understanding of the malignant disease brought deeper understanding of biological differences between the subsets of tumor cells and underlying molecular mechanisms of their diversity. Research focuses on dissecting the tumor heterogeneity, identification of suitable and functional markers. Complex interactions among cancer stem cells, bulk tumor cells, their adjacent non-malignant structures, organism, and microbiome remain in the center of scientific interest. Scientists of the Cancer Research Institute SAS possess unique wide know-how and suitable infrastructure to contribute to current burning issues in tumor cell biology with original findings and their application to clinical practice.

Key words: tumor cell, cancer stem cell, exosomes, tumor microenvironment, microbiome, cytoanalytics.

Onkológia (Bratisl.), 2015; roč. 10(1): 10–13

Úvod

Medzi faktory, ktoré môžu prispieť k vzniku nádorov, patria špecifické genetické pozadie, dlhodobé pôsobenie znečisteného životného prostredia, ako aj nesprávne stravovacie návyky. Všetky tieto rizikové faktory sa v konečnom dôsledku odrazia v akumulácii genetických a epigenetických zmien v cieľových bunkách (1). V dôsledku týchto zmien získavajú bunky nádorový fenotyp, ktorý je charakterizovaný neobmedzeným replikačným potenciálom nádorových buniek, sebastačnosťou v rastových signáloch, schopnosťou vyhnúť sa rastovým inhibítorm, rezistenciou na bunkovú smrť, zvýšenou angiogenezou, ako aj invazívnosťou a metastázovaním (2).

Nádorové kmeňové bunky

Nádorové tkanivo je zložené z morfológicky aj funkčne rôznorodých typov buniek. Nádorové bunky tvoria viaceré subpopulácie, ktoré sa odlišujú tumorigénnym potenciálom aj stupňom diferenciácie. V súčasnosti sa na vysvetlenie tumorigenézy a nádorovej heterogenity kombinujú teória klonálnej evolú-

cie a model nádorových kmeňových buniek (NKB, angl. cancer stem cells – CSC). NKB majú schopnosť sebaobnovy (symetrické delenie) a diferenciácie (asymetrické delenie) a dávajú vznik nádorovej mase. Výsledky výskumov naznačujú, že tieto bunky sú spoločným prvkom veľkého množstva, ak nie väčšiny nádorov, hoci ich zastúpenie u jednotlivých typov je veľmi variabilné. Zdrojom NKB môžu byť normálne kmeňové bunky príslušného tkaniva, prípadne môžu NKB vznikáť onkogénnou transformáciou čiastočne diferencovaných progenitorových buniek. Identifikácia a kvantifikácia NKB v nádoroch je veľmi problematická v dôsledku fenotypovej plasticity a zmien zastúpenia v čase. Bunky so znakmi NKB sú všeobecne rezistentnejšie proti klasickej protinádorovej liečbe a zároveň sú aj príčinou nádorovej dormancie. Latentné bunky pretrvávajú roky až desaťročia po úspešnej liečbe a potom prídu k rozvoju agresívneho malígneho ochorenia. Chemorezistencia NKB má niekoľko príčin. Podieľa sa na nej zvýšená expresia proteínov, ktoré vyplávajú toxické metabolity chemoterapeutík do extracelulárneho priestoru, zvýšená

schopnosť opravy DNA, nízka hladina proliferácie, rezistencia proti programovanej bunkovej smrti a znížená imunogénnosť (3).

Markery NKB a NKB ako terapeutický cieľ

Dosiaľ nepoznáme jedinečný marker, prípadne taký súbor markerov, ktoré by jednoznačne definovali NKB pri solidných nádoroch. NKB sa vo viacerých aspektoch podobajú na normálne kmeňové bunky, preto niektoré markery majú spoločné. Povrchový znak CD133 je znakom NKB kolorektálneho karcinómu, melanómu, karcinómu pankreasu, prostaty a štítnej žľazy (4). Normálne aj nádorové kmeňové bunky sa vyznačujú zvýšenou aktivitou enzýmu aldehyddehydrogenáza, najmä izoformy ALDH1.

