

Stanične linije u istraživanju malignih tumora

Hribljan, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:217:630031>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**STANIČNE LINIJE U ISTRAŽIVANJU MALIGNIH
TUMORA**

CELL LINES IN CANCER RESEARCH

SEMINARSKI RAD

Valentina Hribljan
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentorica: doc. dr. sc. Petra Korać

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. USPOREDBA STANIČNIH LINIJA S DRUGIM EKSPERIMENTALNIM MODELIMA.....	3
3. UTJECAJ UVJETA U STANIČNOJ KULTURI NA GENOTIP I FENOTIP STANIČNIH LINIJA.....	6
4. KARAKTERIZACIJA STANICA MALIGNIH TUMORA MOLEKULARNIM METODAMA – PERSONALIZIRANA MEDICINA I ODABIR REPREZENTATIVNIH STANIČNIH LINIJA	9
5. NEKE OD NAJČEŠĆE KORIŠTENIH STANIČNIH LINIJA	12
5.1. HeLa	12
5.2. HepG2.....	13
5.3. Caco-2.....	13
5.4. MDA-MB-231	13
5.5. PANC-1	14
6. STANIČNE LINIJE MALIGNIH TUMORA - MODELI ZA DOBIVANJE TUMORSKIH MATIČNIH STANICA	15
7. ZAKLJUČAK	16
8. LITERATURA	17
9. SAŽETAK	21
10. SUMMARY	22

1. UVOD

Maligni tumori su jedna od najzastupljenijih i najsmrtonosnijih bolesti modernog doba. Maligni tumori različitih tipova stanica, tj. tkiva, do neke mjere su slični – svi pokazuju određene karakteristike koje omogućavaju klonalnu ekspanziju, angiogenezu i metastaziranje (Hanahan i Weinberg 2011).

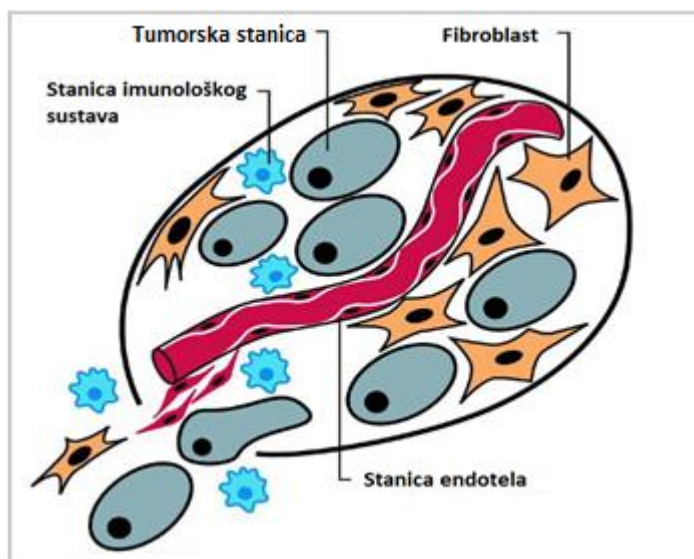
Postoje tri glavna modela koji se koriste u istraživanju malignih tumora: primarne kulture tumorskog tkiva, životinjski modeli te stanične linije. Većina staničnih linija koje se koriste u istraživanju malignih tumora zapravo su stanice koje su toliko promijenjene da mogu preživjeti i izvan organizma ukoliko im se osiguraju određeni uvjeti (tablica 1.), a najčešće su izvađene iz tumora čovjeka.

Stanične linije koriste se u istraživanjima malignih tumora od 1951. godine kada je George Gay, u bolnici Johns Hopkins u Baltimoreu, prvi puta uspio održati stanice malignog tumora u kulturi. Prva stanična linija dobila je ime HeLa, po Henrietti Lacks, ženi iz čijeg je karcinoma vrata grlića maternice izolirana (Beskow 2016). Do danas je ostala jedna od najkorištenijih i najvažnijih staničnih linija. Raznolikost tumora zahtijeva i raznolikost staničnih linija koje se koriste u istraživanjima, iz tog razloga danas postoji više od 1000 staničnih linija malignih tumora.

2. USPOREDBA STANIČNIH LINIJA S DRUGIM EKSPERIMENTALNIM MODELIMA

Modeli koji se najviše koriste u istraživanjima tumora su: primarne stanične kulture tumora uzete direktno iz oboljele osobe, životinjski modeli te stanične linije. Svaki od navedenih modela ima prednosti i nedostatke, pa je stoga potrebno odabrati odgovarajući model ovisno o tipu, tj. cilju istraživanja.

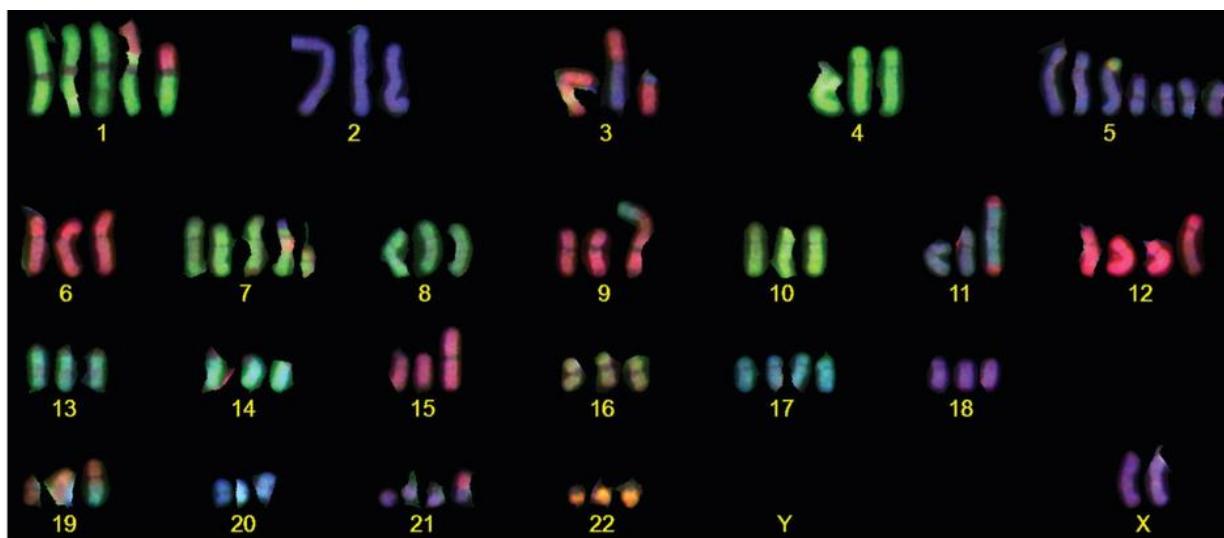
Stanične linije predstavljaju jedan od više tipova stanica koje čine tkivo malignog tumora (slika 1.), a to su same tumorske stanice. One se u tkivu malignog tumora *in vivo* nalaze u mikrookolišu kojeg čine fibroblasti povezani s tumorom, endotelne stanice, stanice imunološkog sustava te citokini, kemokini i faktori rasta koje te stanice izlučuju, a koji utječu na ekspresiju gena tumorskih stanica (Li i sur. 2007). Nedostatak odgovarajućeg mikrookoliša činjenica je na koju treba obratiti pažnju prilikom korištenja staničnih linija u istraživanju tumora.



