



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS**

Marius Baltramonaitis

Biochemijos studijų programos

Bakalauro baigiamasis darbas

**Storosios žarnos vėžio ląstelių linijų imunomoduliuojančių savybių
tyrimas**

Darbo vadovė
dr. Agata Mlynska

(leidimas ginti, data, parašas)

Darbo įteikimo data _____

Vilnius 2020



**VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY**

Marius Baltramonaitis

Biochemistry study programme

Bachelor thesis

Immunomodulating Properties of Colorectal Cancer Cell Lines

Scientific adviser
dr. Agata Mlynska

(permission to defend, date, signature)

Date of submission _____

Vilnius 2020

TURINYS

SANTRUMPOS	6
IVADAS.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1 Onkologiniai susirgimai	10
1.1.1 Storosios žarnos vėžys.....	11
1.2 Vėžio heterogeniškumas	11
1.2.1 Tiriamųjų SŽV ląstelių linijų charakteristikos	13
1.2.2 Storosios žarnos vėžio kamieninės ląstelės	16
1.2.3 Storosios žarnos vėžio kamieninių ląstelių žymenys	17
1.2.4 Epitelinė-mezenchiminė transformacija	18
1.2.5 Kamieniškumą slopinančių junginių – SB-431542 ir salinomicino – veikimo mechanizmas	20
1.3 Naviko mikroaplinka.....	20
1.3.1 Uždegimas naviko mikroaplinkoje	22
1.3.2 Makrofagai naviko mikroaplinkoje	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	26
2.1 Aparatūra ir priemonės.....	26
2.1.1 Aparatūra	26
2.1.2 Kitos priemonės.....	26
2.1.3 Programinė įranga.....	26
2.2 Medžiagos	26
2.2.1 Reagentai	26
2.2.2 Tirpalai	28
2.2.3 Terpės	28

2.2.4	Genai ir pradmenys.....	28
2.2.5	Tiriamoji medžiaga.....	28
2.3	Metodai.....	29
2.3.1	Makrofagų išskyrimas, diferenciacija ir poliarizacija	29
2.3.2	Tiriamų SŽV linijų genų raiškos skirtumų analizė naudojant viešai prieinamų duomenų bazių duomenis.....	29
2.3.3	Vėžinių ląstelių auginimas, persėjimas ir gyvybingumo skaičiavimas	30
2.3.4	Citokinų detekcija ląstelių linijų lizatuose naudojant baltyminę gardelę	30
2.3.5	Vėžinių ląstelių augimo terpės paruošimas	31
2.3.6	Netiesioginis makrofagų ir storosios žarnos vėžio ląstelių linijų kokultivavimas	31
2.3.7	Dažymas monokloniniais antikūnais	31
2.3.8	Ląstelių rinkimas tėkmės citometru ir jų analizė.....	31
2.3.9	RNR išskyrimas ir gryninimas	31
2.3.10	Kopijinės DNR sintezė	32
2.3.11	Kiekybinė PGR.....	32
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
3.1	SŽV ląstelių linijų su kamieniškumu susijusių paviršiaus žymenų raiškos tyrimas	33
3.2	Tiriamų SŽV ląstelių linijų genų raiškos skirtumų analizė naudojant viešai prieinamų duomenų bazių duomenis.....	34
3.3	SŽV ląstelių linijų gebėjimo poliarizuoti makrofagus tyrimas	35
3.4	SŽV linijų charakterizavimas naudojant žmogaus citokinų imunobloto gardelę	39
3.5	Salinomicino ir SB-431542 įtaka su kamieniškumu susijusių paviršiaus žymenų raiškai SŽV ląstelių linijose	41
3.6	SB-431542 ir salinomicinu paveiktų SŽV ląstelių linijų gebėjimo poliarizuoti makrofagus tyrimas.....	43
	REZULTATŲ APTARIMAS	48
	IŠVADOS.....	51

SANTRAUKA	52
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	54
PRIEDAI	63
I priedas	63

SANTRUMPOS

APC – alofikocianinas (ang. *allophycocyanin*);