Existencia NKB je častou príčinou zlyhania konvenčnej protinádorovej terapie. Pri vývoji terapeutických prístupov treba sledovať vývoj subpopulácie NKB a snažiť sa ich eliminovať. Bolo identifikovaných viacero terapeutických cieľov na základe identifikácie kľúčových signálnych dráh pre sebaobnovu NKB, pričom niektoré už boli zaradené do klinických štúdií (5).

Zameriavame sa na štúdium chemorezistentných nádorových buniek, skúmame subpopulácie so znakmi nádorových kmeňových buniek a ich chemorezistenciu (4). V našich prácach sme ukázali, že pôsobením stromálnej zložky nádoru majú nádorové bunky karcinómu prsníka výraznejšie vlastnosti NKB – schopnosť tvorby sféroïdov, mezenchýmový fenotyp a zvýšenú migráciu (6). Zameriavame sa na štúdium interakcií mezenchýmových stromálnych buniek (MSC) a nádorových (kmeňových buniek) v nádorovom mikroprostredí, pretože je v tejto oblasti mnoho neobjasnených mechanizmov, ktoré môžu priniesť nové terapeutické ciele (7, 8). Skúmame, či génová terapia pomocou geneticky modifikovaných MSC, ako inovatívny terapeutický prístup, je účinná aj proti bunkám so zvýšenou chemorezistenciou a znakmi NKB.

Nádorové mikroprostredie

Dlhé obdobie boli nádory vnímané ako neorganizované masy pozostávajúce len z transformovaných buniek. Infiltrácia nádoru rôznymi typmi hostiteľských buniek však vedie k vytvoreniu permisívneho prostredia pre následnú progresiu (epi)geneticky pozmenených nádorových buniek (9). Nádorová masa predstavuje komplexné tkanivo pozostávajúce zo samotných nádorových buniek a okolitej strómy, ktorá vytvára takzvané nádorové mikroprostredie (10). Nádorové mikroprostredie je dnes považované za integrálnu súčasť nádoru a pozostáva z rôznych typov buniek, ako sú fibroblasty, myofibroblasty, adipocyty, endoteliálne bunky a ich prekursori, pericyty, ako aj bunky imunitného systému. Hoci samotné stromálne bunky nie sú malígne, získavajú abnormálny fenotyp a pozmenené funkcie v dôsledku vzájomných interakcií, ako aj interakcií s nádorovými bunkami. Takéto mikroprostredie potom prispieva k proliferácii a prežívaniu nádorových buniek, k angiogéneze, rezistencii na chemoterapiu a rádioterapiu, k modulácii imunitných odpovedí a podporuje invazívnosť a metastázovanie nádorových buniek.

Prvý dôkaz o tom, že nenádorové zložky okolitého tkaniva majú schopnosť ovplyvniť formovanie a rast nádoru, prišiel z oblasti výskumu zaoberajúceho sa zápalom. Spojenie medzi zápalom a vznikom nádorov bolo po prvýkrát pozorované už v roku 1863, keď Rudolf Virchow dokázal prítomnosť leukocytov v nádorovom tkanive. Na základe jeho pozorovania bola vytvorená hypotéza, že nádor vzniká v mieste chronického zápalu. Súčasné štúdie dokazujú, že chronický zápal ovplyvňuje všetky

fázy tumorigenézy, od indukcie DNA nestability a mutácií v bunkách iniciujúcich nádory až po vytvorenie mikroprostredia, ktoré umožňuje progresiu a metastázovanie nádorových buniek – napríklad cez aktiváciu imunosupresívnych mechanizmov, ktoré bránia efektívnej imunitnej odpovedi proti nádoru (11). K vzniku takéhoto chronického zápalu môžu viesť rôzne stimuly, ako sú infekcie (napríklad *Helicobacter pylori* v prípade rakoviny žalúdka), autoimunitné ochorenia (napríklad zápalové ochorenie čriev v prípade rakoviny hrubého čreva) či zápaly neznámeho pôvodu (napríklad prostatitída v prípade rakoviny prostaty) (12).