Slika 1. Prikaz heterogenosti stanica tkiva malignog tumora. (Preuzeto i prilagođeno na temelju rada Hanhan i Weinberg 2000.)

Primarne kulture tumora uzete iz pojedinca moguće je održati u kulturi u vremenu mjerenom u danima. One se najčešće uzimaju iz nekoliko razloga: u svrhu dobivanja informacija o tumoru pojedinog pacijenta, kako bi se testiralo djelovanje pojedinih lijekova te kako bi se iz njih dobila potencijalna stanična linija. Sve stanične linije malignih tumora nastale su od primarne kulture tumora višestrukim diobama stanica. Stanične linije mogu se dobiti i od somatskih ne-tumorigenih stanica koje su prošle neke postupke imortalizacije kao što su npr. aktivacija nekog onkogeni ili telomeraze (Reddel i sur. 1995; Harada i sur. 2003). Stanice

malignog tumora čine osnovu bolesti, a nakupljanjem mutacija onkogenih i tumor-supresorskih gena u njima dolazi do progresije bolesti (Balmain i sur. 2003). Dakle, oba modela predstavljaju samo jedan od mnogih stadija razvitka malignog tumora, najčešće onaj posljednji, agresivni stadij u kojima se nalaze tumorske stanice s mnogobrojnim mutacijama. Stanične linije održavaju se u kulturi mjesecima i godinama tijekom kojih se nakupljaju mutacije kao što su duplikacije kromosoma te translokacije pojedinih kromosomskih segmenata na drugi kromosom (slika 2.). Iz tog razloga, primarne kulture više odgovaraju tumorima *in vivo*. S druge strane, prednost staničnih linija je njihova mnogobrojnost i laka dostupnost.



Slika 2. Kariotip stanične linije HeLa, napravljen metodom COBRA – FISH, na kojem su vidljive duplikacije svih kromosoma osim spolnog kromosoma X. Kod kromosoma: N1, N5, N7, N12, N17 i N21 radi se o višestrukim duplikacijama. Različite boje na pojedinim kromosomima ukazuju na translokacije. (Preuzeto iz Holkers i sur. 2014.)

Animalni modeli su životinje koje se koriste tijekom različitih istraživanja, sa svrhom da se poboljša razumijevanje različitih fizioloških i patoloških procesa kod čovjeka. Neke od životinja koje se koriste u istraživanju malignih tumora su: zebrice, kornjače, zečevi, kunići i primati (Wertman i sur. 2016; Oak i sur. 2015; Hay i sur. 2015; Tam i Polliack 2016;). Životinje koje se najčešće koriste u istraživanjima malignih tumora su laboratorijski miševi ili štakori koji su: (1) genetski predodređeni za razvitak tumora (u genomu imaju mutaciju/mutacije onkogenih i/ili tumor-supresor gena) ili (2) imunokompromitirane životinje u koje se transplantiraju tumorske stanice čovjeka s ciljem razvitka tumora, tzv. ksenografti. U oba slučaja radi se o genetski modificiranim životinjama: (1) modifikacija onkogenih ili tumor-supresor gena, te (2) modifikacija gena uključenih u imunosni odgovor. Za razliku od staničnih linija i primarnih kultura tumorskog tkiva, pomoću animalnih modela može se pratiti razvitak

malignih tumora od početnog stadija kada je tumor ograničen na određeni organ, njegovog rasta i diferencijacije stanica koje ga čine, pa sve do stadija u kojem dolazi do razvitka malignog tumora, tj. angiogeneze koja omogućava širenje tumorskih stanica krvotokom što često rezultira metastazama u drugim organima. Kod rada sa životinjskim modelima važna je činjenica da je mikrokoliš tumora različitih organizama različit, posebno se razlikuje tkivno specifična regulacija transkripcije i ekspresija proteina (Odom i sur. 2007).

3. UTJECAJ UVJETA U STANIČNOJ KULTURI NA GENOTIP I FENOTIP STANIČNIH LINIJA

Svaka stanična linja malignog tumora bila je dio čovjeka ili neke druge životinje. Premještanjem tumorskog tkiva na hranjivu podlogu mijenjaju se okolišni uvjeti. Takva stanična linija egzistira nekoliko mjeseci, godina ili desetljeća. Vrijeme i promjena okolišnih uvjeta preduvjeti su za prirodnu selekciju kojoj su stanične linije, kao biološki entiteti, podložne. Kao i tumori *in vivo*, stanične linije *in vitro* prilagođavaju svoj fenotip uz pomoć genetičkih i epigenetičkih mehanizama u odnosu na uvjete kojima su izložene (Olivotto i Sbarba 2008). Jedna od posljedica prilagodbe staničnih linija malignih tumora u kulturi je veća razlika u ekspresiji gena između staničnih linija i tumora kojeg predstavljaju nego između tumora i normalnog tkiva (Ertel i sur. 2006). Kod staničnih linija karcinoma dojke uočene su mutacije koje znatno pojačavaju aktivnost kinaza u usporedbi s tumorom *in vivo* (Stephens i sur. 2005).