BNR – bazių neatitikimo reparacija;

BV421 - briliantinis violetas, sužadinas 421 nm bangos ilgio šviesa (ang. *Brilliant Violet*);

CCL – C-C chemokino ligandas;

CD – klasterio diferenciacija (*cluster of differentiation*);

CMS – sutartinis molekulinis subtipas (ang. *Consensus Molecular Subtype*);

CN – chromosominis nestabilumas;

COLO320 – žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija;

CpG – DNR grandinės regionas, kuriame po citozino nukleotido seka guaninas;

CSMP – CpG salų metilinimo profilis;

DLD1 – žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

EMT – epitelinė-mezenchiminė transformacija (ang. *epithelial-mesenchymal transition*);

FIM – fluorescencijos intensyvumo mediana;

FITC – fluoresceino izotiocianatas (ang. *Fluorescein isothiocyanate*);

GM-CSF – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*);

HCT116 – žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija;

HRP – krienų rūgšties peroksidazė (ang. *Horseradish peroxidase*);

HT29 – žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija;

IFN- γ – gama interferonas;

IL – interleukinas;

LoVo – žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija;

LPS – lipopolisacharidas;

LS1034 – žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija;

M-CSF – makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (ang. *macrophage colony-stimulating factor*);

MHC – didysis audinių suderinamumo kompleksas (ang. *Major histocompatibility complex*);

MSS – mikrosatelitinių sekų stabilumas;

NCI-H508 – žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija;

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (ang. *Phosphate-buffered saline*);
PE – fikoeritrinas (ang. *Phycoerythrin*);
PE-Cy7 – fikoeritrinas, konjuguotas su cianinu-7;
PGR – polimerazinė grandininė reakcija;
PKML - periferinio kraujo mononukleariniai leukocitai;
RPMI – mitybinė terpė (ang. *Roswell Park Memorial Institute*);
SAL – salinomicinas;
SB – SB-431542;
SW620 – žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija;
SŽV – storosios žarnos vėžys;
TGF- β – transformuojantis augimo veiksnys beta (ang. *transforming growth factor beta*);
TNF- α – alfa navikų nekrozės faktorius (ang. *Tumor necrosis factor alpha*);
V450 – violetinis dažas, sužadinamas 450 nm ilgio šviesa;
V500 – violetinis dažas, sužadinamas 500 nm ilgio šviesa;
VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (ang. *Vascular endothelial growth factor*);
VKL – vėžio kamieninės ląstelės;
Wnt – Wingless-type signalo perdavimo kelias;
wt – laukinio tipo variantas (ang. *Wild type*);

IVADAS

Storosios žarnos vėžys (SŽV) yra vienas labiausiai paplitusių onkologinių susirgimų išsivysčiusiose pasaulio valstybėse. Didelės reikšmės ligos prognozei bei gydymo efektyvumui turi aukštas SŽV heterogeniškumas – norint jį susisteminti nepriklausomos mokslininkų grupės sukūrė genų raiškos profilius paremtą klasifikacijos sistemą, pagal kurią SŽV navikus galima suskirstyti į keturis savo savybėmis besiskiriančius sutartinius molekulinius subtipus (Guinney et al., 2015). Pagal vieną iš heterogeniškumą aiškinančių modelių, naviko mikroaplinkoje egzistuoja vėžio kamieninių ląstelių (VKL) populiacija, pasižyminti atsparumu chemoterapijai, savęs atsinaujinimo, diferenciacijos, epitelinės-mezenchiminės transformacijos savybėmis, bei jai būdingų žymenų (CD44, CD133) raiška (Y. Zhou et al., 2018). Naviką bei jo heterogeniškumą taip pat palaiko ir mikroaplinkoje esančios nevėžinės stromos ląstelės, tokios kaip fibroblastai, endotelio bei imuninės ląstelės, kurios skatina tarpląstelinės erdvės persitvarkymą, ląstelių migraciją, neoangiogenezę bei apsaugo nuo priešvėžinio imuninio atsako (Hanahan & Coussens, 2012). Viena iš didžiausių naviką infiltruojančių imuninių ląstelių populiacijų yra makrofagai. Su naviku susijusių makrofagų poveikis navikui yra dvejopas: klasikiniu būdu aktyvuoti M1 tipo makrofagai skatina uždegimą bei kovoja su vėžinėmis ląstelėmis, tuo tarpu alternatyviai aktyvuoti M2 tipo makrofagai, normaliomis sąlygomis dalyvaujantys audinių reparacijos, imunoreguliaciniuose procesuose, slopindami imuninį atsaką skatina naviko vystymąsi (Cheng et al., 2019). Tyrimais pademonstruota, jog makrofagų poliarizacijai į M2 tipą įtakos turi skirtingų tipų (krūties, kiaušidžių, glioblastomos) vėžių kamieninės bei epitelinę-mezenchiminę transformaciją vykdančios ląstelės bei jų išskiriamos molekulės (Brenot et al., 2018; Gabrusiewicz et al., 2018; Raghavan et al., 2019), tačiau nėra daug informacijos apie didelę makrofagų infiltraciją pasižyminčio storosios žarnos vėžio ląstelių ir makrofagų tarpusavio sąveikas naviko mikroaplinkoje.