Najčastejšími imunitnými bunkami, ktoré môžeme nájsť v nádorovom mikroprostredí, sú nádormi-asociované makrofágy (tumor-associated macrophages-TAM) a T lymfocyty. Hoci sú makrofágy vo všeobecnosti považované za veľmi dôležité efektorové bunky počas imunitnej odpovede, mnohé štúdie dokázali, že zohrávajú jasnú úlohu aj pri podpore mnohých aspektov nádorovej progresie (angiogéneza, invazívnosť a metastázovanie). Jedno z vysvetlení kontrastu v úlohe, ktorú makrofágy zohrávajú počas normálnej homeostázy a tumorigenézy, spočíva v ich fenotype. Makrofágy sú funkčne plastické a môžu meniť svoj polarizačný stav, aby sa prispôsobili rôznym fyziologickým podmienkam. Zjednodušene môžeme rozdeliť makrofágy na základe ich polarizačného stavu na M1 a M2 makrofágy. „Klasicky aktivované“ M1 makrofágy produkujú prozápalové cytokíny I. typu, podieľajú sa na antigénnej prezentácii a zohrávajú protinádorovú úlohu. Na druhej strane, „alternatívne aktivované“ M2 makrofágy produkujú cytokíny II. typu, podporujú protizápalové odpovede a majú pronádorové funkcie. V súčasnosti však chýba dostatok informácií, ktoré by objasňovali prechod medzi protinádorovým fenotypom na pronádorový (13). Ďalším typom imunitných buniek, ktoré infiltrujú nádorové mikroprostredie, sú T lymfocyty. Podobne ako makrofágy, aj T lymfocyty môžu inhibovať alebo stimulovať nádorový rast. Prítomnosť veľkého množstva T lymfocytov, konkrétne aktivovaných cytotoxických T lymfocytov a Th buniek, koreluje s lepším prežívaním pacientov pri niektorých typoch nádorov, ako sú rakovina hrubého čreva, mnohopočetný myelóm, melanóm a rakovina pankreasu. Na druhej strane však bolo dokázané, že prítomnosť iných podtypov T lymfocytov v nádorovom mikroprostredí, ako napríklad CD8+ T lymfocyty, IFN- γ -produkujúce Th1 bunky, Th2 a Th17 bunky, prispieva k progresii a metastázovaniu nádorov (14).

Jedným z kritických krokov pri progresii nádorov je vyhnúť sa deštrukcii imunitným systémom. Toto sa môže dosiahnuť buď inhibíciou funkcií efektorových buniek imunitného systému, alebo prostredníctvom stimulácie imunosupresívnych buniek. Práve využitie aktivity „myeloid-derived suppressor cells (MDSC)“ je jedným z najčastejších mechanizmov, ktoré nádorové bunky využívajú, aby unikli imunitnému systému. MDSC sú mobilizované počas tumorigenézy, infiltrujú vznikajúci nádor, kde následne podporujú nádorovú vaskularizáciu a narúšajú hlavné mechanizmy imunitného dohľadu, ako sú antigénna prezentácia dendritovými bunkami, aktivácia T lymfocytov, M1 polarizácia makrofágov a aktivita NK buniek. Ďalším typom buniek, ktoré sa môžu podieľať na modulácii imunitnej odpovedi proti nádoru, sú regulačné T lymfocyty (Treg). Podobne ako MDSC, aj Treg bunky potláčajú antigénnu prezentáciu, interferujú s cytotoxickými T lymfocytmi a inhibujú uvoľňovanie cytolytických granúl (13). Jediným typom imunitných buniek, ktoré pravdepodobne nemajú pronádorové funkcie, sú NK bunky (15).

Súčasné poznatky z onkologického výskumu naznačujú, že ak chceme efektívne bojovať proti nádorovému ochoreniu, musíme sa naň pozeráť ako na ochorenie, ktoré zahŕňa komplexné heterotypické interakcie v rámci novovytvoreného tkaniva, t. j. nádorového tkaniva. Tieto zistenia prinášajú nové príležitosti pre vývoj ďalších terapeutických prístupov namierených na interakcie medzi nádorom a jeho mikroprostredím. Preto je veľmi dôležité neustále prehľbovať naše poznatky o vzájomných interakciách medzi nádorovými bunkami a ich mikroprostredím.