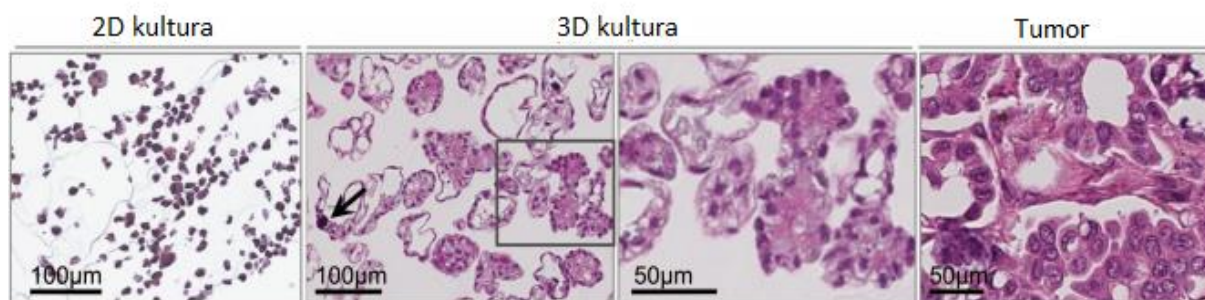
Iako djelovanje mehanizama prilagodbe staničnih linija u kulturi stvara razlike u odnosu na tumore iz kojih su dobivene, ti se procesi mogu iskoristiti za stvaranje određenih selekcijskih pritisaka i istraživanje njihovih posljedica na fenotip i genotip može dati informacije koje mogu pomoći kod razvoja najefikasnijih terapijskih postupaka (Merlo i sur. 2006). Tretiranje staničnih linija kemoterapeutikom može poslužiti kao selekcijski pritisak za dobivanje rezistentnih klonova na kojima će se identificirati markeri odgovorni za rezistenciju (Tegze i sur. 2012).

Uvjeti u kojima rastu stanice malignog tumora u kulturi razlikuju se od onih *in vivo* (tablica 1.). Optimiziranjem uvjeta u kulturi u kojoj rastu stanice malignih tumora, moguće ih je učiniti sličnijima tumoru *in vivo* kako bi se rezultati dobiveni na staničnim linijama vjernije mogli preslikati na tumore. Uzgoj u fiziološkim uvjetima kao što je medij bez seruma, specijalne podloge s matriksom (izvanstaničnom tvari koja čini biokemijsku i strukturnu potporu stanicama) i niskom koncentracijom kisika, rezultiralo je većom sličnošću staničnih linija karcinomu dojke *in vivo* (Shay i Wright 2007; Ince i sur. 2007). Stanice glioma koje su rasle u mediju sa serumom postale su homogene, nalik na fibroblaste, imale su eksponencijalni rast i različitu ekspresiju gena, dok su stanice u mediju bez seruma bile sličnije tumoru (De Witt Hamer i sur. 2008).

Tablica 1. Usporedba uvjeta rasta tumorskih stanica *in vivo* (solidni tumori) s uvjetima u staničnoj kulturi *in vitro*. (Preuzeto i prilagođeno na temelju van Staveren i sur. 2009.)

Uvjeti	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
p (O ₂)	0,01-0,05 atm	0,02-0,95 atm
Koncentracija seruma	<1%	3-10%
Koncentracija supstrata	Fiziološka	Optimalna za rast
Razina faktora rasta	Fiziološka	Optimalna za rast
Razina inzulina	Fiziološka	Maksimalna
Gustoća	Visoka	Niska – visoka
3D/2D	3D	2D ili 3D
Polarnost	Prisutna	Izgubljena ili zadržana ovisno o uvjetima kulture
Matriks	Normalan	Umjetni adhezivni supstrat? Supstrat?

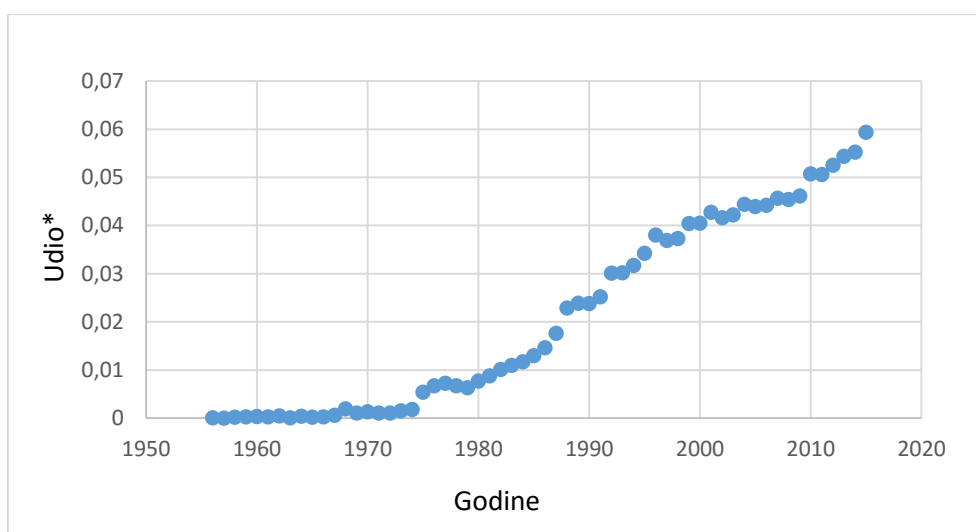
Stanice malignih tumora mogu se uzgajati u dvodimenzionalnoj (2D) ili u trodimenzionalnoj (3D) kulturi. U 2D kulturi stanice rastu u jednom sloju, okružene drugim stanicama samo na periferiji, ispod njih se nalazi staklo ili plastika te ne postoji gradijent kisika i hranjivih tvari. U takvoj kulturi inhibirana je sposobnost stanica da tvore višedimenzionalne strukture i ne postoji višestanični mikrookoliš kao u uvjetima *in vivo*. Iako su stanice koje su rasle u 2D kulturi imale velik doprinos u istraživanju malignih tumora, pokazale su se lošim modelom za istraživanje lijekova (Hutchinson i Kirk 2011). S druge strane, stanice koje su rasle u 3D kulturi pokazale su različit obrazac ekspresije gena u usporedbi s istim stanicama koje su rasle u jednom sloju (Myungjin Lee i sur. 2013; Luca i sur. 2013). U trodimenzionalnoj kulturi stanične linije su sferoidne i u takvom obliku zadrže obilježja tumorskih stanica koja se u dvodimenzionalnom mediju izgube (slika 3.), a to su stanična polarnost i heterogena struktura. U 3D kulturama stanice rastu u izvanstaničnom matriksu pa je tako moguće manipulirati nekim komponentama mikrookoliša čineći ga sličnijim onom u tumoru *in vivo*.