Šio tyrimo metu charakterizuojant SŽV ląstelių linijas bei tiriant jų vaidmenį makrofagų poliarizacijoje į M1 arba M2 tipą *in vitro* buvo bandoma ištirti ryšį tarp SŽV ląstelių kamieniško ir jų gebėjimo indukuoti makrofagų poliarizaciją. Išsiaiškinus SŽV ląstelių imunomoduliuojančias savybes bei sąveikas su makrofagais būtų galima praplėsti gydymo galimybes, didinant galimų priešvėžinių vaistų taikinių spektrą.

Darbo tikslas: Ištirti skirtingų molekulinių tipų aštuonių žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijų gebėjimą poliarizuoti makrofagus į M1 (naviką slopinantį) arba M2 (naviką skatinantį) tipus.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti tiriamų storosios žarnos vėžio ląstelių linijų kamieniškumo žymenų raišką bei su makrofagų poliarizacija susijusių citokinų raiškos profilius.
2. Ištirti skirtingo kamieniškumo storosios žarnos vėžio ląstelių linijų gebėjimą sukelti makrofagų poliarizaciją.
3. Ištirti vėžinių ląstelių kamieniškumą slopinančių junginių – salinomicino ir SB-431542 – įtaką storosios žarnos vėžio ląstelių linijų gebėjimui poliarizuoti makrofagus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Onkologiniai susirgimai

Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) vėžiu vadina grupę susirgimų, kurie gali paveikti bet kurį kūno audinį. Pagrindinė vėžinius susirgimus išskirianti savybė yra greitas ir nekontroliuojamas anomalių ląstelių dalijimasis nepaisant normalių tam tikro audinio ribų bei tokių ląstelių metastazavimas į kitus organizmo organus (WHO, 2018). 2018 metais vėžys buvo antroji didžiausia mirtingumo priežastis pasaulyje, sudaranti apie šeštadalį visų mirčių (WHO, 2018). Metastazių susidarymas yra 90% mirčių, sukeltų vėžinių susirgimų, priežastis (Chaffer & Weinberg, 2011). Dažniausi vėžio tipai vyrų tarpe 2019 m. buvo prognozuojami prostatos, plaučių bei storosios žarnos (42% visų susirgimų), moterų – krūties, plaučių bei storosios žarnos (apie 50%) (Siegel et al., 2019).

Rizikos faktoriai, didinantys tikimybę susirgti onkologinėmis ligomis, skirstomi į dvi grupes: vidinius ir išorinius. Vidiniams faktoriams priskiriamos atsitiktinės klaidos DNR replikacijoje, išoriniams – biologinis senėjimas, DNR pažaidų taisymo mechanizmų sutrikimai, neįprastas hormonų, augimo faktorių balansas, chroniški uždegimai, radiacija, cheminiai kancerogenai, navikus sukeliantys virusai, rūkymas, mažas fizinis aktyvumas, blogi mitybiniai įpročiai. Išoriniams faktoriams būdinga tai, kad jie gali keistis ir jų sukeliamą riziką gali būti sumažinama (Wu et al., 2018). Vertinama, jog išoriniai faktoriai prisideda prie daugiau nei 70-90% dažniausiai pasitaikančių onkologinių susirgimų atvejų (Wu et al., 2016).