Navrhli sme experimentálny trojrozmerný kultivačný systém, ktorý je založený na kokultivácii aktivovaných kožných fibroblastov a leukemických buniek. Kultiváciu kožných fibroblastov v 3D kultúre dochádza k ich aktivácii procesom nemózy, výsledkom čoho je produkcia širokého spektra prozápalových cytokínov (IL-1 β , IL-6, IL-8, prostaglandíny) a rastových faktorov (HGF) aktivovanými fibroblastmi. Následná kokultivácia s leukemickými bunkami nám umožňuje sledovať schopnosť aktivovaných fibroblastov ovplyvniť rast a fenotyp kokultivovaných leukemických buniek. V našich experimentoch sme ukázali, že nemózou aktivované kožné fibroblasty aj stromálne fibroblasty izolované z kostnej drene majú schopnosť ovplyvniť rast a fenotyp kokultivovaných leukemických buniek. Analýza ukázala významnú variabilitu v schopnosti jednotlivých vzoriek ovplyvniť rast vybraných leukemických

bunkových línií, ktorá sa pohybovala v rozmedzí evidentnej inhibície až po masívnu stimuláciu rastu. Aktivované stromálne bunky boli schopné ovplyvniť aj niektoré fenotypové znaky leukemických buniek. Bude dôležité korelovať získané výsledky s prognózou a zdravotným stavom jednotlivých pacientov.

Mikrobióm v etiológii nádorových ochorení

Predpokladá sa, že približne 20 % všetkých nádorových ochorení má infekčné pozadie s celkovým počtom 1,2 milióna prípadov ročne. Odhalenie úlohy mikroorganizmov v etiológii karcinogenézy a obnovenie porušenej rovnováhy medzi komenzálnymi a patogénnymi bakteriálnymi kmeňmi sú dôležité nielen z pohľadu prevencie, ale aj liečby určitých foriem nádorových ochorení. Jednou z najpresvedčivejších asociácií je spojitosť medzi baktériami *Helicobacter pylori* a karcinómom žalúdka, ako aj lymfómom asociovaným s mukózou (16). Súhrn mikroorganizmov a ich genetického materiálu sa označuje pojmom mikrobióm. V súčasnosti prebieha komplexná charakterizácia zdravej ľudskej mikroflóry (Human Microbiome Project, NIH, USA) s cieľom analyzovať vplyv mikroorganizmov osídľujúcich jednotlivé oblasti ľudského tela v kontexte so zdravím a s chorobou (17).

Vďaka svojej bezprostrednej interakcii s imunitným systémom hostiteľa by mohla byť gastrointestinálna mikroflóra považovaná za „kardinálny mikrobióm“. Jej zloženie je unikátne a okrem iného ovplyvnené stravou, užívaním antibiotík a genetickými faktormi. Symbiotické baktérie poskytujú svojmu hostiteľovi viaceré výhody. Podieľajú sa na vývine a funkčnosti imunitného systému, degradácii metabolických produktov, syntéze vitamínov, ochrane pred kolonizáciou patogénmi a prispievajú k maturácii črevnej mukózy. V súčasnosti sa poukazuje aj na úlohu črevnej mikroflóry pri regulácii bunkovej proliferácie, diferenciácie a expresie génov v hostiteľských epitelových bunkách. Dysbióza v intestinálnej mikroflóre vytvára podmienky na chronický zápal a produkciu karcinogénnych metabolitov, čo môže následne viesť k vzniku neoplázií. Pri viacerých bakteriálnych druhoch, napríklad *Streptococcus bovis*, *Escherichia coli* a najnovšie aj pri *Fusobacterium* sp., bola preukázaná priama asociácia s rozvojom kolorektálneho karcinómu.