Slika 3. Stanična linija karcinoma jajnika OAW42 u 2D i 3D kulturi. 3D kultura pokazuje stanice nalik onima karcinoma jajnika *in vivo*, prikazan desno. Trodimenzionalna kultura pokazuje i psamomska tjelešca (strelica), kalcificirane okrugle strukture koje se nalaze u nekim tumorima. (Preuzeto i prilagođeno na temelju Myungjin Lee i sur. 2013.)

4. KARAKTERIZACIJA STANICA MALIGNIH TUMORA MOLEKULARNIM METODAMA – PERSONALIZIRANA MEDICINA I ODABIR REPREZENTATIVNIH STANIČNIH LINIJA

Upotreba staničnih linija u istraživanju malignih tumora raste iz godine u godinu (slika 4.), a jedan od razloga te činjenice potencijalno je i razvoj metoda koje omogućuju karakterizaciju stanica raka na molekularnoj razini - genomike, transkriptomike i proteomike. Time se omogućava personalizirana medicina i odabir najprikladnijih staničnih linija koje će se koristiti u nekom istraživanju.

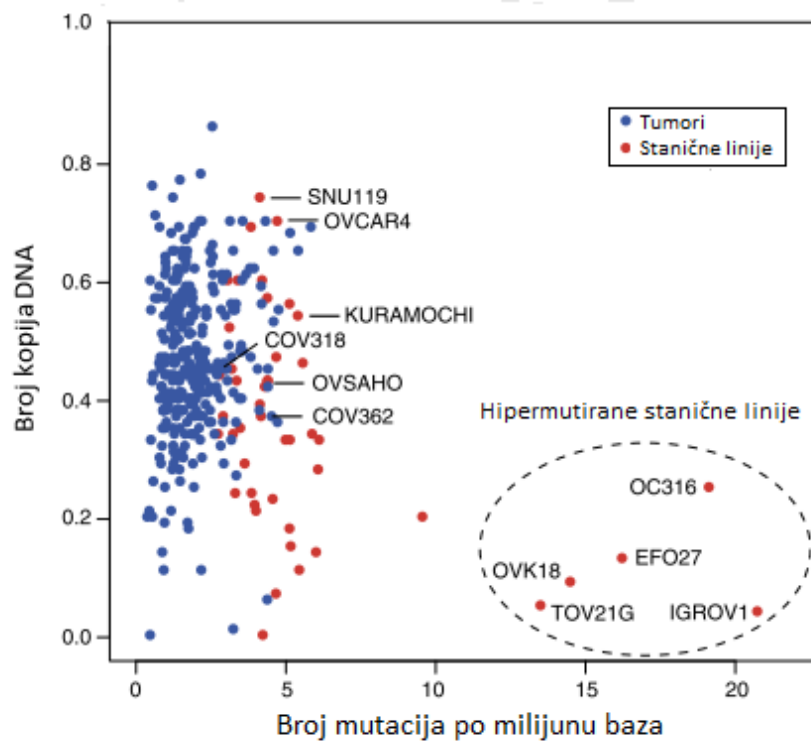


Slika 4. Prikaz porasta zastupljenosti staničnih linija u istraživanju malignih tumora. Udio* je dobiven dijeljenjem broja radova nađenih na PubMed-u za sintagmu: „*cancer cell lines*“ s brojem radova nađenih za riječ: „*cancer*“ za svaku godinu počevši od 1956. godine kada se pojavljuje prvi rad koji sadrži sintagmu: „*cancer cell lines*“, zaključno sa 2015. godinom.

Personalizirana medicina odnosi se na liječenje određene bolesti koje je prilagođeno pojedincu. Kako bi se odabrala najbolja metoda liječenja malignih tumora, potrebno je provesti pretklinička istraživanja. Ona se mogu napraviti na primarnim kulturama tumora uzetih iz pacijenta ili na staničnim linijama koje su genetički slične određenom tumoru. Druga varijanta je brža i jednostavnija. Prvi panel staničnih linija malignih tumora, kojim se pokušala obuhvatiti raznolikost odgovora na kemoterapiju detektiranih u klinici za određeni tip tumora, razvijen je u SAD-u 1990. godine pod nazivom NCI-60 (od eng. *National Cancer Institute 60*) prema nacionalnom institutu za istraživanje malignih tumora. Panel je sadržavao 60 staničnih linija koje su predstavljale 9 različitih tipova tumora (Shoemaker 2006). Japanska fondacija za istraživanje malignih tumora (od eng. *Japanese Foundation for Cancer Research*), nekoliko

godina kasnije, razvila je svojih 39 staničnih linija koje su također predstavljale 9 različitih tipova tumora (Yamori i sur. 1999). Dva panela dijelila su 30 staničnih linija. U japanskom panelu postojalo je 6 staničnih linija kojih nije bilo u američkom. One su predstavljale modele za karcinom želuca koji je bio čest u japanskoj populaciji.