Šiuolaikinis požiūris daugiažingsnį naviko vystymąsi sieja su pradinių vėžinių ląstelių palaipsniui įgyjamomis savybėmis, įgalinančiomis jas tapti navikinėmis ir piktybinėmis (Hanahan & Weinberg, 2000). Išskiriamos šios pagrindinės vėžinių ląstelių savybės: nuolatinis proliferacijos signalų generavimas, atsparumas augimą slopinantiems signalams, įgyjamos invazyvumo bei metastazavimo savybės, neribotas ląstelių dalinimusi skaičius, angiogenezės skatinimas, gebėjimas išvengti programuotos ląstelės žūties (apoptozės), pakitęs ląstelių metabolizmas bei gebėjimas išvengti imuninio atsako. Ląstelės geba įgyti šiuos požymius palaipsniui, dėl vėžinėms ląstelėms būdingo genomino nestabilumo (mutacijų) bei naviką skatinančio uždegimo palaikymo (Hanahan & Weinberg, 2011).

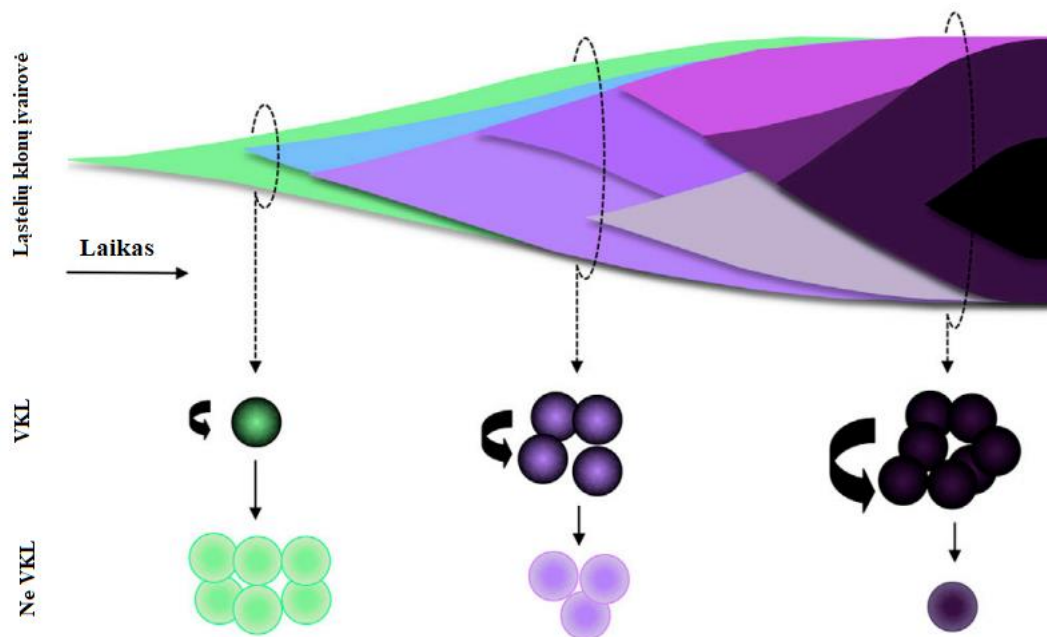
1.1.1 Storosios žarnos vėžys

Storosios žarnos vėžys (SŽV) 2018 m. buvo trečias labiausiai paplitęs vėžinis susirgimas tarp abiejų lyčių pacientų ir sudarė 10,2% visų susirgimų (*Globocan*, 2018). Sergamumas šio tipo vėžiu padidėjo paskutiniaisiais dešimtmečiais, ypač išsivysčiusiose pasaulio valstybėse – tai siejama su senėjančia populiacija, mitybiniais įpročiais bei kitais susirgimo riziką didinančiais veiksniais. Prie SŽV išsivystymo prisideda ir genetiniai, ir aplinkos veiksniai, tačiau dauguma atvejų yra sporadiški (Kuipers et al., 2015). Išskiriami mažiausiai trys pagrindiniai molekuliniai keliai, kurių pagalba storosios žarnos epitelinė ląstelė tampa vėžine (Bogaert & Prenen, 2014). Labiausiai būdingas iš jų yra chromosominio nestabilumo kelias (~70% susirgimų), kuriam būdinga aneuploidijų, chromosomų struktūros pakitimų susidarymas, taip pat ir specifinių onkogenų bei naviką slopinančių genų (*APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *SMAD4*, *TP53*) mutacijos, kurios skatina naviko formavimąsi. Kitas kelias yra mikrosatelitinių sekų nestabilumo kelias, sukeliamas defektyvios DNR bazių neatitikimo reparacijos sistemos pažeisto gebėjimo pataisyti mikrosatelitinėse sekose susidarančių mutacijų. Trečiasis išskiriamas kelias – CpG salų metilinimo kelias (Bogaert & Prenen, 2014). Genetiniai veiksniai lemia apie 5-10% visų SŽV susirgimų (Lynch & de la Chapelle, 2003). Labiausiai paplitęs genetinis sindromas tokių susirgimų atveju yra Lynčo sindromas, kuris kyla dėl mutacijų DNR pažaidų taisymo mechanizmo genuose: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*. Taip