Experimentálne aj klinické štúdie potvrdili, že porušenie rovnováhy v gastrointestinálnej mikroflóre sa dá modulovať účinkom probiotických baktérií. Probiotiká sú charakteri-

zované ako živé organizmy, ktoré pri podaní v dostatočnom množstve vyvolajú zlepšenie zdravotného stavu hostiteľa (definícia WHO, 2001). Reprezentatívnymi zástupcami probiotických baktérií sú najmä rody *Lactobacillus* sp. a *Bifidobacterium* sp. Základnou vlastnosťou probiotických baktérií je príľnavosť k bunkám črevnej sliznice, čím sa umožní kompetitívne vytesňovanie patogénov. Kontaktom s bunkami lymfatického tkaniva čreva (GALT) dochádza k aktivácii viacerých mechanizmov imunitného systému prostredníctvom NOD like receptorov a Toll like receptorov (TLR). Protektívny vplyv probiotík bol potvrdený v prevencii ochorení gastrointestinálneho traktu a redukcii zápalu žalúdočnej sliznice pri infekcii s *Helicobacter pylori*.

Vzhľadom na dlhoročné skúsenosti s molekulárno-genetickou diagnostikou pacientov s familiárnou adenomatóznou polypózou (FAP) sa v rámci našich štúdií zameriavame na sledovanie bakteriálnej mikroflóry u pacientov s dedičnou formou kolorektálneho karcinómu. Pokúsili sme sa poukázať na možnú existenciu horizontálneho prenosu genetickej informácie medzi hostiteľom a zástupcami črevnej mikroflóry. Mutácie v géne adenomatous polyposis coli (*APC*) sú iniciačným krokom v procese kolorektálnej tumorigenézy. Analýza baktérií izolovaných z rektálnych vzoriek FAP pacientov odhalila prítomnosť APC-like sekvencií, ktoré vykazovali viac ako 90 % homológiu s ľudským génom (*APC*). Charakterizácia testovaných baktérií ukázala takmer 90 % zastúpenie bakteriálneho kmeňa *E. coli* (18, 19). V bioptických vzorkách polypov a karcinómov hrubého čreva sme dokázali signifikantne zvýšenú prítomnosť intracelulárne lokalizovaných baktérií oproti vzorkám zo zdravej sliznice. Pripravili sme bakteriálny vektor s naklonovaným *APC* génom a podávanie rekombinantných baktérií znížilo počet polypov v tráviacom trakte *Apc*^{Min/+} myši a zlepšilo ich zdravotný stav (20). Jednou z progresívnych možností prevencie vzniku febrilnej neutropénie u liečených onkologických pacientov je eliminácia črevných patogénov podávaním probiotických baktérií. Aplikáciou probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* M-74 u pacientov liečených chemoterapiou pre nádor z germinatívnych buniek, neskôr u pacientov s relapsom po akútnej leukémii, sme poskytli prvý dôkaz bezpečnosti probiotika u pacientov liečených chemoterapiou. Výsledky a klinické dosahy štúdií s podávaním probiotík u onkologických pacientov boli sumarizované v prehľadnom článku (21). Počet dôkazov, ktoré otvárajú otázku možnej kauzálnej úlohy ľudskej

mikroflóry v etiológii nádorových ochorení, neustále narastá najmä v rámci gastrointestinálneho traktu. Priaznivé, ale aj negatívne účinky mikroorganizmov na fyziológiu hostiteľa sú dosiaľ málo preštudované, preto je potrebné identifikovať a overiť kľúčové interakcie na úrovni mikroorganizmus/hostiteľ.