Danas je dostupan veliki set molekularnih profila za stanične linije malignih tumora i uzorke tumorskih tkiva. U Atlasu genoma malignih tumora (TCGA od eng. *The Cancer Genome Atlas*) analizirani su genomi i ekspresijski profili za najmanje 500 uzoraka tkiva po tipu tumora dok se u Enciklopediji staničnih linija malignih tumora (CCLE od eng. *Cancer Cell line Encyclopedia*) nalaze podaci o genomskim profilima oko 1000 staničnih linija koje se koriste kao modeli za različite tipove tumora (Barretina i sur. 2012). Atlas i Enciklopedija omogućuju usporedbu genoma i transkriptoma tumora *in vivo* i staničnih linija, a time i odabir staničnih linija koje predstavljaju najbolje modele za pojedine tipove tumora. Uspoređujući genetičku sličnost 47 staničnih linija malignih tumora koje predstavljaju modele za HGSOE (od eng. *High-grade serous ovarian cancer*) podtip karcinoma jajnika sa uzorcima tkiva istog karcinoma koristeći podatke iz Enciklopedije i Atlasa, Domcke i suradnici došli su do zaključka da najčešće korištene stanične linije ne predstavljaju najbolje modele te predlažu uporabu drugih staničnih linija, koje se rijetko koriste, a i genetički su sličnije malignim tumorima *in vivo* (Domcke i sur. 2013). Identificirano je 5 staničnih linija koje su hipermutirane i koje bi svakako trebalo izbjegavati (slika 5.). Stanična linija IGROV1 (jedna od 5 hipermutiranih) vjerojatno ne predstavlja podtip tumora HGAOC, a jedna je od nekoliko najkorištenijih u istraživanju tog podtipa. Ovakva istraživanja potrebno je napraviti i za ostale tipove tumora kako bi se odabrali najbolji modeli koji bi dali što reprezentativnije rezultate.



Slika 5. Usporedba frekvencije mutacija (horizontalno) i udjela genoma zahvaćenog HGSOC promjenom broja kopija DNA (vertikalno) za podtip tumora jajnika HGSOC (plavo) i staničnih linija karcinoma jajnika (crveno) otkriva stanične linije (iscrtkana elipsa) s hipermutiranim genotipom (visoka stopa mutacija, mali broj promjena kopija DNA). (Preuzeto i prilagođeno na temelju Domcke i sur. 2013.)

5. NEKE OD NAJČEŠĆE KORIŠTENIH STANIČNIH LINIJA

Postoji više od 1000 različitih staničnih linija malignih tumora, a neke su korištenije od drugih. Osim u istraživanjima tumora, stanične linije malignih tumora mogu se koristiti i u druge svrhe kao npr. za testiranje toksičnosti nekih tvari, u istraživanjima djelovanja virusa i bakterija na stanice čovjeka itd. U daljnjem tekstu opisane su stanične linije: HeLa, HepG2, Caco-2, PANC-1 i MDA-MB-231. Navedeno je i nekoliko od mnogih istraživanja koja su na njima napravljena (tablica 2.) Navedenim staničnim linijama zajedničko je da se koriste u istraživanjima nekoliko desetljeća.

Tablica 2. Prikaz broja znanstvenih radova u bazi PubMed u kojima se spominje pojedina od staničnih linija. Pristupljeno bazi PubMed 12. rujna 2016. godine.

Stanična linija	Broj publikacija u bazi PubMed
HeLa	90561
HepG2	20530
Caco-2	14378
MDA-MB-231	9488
PANC-1	2183

5.1. HeLa

Godine 1951. George Gey u bolnici Johns Hopkins u Baltimoreu prvi puta je uspio u kulturi održati stanice malignog tumora čovjeka. Stanična linija nazvana je HeLa po Henrietti Lacks, tridesetjednogodišnjoj ženi iz čijeg su karcinoma vrata maternice izolirane tumorske stanice. Stanična linija se ubrzo proširila po laboratorijima diljem svijeta, a o njenoj važnosti govori činjenica da ju mnogi nazivaju majkom moderne medicine. Naime, HeLa stanična linija osim u istraživanjima malignih tumora, imala je doprinos u testiranju cjepiva kao što je npr. cjepivo za poliovirus (Turner 2012), u razumijevanju virusnog reprogramiranja stanice (Corcoran i sur. 2015), pomoću nje je usavršen uzgoj kultura stanica i tkiva (Masuda i sur. 2015), rađena su istraživanja utjecaja radijacije i toksičnih tvari na stanice (Luchette i sur. 2014) itd. Stanice su održavane u kulturi dugi niz godina što se očituje i na njihovom kariotipu - broj kromosoma se kreće od 70 do 164 ovisno o stanici.

Supresija gena *SOX9*, koji je u HeLa stanicama prekomjerno eksprimiran, uzrokuje proliferaciju stanica u kulturi što navodi do zaključka da je *SOX9* potencijalni tumor-

supresorski gen aktivan u karcinomima vrata maternice (Wang i sur. 2015). Na staničnoj liniji HeLa utvrđeno je da kombinacija dvaju lijekova – miricetina i metileugenola daje bolje rezultate u liječenju karcinoma vrata maternice u usporedbi s korištenjem samo jednog od navedenih lijekova (Yi i sur. 2015).

5.2. HepG2

HepG2 stanična linija predstavlja *in vitro* model hepatoma – karcinoma nastalog od hepatocita (HCC od eng. *Hepatocellular carcinoma*). Izolirana je iz petnaestogodišnjeg dječaka. Broj kromosoma u stanici kreće se od 50 do 60. Stanice eksprimiraju mnoge gene koje eksprimiraju i normalni hepatociti, a to su npr. geni za albumin, transferin, haptoglobin itd.

Flavonoidi bi mogli biti potencijalni lijek za hepatocelularni karcinom jer uzrokuju apoptozu u staničnoj liniji HepG2 (Xia i sur. 2013). Neki tanini iz zelenog čaja također uzrokuju apoptozu u navedenoj staničnoj liniji (Han i sur. 2014).