pat paplitusi ir šeiminė adenominė polipozė, kuri pasireiškia išsivystant labai dideliu skaičiumi adenomų, kurios tampa vėžinėmis. Šį sindromą sukelia *APC* geno, dalyvaujančio WNT signalo perdavimo kelyje, mutacijos (Vasen et al., 2015). Pagrindinis metodas SŽV detekcijai yra kolonoskopija, kuri padeda atrasti susidariusius polipus ir navikus ankstyvose stadijose ir juos pašalinti (Levin et al., 2008). Nuo 1980m. stebimos mirtingumo mažėjimo tendencijos Europoje, Šiaurės Amerikoje ir kai kuriose Azijos šalyse – šis sumažėjimas gali būti siejamas su kolonoskopijos panaudojimu ankstyvojoje detekcijoje (Kuipers et al., 2015). Lietuvoje taip pat vykdoma ankstyvosios detekcijos programa, pagal kurią 50-74 metų vyrai ir moterys vieną kartą per du metus gali nemokamai atlikti slaptąjo kraujo išmatose tyrimą (Storosios žarnos vėžio ankstyvosios diagnostikos programa - Nacionalinis vėžio institutas, 2019).

1.2 Vėžio heterogeniškumas

Storosios žarnos vėžys pasižymi aukštu tarpnavikiniu ir vidunavikiniu heterogeniškumu ir tai turi didelės reikšmės ligos prognozei bei gydymo efektyvumui (Molinari et al., 2018). Tarpnavikinis heterogeniškumas gali reikšti skirtumus tarp sinchroniškai besivystančių pirminių auglių, tiek tarp

pirminio naviko ir iš jo kilusio metastazinio naviko, tuo tarpu vidunavikinis – skirtumus tame pačiame auglyje. Siūlomi trys keliai, kaip išsivysto naviko heterogeniškumas: vėžio kamieninių ląstelių, kloninės evoliucijos bei didžiojo sprogimo modeliai (Blank et al., 2018). Pirmasis, kamieninių ląstelių modelis, teigia, jog tik maža dalis ląstelių (vidutiniškai iki 10% visų ląstelių) navike geba inicijuoti naviko susidarymą ir vystymąsi, bei pasižymi paviršiaus žymenų, tokių kaip CD133, CD44, CD166, raiška (Blank et al., 2018). Kloninės evoliucijos modelis siūlo mechanizmą, jog vėžys vystosi palaipsniui įgydamas mutacijas, kurių didžioji dalis yra tik šalutinės mutacijos, nesukeliančios ryškių pokyčių, tačiau taip pat įgydamas ir esmines mutacijas, kurios suteikia vienoms ląstelėms selektyvų pranašumą prieš kitas (McGranahan & Swanton, 2015). Šiuos modelius galima sujungti darant prielaidą, jog vėžio kamieninės ląstelės nėra statiškos, tačiau taip pat evoliucionuoja įgydamos selektyvų pranašumą suteikiančias mutacijas ir asimetrinio dalijimosi būdu generuoja didelį vėžinių ląstelių klonų skaičių (Kreso & Dick, 2014) (1 pav.).