Cytoanalytika: bunky a nanoštruktúry

Nádorová heterogenita je všeobecne akceptovaným fenoménom na vysvetlenie relapsu ochorenia ako dôsledok zmnoženia subpopulácie rezistentných maligných buniek. Ich rastový potenciál sa môže naplno prejavovať v nádorovom mikroprostredí po odstránení senzitivných buniek podanou liečbou, a aj vďaka vlastnej rezistencii na túto liečbu. Skúmanie heterogenity na úrovni odlišností v expresii povrchových proteínov umožnilo zavedenie produkcie monoklonových protilátok s definovanou reaktivitou a rozširujúce sa spektrum fluorochrómov pre analýzu pomocou prietokovej cytometrie. Prvýkrát na Slovensku túto technológiu použil v roku 1987 kolektív MUDr. B. Chorvátha pre charakterizáciu nových monoklonálnych protilátok vyrobených na ÚEO SAV (22). Prietoková cytometria významným spôsobom prispela k rýchlej a presnej diagnostike krvných malignít, s uplatnením znalosti aberantného fenotypu na sledovanie minimálnej zvyškovej choroby, čoho dôkazom je práca MUDr. O. Babušíkovej a kolektívu, publikovaná v roku 1994 (23). Štvrtstoročie používania prietokovej cytometrie v experimentálnej práci prinieslo najmenej 70 vedeckých publikácií s množstvom zásadných poznatkov, naposledy o jadrových erytrocytových prekurzoroch v regenerujúcej sa kostnej dreni (24). Časopis Onkológia eviduje aj jeden „cytoanalytický“ primát, a to publikovaním výsledkov analýzy erytrocytových prekurzorov použitím digitálnej obrazovej prietokovej cytometrie (25). Dnes sa naše výskumné aktivity posúvajú na subcelulárne štruktúry a do oblastí nanosveta. Prietoková cytometria dovoľuje merať na úrovni každej bunky potenciál mitochondrií, vnútrobunkový redox stav, funkčnosť proteínov zabezpečujúcich rezistenciu, pozíciu bunky vo fáze bunkového cyklu či aktivitu lyzozómov (26). Otvára sa nová oblasť skúmania medzibunkovej komunikácie, ktorá sa deje prostredníctvom sekretovaných intraluminálnych vezikúl – exozómov s veľkosťou 30 – 100 nm. Produkujú ich živé bunky počas normálnych i patofyziologických podmienok, ako sú laktácia, imunitná odpoveď či neurodegeneratívne

ochorenia alebo rakovina. Tvoria sa vchĺpením membrány neskorého endozómu, pričom pochľujú molekuly vnútrobunkového priestoru, ktoré sa tak dostanú do vnútra intraluminálnych vezikúl. Tieto sú exocytózou vylučované z bunky do mimobunkového priestoru, a tak ich môžeme nájsť vo väčšine telesných tekutín, ako sú krv, sliny, moč, amniotická tekutina či výpotky. Bolo pozorované, že nádorové bunky produkujú exozómy vo väčšom množstve než normálne bunky. Potvrdili to aj merania v sérach pacientov s nádormi prostaty, prsníka a ovárií. Taktiež boli potvrdené rozdiely v zložení „nákladu“, ktoré nesú exozómy normálnych a nádorových buniek. Keďže tento „náklad“ predstavujú proteíny, lipidy, RNA a hlavne malé (22 – 25 nukleotidov) nekódujúce mikroRNA (miRNA), predpokladá sa ich využitie v oblasti včasnej diagnostiky ako „tekutej“ biopsie nádoru. Vďaka aktivite Nadácie Výskum rakoviny máme možnosť stanoviť v biologických vzorkách súčasne množstvo exozómov a určiť ich priemernú veľkosť pomocou zariadenia Nanosight a programového vybavenia NTA (nanoparticle tracking analysis). NTA je založená na sledovaní Brownovho pohybu jednotlivých nanočastíc v oblasti 10 – 1000 nm s možnosťou fluorescenčného odlíšenia častíc, čo predstavuje dobré východisko na kvantitatívnu a kvalitatívnu analýzu exozómov.

Záver

Výskum biológie nádorových buniek sa posúva smerom k pochopeniu komplexných vzťahov a komunikácie nádorových buniek v rámci ich lokálneho mikroprostredia, v rámci organizmu a aj vo vzťahu k neoddeliteľnej fyziologickej interakcii organizmu s mikrobiómom. Hlbšie a detailnejšie poznanie nádorovej heterogenity a súčasné možnosti identifikácie jednotlivých funkčne odlišných nádorových buniek sú predzvesťou nových cytoanalytických metód, ktoré budú postupne zavedené do klinickej praxe.