Trovanje hranom uzrokovano bakterijom *Bacillus cereus* može dovesti do prekida rada jetre a time i smrti zaražene osobe (Veyseyre i sur.). Uzrok toga je emetički toksin koji je metabolički produkt bakterije. Djelovanje emetičkog toksina koncentracije 0.01 - 0.08 ng/ml na staničnu liniju HepG2, koja u ovom slučaju predstavlja *in vitro* model hepatocita, rezultira vakuolizacijom citosola (Kamata i sur. 2012).

5.3. Caco-2

Stanična linija Caco-2 predstavlja *in vitro* model karcinoma kolona. Izolirana je iz sedamdesetdvogodišnjeg muškarca. Prosječan broj kromosoma u stanici je 96. Y kromosom nije detektiran. Stanice eksprimiraju gene za keratin, protein koji veže retinoičnu kiselinu 1 te protein koji veže retinoičnu kiselinu 2.

Stanična linija je najčešći *in vitro* model koji se koristi u istraživanjima apsorpcije lijekova u probavnom sustavu (Borchardt 2011). Apsorpcija kvercetina u stanicama Caco-2 ubrzava se njegovom esterifikacijom (Hu i sur. 2016) Palmitoiletanolamid ima antiproliferativno djelovanje na staničnu liniju Caco-2 u staničnoj kulturi (Sarnelli i sur. 2016).

5.4. MDA-MB-231

Stanična linija MDA-MB-231 izolirana je iz karcinoma dojke pedesetjednogodišnje žene. Broj kromosoma u stanicama kreće se između 62 i 68, a prosječni broj je 64. Normalni kromosomi N8 i N15 nedostaju. Stanice eksprimiraju onkogen *WNT7B*.

Utišavanje gena *DUSP6* u staničnoj liniji MDA-MB-231 inhibira proliferaciju stanica (Song i sur. 2015). Etanolni ekstrakt iz biljke *Cyperus rotundus* inducira apoptozu aktivirajući kaspaze (Park i sur. 2014). Stanice MDA-MB-231 koriste protein Hsp90a (od eng. *Heat Shock Protein-90alpha*) kako bi preživjele hipoksične uvjete (Dong i sur. 2016)

5.5. PANC-1

Stanična linija PANC-1 uzeta je iz karcinoma gušterače pedesetšestogodišnjeg muškarca. Prosječni broj kromosoma u stanici iznosi 63. Stanice mogu rasti na glatkom agaru.

Kvercetin uzrokuje apoptozu u staničnoj liniji PANC-1 (Lee i sur. 2013) Acetilšikonin inhibira proliferaciju stanica regulirajući signalni put NF- κ B (Cho i Choi 2015). Uvjete manjka nutrijenata stanice preživljavaju autofagijom (Kim i sur. 2015)

6. STANIČNE LINIJE MALIGNIH TUMORA - MODELI ZA DOBIVANJE TUMORSKIH MATIČNIH STANICA

Povratak tumora nakon određene terapije može ukazivati na postojanje minimalne ostatne bolesti ili metastaze, ali i na činjenicu da, kod nekih tumora, stanice malignog tumora nisu u identične, tj. da neke od njih imaju potencijal za razvitak novog tumora – tumorogeni potencijal. Razlog tome može biti klonalna evolucija – stanice malignih tumora prolaze klonalnu ekspanziju pri čemu dolazi do stvaranja genetičke raznolikosti i klonalne selekcije. Terapijska intervencija može djelovati kao selekcijski čimbenik čiji je rezultat ekspanzija rezistentnih klonova. Povrh toga, povratak bolesti nakon terapije može se objasniti i postojanjem tumorskih matičnih stanica u nekih tumora (Hong i sur. 2015). Prema definiciji, tumorske matične stanice su subpopulacija stanica malignih tumora, s karakteristikama sličnim normalnim matičnim stanicama, iz kojih mogu nastati svi tipovi stanica malignog tumora što može uključivati stanice s diferenciranim značajkama (Wicha i sur. 2006). Karakteristika normalnih matičnih stanica je relativno visoka ekspresija gena uključenih u formaciju tzv. transportera ABC (od eng. *ATP-binding cassette*) koji mogu izbacivati citotoksične tvari iz normalnih matičnih stanica i tako ih štititi od štetnih posljedica. Navedena karakteristika može objasniti ostanak rezistentnih staničnih populacija nakon kemoterapije, u ovom slučaju izbacuje se kemoterapeutik iz stanice (Vescovi i sur. 2006). U mnogim staničnim linijama malignih tumora potvrđena je prisutnost tumorskih matičnih stanica i zato te stanične linije predstavljaju *in vitro* model za istraživanje tumorskih matičnih stanica (Yu i sur. 2008; Charafe-Jauffret i sur. 2009; Iacopino i sur. 2014). Njihovo postojanje prvi puta je zabilježeno 1994. godine kada je otkriveno da pročišćena populacija stanica akutne mijeloidne leukemije, koje eksprimiraju određene površinske markere, mogu efikasno formirati tumore kada su inicirane u laboratorijske miševe dok druge stanične populacije iz istog tumora nisu pokazale tu karakteristiku (Lapidot i sur. 1994). Matične stanice raka nova su potencijalna meta za buduće kemoterapeutike (Hong i sur. 2015).

7. ZAKLJUČAK

Stanične linije imaju veliki doprinos u istraživanju malignih tumora, a njihova upotreba kao *in vitro* modela raste iz godine u godinu. Budući da stanične linije nemaju heterogenu strukturu kakvu nalazimo u tumorima *in vivo*, one nisu najbolji model za praćenje nekih procesa u malignim tumorima kao što je npr. angiogeneza, ali su neizostavan model za testiranje potencijalnih lijekova. Stanične linije malignih tumora važne su za personalizirani pristup liječenju – postoji više od 1000 staničnih linija kojima se pokušava obuhvatiti raznolikost tumora. Karakterizacija staničnih linija na molekularnoj razini omogućava odabir reprezentativnih staničnih linija koje će se koristiti u nekom istraživanju. U budućnosti će broj dostupnih staničnih linija malignih tumora vjerojatno biti veći i usavršavati će se uvjeti u kulturi zahvaljujući kojima će stanične linije biti sličnije tumorima *in vivo*.