Podakovanie

Autori vyjadrujú vďaka všetkým kolegom za cenné rady, pripomienky a konštruktívnu spoluprácu pri príprave rukopisu a experimentálnej práci citovanej v rukopise. Práca a experimenty boli podporené grantmi Agentúry pre podporu výskumu a vývoja APVV-0052-12, APVV-0230-11, APVV-0646-11, grantmi vedeckej grantovej agentúry VEGA 2/0171/13, 2/0170/13, 2/0096/11, 2/0124/13, 2/0087/15, finančným príspevkom Nadácie Výskum rakoviny RFL2009, RFL2012 a projektami OP VaV financovanými zo zdrojov ERDF ITMS - 26240220071 a ITMS – 26240220087.

Literatúra

- Mbeunkui F, Johann DJ Jr. Cancer and tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;63(4):571–582.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
- Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(8):911–916.
- Kucerova L, Feketeova L, Kozovska Z, et al. In vivo 5FU-exposed human medullary thyroid carcinoma cells contain a chemoresistant CD133+ tumor-initiating cell subset. *Thyroid*. 2014;24(3):520–532.
- Ginestier C, Liu S, Diebel ME, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest*. 2010;120(2):485–497.
- Kucerova L, Skolekova S, Matuskova M, et al. Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer*. 2013;13:535.
- Kucerova L, Skolekova S. Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells. *Neoplasma*. 2013;60(1):1–10.
- Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):497–512.
- Sounni NE, Noel A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin Chem*. 2013;59(1):85–93.
- Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*. 2013;4(1):66–83.
- Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci*. 2011;7(5):651–658.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073–1081.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423–1437.
- Demaria S, Pikarsky E, Karin M, et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother*. 2010;33(4):335–351.
- Grivnenkov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–899.
- Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):28–37.
- The NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12):2317–2323.
- Holec V, Ciernikova Z, Waschmannova L, et al. Analysis of bacteria from intestinal tract of FAP patients for the presence of APC-like sequences. *Med Sci Monit*. 2012;18(8):CR486–492.
- Hainova K, Adamcikova Z, Ciernikova S, et al. Intestinal flora of FAP patients containing APC-like sequences. *Neoplasma*. 2014;61(3):283–290.
- Adamcikova Z, et al., Waschmannova L, Hainova K, et al. Study of the APC gene function in the mouse APC+/APC1638N model. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33(1):26–33.
- Mego M, Holec V, Drgona L. Probiotic bacteria in cancer patients undergoing chemotherapy and radiation therapy. *Complement Ther Med*. 2013;21(6):712–723.
- Chorvath B, Duraj J, Sedlak J, et al. Supplementary characteristics of anti-MHC class II monoclonal antibodies elicited by an ALL cell line: immunofluorescence cytofluorometry, C-dependent cytotoxicity, two-dimensional analysis of antigen. *Neoplasma*. 1987;34(4):417–425.
- Babusikova O, Glasova M, Kusenda J, et al. Flow cytometric determination of leukemia-associated marker combinations for the study of minimal residual disease. *Neoplasma*. 1994;41(6):305–313.
- Fajtova M, Kovarikova A, Svec P, et al. Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(11):2523–2530.
- Fajtova M, Gabelova A, Chovanec M, et al. Identifikácia jadrových erytrocytových prekursorov pomocou prietokovej obrazovej cytometrie – ImageStreamX. *Onkológia(Bratislava)*. 2013;8(1):48–49.
- Pastorek M, Gronosova P, Cholujova D, et al. Realgar (As4S4) nanoparticles and arsenic trioxide (As2O3) induced autophagy and apoptosis in human melanoma cells in vitro. *Neoplasma*. 2014;61(6):700–709.

Mgr. Lucia Kučerová, PhD.

Oddelenie molekulárnej onkológie
Ústav experimentálnej onkológie SAV
Vlárska 7, 833 91 Bratislava
lucia.kucerova@savba.sk