8. LITERATURA

- Balmain, A., Gray, J. i Ponder, B., 2003. The genetics and genomics of cancer. *Nature genetics*, 33 Suppl, 238–44.
- Barretina, J. i sur., 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 483(7391), 603–7.
- Beskow, L.M., 2016. Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17(1), 395–417.
- Borchardt, R.T., 2011. Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T.: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology*, 96, 736-749, 1989--the backstory. *The AAPS journal*, 13(3), 323–7.
- Charafe-Jauffret, E. i sur., 2009. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer research*, 69(4), 1302–13.
- Cho, S.-C. i Choi, B.Y., 2015. Acetylshikonin Inhibits Human Pancreatic PANC-1 Cancer Cell Proliferation by Suppressing the NF- κ B Activity. *Biomolecules & therapeutics*, 23(5), 428–33.
- Corcoran, J.A., Johnston, B.P. i McCormick, C., 2015. Viral activation of MK2-hsp27-p115RhoGEF-RhoA signaling axis causes cytoskeletal rearrangements, p-body disruption and ARE-mRNA stabilization. *PLoS pathogens*, 11(1), p.e1004597.
- Domcke, S. i sur., 2013. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature communications*, 4, p.2126.
- Dong, H. i sur., 2016. Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Use Secreted Heat Shock Protein-90 α (Hsp90 α) to Survive a Hostile Hypoxic Environment. *Scientific reports*, 6, p.20605.
- Ertel, A. i sur., 2006. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Molecular cancer*, 5(1), 55.
- Han, H.J. i sur., 2014. Suppression of E-cadherin mediates gallotannin induced apoptosis in Hep G2 hepatocellular carcinoma cells. *International journal of biological sciences*, 10(5), 490–9.
- Hanahan, D. i Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Harada, H. i sur., 2003. Telomerase induces immortalization of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation. *Molecular cancer research : MCR*, 1(10), 729–38.
- Hay, C.W. i sur., 2015. An Sp1 Modulated Regulatory Region Unique to Higher Primates Regulates Human Androgen Receptor Promoter Activity in Prostate Cancer Cells. *PloS one*, 10(10), p.e0139990.
- Holkers, M. i sur, 2014. Adenoviral vector DNA for accurate genome editing with engineered nucleases. *Nature Methods*, 11(10), 1051–1057.

- Hong, I.-S., Lee, H.-Y. i Nam, J.-S., 2015. Cancer stem cells: the “Achilles heel” of chemo-resistant tumors. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 10(1), 2–22.
- Hu, J.-N. i sur., 2016. Esterification of Quercetin Increases Its Transport Across Human Caco-2 Cells. *Journal of food science*, 81(7), H1825–32.
- Hutchinson, L. i Kirk, R., 2011. High drug attrition rates—where are we going wrong? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(4), 189–190.
- Iacopino, F. i sur., 2014. Isolation of Cancer Stem Cells from Three Human Glioblastoma Cell Lines: Characterization of Two Selected Clones G. Camussi, ed. *PLoS ONE*, 9(8), p.e105166.
- Ince, T.A. i sur., 2007. Transformation of Different Human Breast Epithelial Cell Types Leads to Distinct Tumor Phenotypes. *Cancer Cell*, 12(2), 160–170.
- Kamata, Y. i sur., 2012. Sensitivity of Hep G2 Cells to Bacillus cereus Emetic Toxin. *J. Vet. Med. Sci*, 74(11), 1483–1485.
- Kim, S.E. i sur., 2015. Autophagy sustains the survival of human pancreatic cancer PANC-1 cells under extreme nutrient deprivation conditions. *Biochemical and biophysical research communications*, 463(3), 205–10.
- Lapidot, T. i sur., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–8.
- Lee, J.H. i sur., 2013. Effect of quercetin on apoptosis of PANC-1 cells. *Journal of the Korean Surgical Society*, 85(6), 249–60.
- Li, H., Fan, X. i Houghton, J., 2007. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 805–815.
- Luca, A.C. i sur., 2013. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PloS one*, 8(3), p.e59689.
- Luchette, M. i sur., 2014. Radiation dose enhancement of gadolinium-based AGuIX nanoparticles on HeLa cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(8), 1751–1755.
- Masuda, Y. i sur., 2015. Cell culture on hydrophilicity-controlled silicon nitride surfaces. *World journal of microbiology & biotechnology*, 31(12), 1977–82.
- Merlo, L.M.F. i sur., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews. Cancer*, 6(12), 924–35.
- Myungjin Lee, J. i sur., 2013. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Laboratory Investigation*, 93(5), 528–542.
- Oak, C. i sur., 2015. Multimodal imaging using optical coherence tomography and endolaryngeal ultrasonography in a new rabbit VX2 laryngeal cancer model. *Lasers in surgery and medicine*, 47(9), 704–10.
- Odom, D.T. i sur., 2007. Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nature Genetics*, 39(6), 730–732.
- Olivotto, M. i Sbarba, P. Dello, 2008. Environmental restrictions within tumor ecosystems

- select for a convergent, hypoxia-resistant phenotype of cancer stem cells. *Cell Cycle*, 7, 176–187.
- Park, S.E. i sur., 2014. Induction of apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells with an ethanol extract of *Cyperus rotundus* L. by activating caspases. *Oncology reports*, 32(6), 2461–70.
- Reddel, R.R. i sur., 1995. SV40-induced immortalization and ras-transformation of human bronchial epithelial cells. *International journal of cancer*, 61(2), 199–205.
- Sarnelli, G. i sur., 2016. Palmitoylethanolamide Exerts Antiproliferative Effect and Downregulates VEGF Signaling in Caco-2 Human Colon Carcinoma Cell Line Through a Selective PPAR- α -Dependent Inhibition of Akt/mTOR Pathway. *Phytotherapy Research*, 30(6), 963–970.
- Shay, J.W. i Wright, W.E., 2007. Tissue Culture as a Hostile Environment: Identifying Conditions for Breast Cancer Progression Studies. *Cancer Cell*, 12(2), 100–101.
- Shoemaker, R.H., 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature reviews. Cancer*, 6(10), 813–23.
- Song, H. i sur., 2015. Silencing of DUSP6 gene by RNAi-mediation inhibits proliferation and growth in MDA-MB-231 breast cancer cells: an in vitro study. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(7), 10481–90.
- van Staveren, W.C.G. i sur., 2009. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochimica et biophysica acta*, 1795(2), 92–103.
- Stephens, P. i sur., 2005. A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nature Genetics*, 37(6), 590–592.
- Tam, C.S. i Polliack, A., 2016. Defining the appropriate starting dose of lenalidomide in chronic lymphocytic leukemia: remember the old fable of the hare and the tortoise. *Leukemia & lymphoma*, 57(6), 1247–8.
- Tegze, B. i sur., 2012. Parallel evolution under chemotherapy pressure in 29 breast cancer cell lines results in dissimilar mechanisms of resistance. *PloS one*, 7(2), p.e30804.
- Turner, T., 2012. Development of the polio vaccine: a historical perspective of Tuskegee University's role in mass production and distribution of HeLa cells. *Journal of health care for the poor and underserved*, 23(4 Suppl), 5–10.
- Vescovi, A.L., Galli, R. i Reynolds, B.A., 2006. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 6(6), 425–436.
- Veysseyre, F. i sur., *Bacillus cereus* infection: 57 case patients and a literature review. *Médecine et maladies infectieuses*, 45(11-12), 436–40.
- Wang, H.-Y., Lian, P. i Zheng, P.-S., 2015. SOX9, a potential tumor suppressor in cervical cancer, transactivates p21WAF1/CIP1 and suppresses cervical tumor growth. *Oncotarget*, 6(24), 20711–22.
- Wertman, J. i sur., 2016. The Zebrafish Xenograft Platform: Evolution of a Novel Cancer Model and Preclinical Screening Tool. *Advances in experimental medicine and biology*, 916, 289–314.

- Wicha, M.S., Liu, S. i Dontu, G., 2006. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer research*, 66(4), 1883–90.
- De Witt Hamer, P.C. i sur., 2008. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene*, 27(14), 2091–2096.
- Xia, J. i sur., 2013. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(1), 1–8.
- Yamori, T. i sur., 1999. Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an in vitro and in vivo human cancer cell line panel. *Cancer research*, 59(16), 4042–9.
- Yi, J.-L. i sur., 2015. Myricetin and methyl eugenol combination enhances the anticancer activity, cell cycle arrest and apoptosis induction of cis-platin against HeLa cervical cancer cell lines. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(2), 1116–27.
- Yu, S. i sur., 2008. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Letters*, 265(1), 124–134.
- <http://berkeleysciencereview.com/article/good-bad-hela/>
- <http://www.bbbmd.com.tw/PDF/5-Reasons-Cancer-Researchers-Adopt-3D-Cell-Culture-White-Paper.pdf>
- <http://www.labanim.hr/wp-content/uploads/2013/02/M.Kesi%C4%87-Vje%C5%BEbe-Pona%C5%A1anje.pdf>
- https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx?geo_country=hr

9. SAŽETAK

Stanične linije malignih tumora najkorišteniji su model u istraživanjima tumorogeneze. Njihova prednost je lako rukovanje, dostupnost i cijena, ali imaju nedostatak da se kod njih, za razliku od istraživanja na animalnim modelima ne može pratiti progresija tumora. Za potpuno razumijevanje tumora potrebno je zato kombinirati rezultate dobivene uz pomoć različitih modela.

Kao biološki entiteti, stanične linije malignih tumora podložne su prirodnoj selekciji. Uvjeti u kojima se uzgajaju znatno utječu na njihov genotip, a time i na fenotip te njihovu reprezentativnost kao modela. Postoji preko 1000 različitih staničnih linija kojima se nastoji obuhvatiti raznolikost tumora. One su glavni pretklinički model za testiranje djelovanja kemoterapeutika, a njihova raznolikost omogućava personalizirani pristup liječenju.

Neke stanične linije korištenije su od drugih, ali nisu nužno reprezentativniji model od onih koje se rjeđe koriste. Enciklopedija staničnih linija malignih tumora i Atlas genoma malignih tumora omogućavaju usporedbu staničnih linija i tumora *in vivo* na genetičkoj razini te odabir reprezentativnih staničnih linija. Stanične linije malignih tumora koriste se i u druge svrhe kao što je npr. testiranje toksičnosti neke tvari, istraživanja virusa i bakterija itd. Neke stanične linije mogu poslužiti kao *in vitro* modeli za istraživanje tumorskih matičnih stanica—novih potencijalnih meta za kemoterapeutike.

10. SUMMARY

Cancer cell lines are the most widely used models in cancer research. They are fast-growing cells, easy to handle compared to other cancer models and there is huge variety of different kinds in cell line banks. Other models have their advantages, e.g. animal models can be used for studying cancer progression. Therefore, to understand the complete picture of tumorigenesis it is the best to combine different models.

Conditions in cell culture determine the genotype and therefore also phenotype of cells so it is important to optimise cell culture conditions in order to get cancer cell lines that will be representative models in cancer research. They are main models for preclinical drug testing - over 1000 different cell lines represent cancer diversity and enable personalized treatment approach.

The most widely used cell lines are not necessary the best models. The Cancer Genome Atlas and Cancer Cell Line Encyclopedia enable comparison of genomic profiles of cancer cell lines and tumors *in vivo* in order to find cell lines that are the most relevant for certain research. Cancer cell lines can be used in other researches such as testing toxicity of some agents. Some cancer cell lines can be used as *in vitro* model for cancer stem cell research – model for new potential targets of drug treatment.