1 pav. Sujungtas kloninės evoliucijos ir kamieninių ląstelių modelis. Viršutinėje dalyje pavaizduota kloninė evoliucija ląstelėms įgyjant palankias mutacijas, atsirandant skirtingų klonų populiacijoms navike. Apatinėje dalyje vaizduojama, jog kamieninės ląstelės taip pat gali įgyti palankias mutacijas ir asimetrinio dalijimosi būdu generuoti skirtingų klonų populiacijas. Paveikslas adaptuotas pagal Kreso ir Dick (Kreso ir Dick, 2014).

Sottoriva et al. pasiūlytas didžiojo sprogimo modelis teigia, jog jau ankstyvasis navikas turi įgijęs pagrindines mutacijas, reikalingas tolimesniam vystymuisi (Sottoriva et al., 2015). Prie naviko heterogeniškumo prisideda ir negenetiniai veiksniai - naviko mikroaplinka, nekoduojančiosios RNR

bei epigenetinės modifikacijos, tokios kaip DNR metilinimas, histonų modifikacijos (Kreso & Dick, 2014). Taip pat buvo nustatyta, jog net genetiškai identiškos storosios žarnos vėžio ląstelės skiriasi savo jautrumu priešvėžiniams vaistams bei dalijimosi greičiu (Kreso et al., 2013).

Atsižvelgiant į storosios žarnos vėžio heterogeniškumą bei jo sukliamą skirtingą atsaką į taikomą gydymą, skirtingos mokslininkų grupės bandė sugrupuoti storosios žarnos vėžius į kelis potipius pagal jų genų raiškos profilius (Budinska et al., 2013; Marisa et al., 2013; Medico et al., 2015; Roepman et al., 2014; Sadanandam, Lyssiotis, Homicsko, Collisson, Gibb, Wullschleger, Ostos, et al., 2013). Guinney et al. susistemino šių nepriklausomų mokslininkų grupių pasiūlytas storosios žarnos vėžio klasifikacijos sistemas ir išvedė keturis sutartinius molekulinis storosios žarnos vėžio subtipus (Guinney et al., 2015).

1.2.1 Tiriamųjų SŽV ląstelių linijų charakteristikos

SŽV tyrimams *in vitro* yra išvesta virš 150 ląstelių linijų (Chisanga et al., 2015), kurios skiriasi savo klinicine stadija, morfologija, diferenciacijos paviršiaus žymenų raiška bei atspindi genetinį SŽV heterogeniškumą (Christensen et al., 2012). Šiame tyrime pasirinktos aštuonios skirtingos SŽV ląstelių linijos: COLO320, DLD1, HCT116, HT29, LoVo, LS1034, NCI-H508 ir SW620 (1 lentelė).

LS1034 ląstelių linija buvo išvesta iš aklosios žarnos adenokarcinomos, likusi dauguma tyrime naudotų ląstelių – iš kolorektalinės adenokarcinomos. HT29, LoVo, LS1034, SW620 linijos gautos iš C stadijos pagal Dukes'o skalę navikų, HCT116 – iš D stadijos, likusių linijų navikų stadijos nenustatytos. DLD1, HCT116 ir LoVo ląstelių linijos pasižymi mikrosatelitinių sekų nestabilumu. Visos ląstelių linijos pasižymi bent viena mutacija svarbiuose naviką slopinančiuose genuose (*TP53*, *PTEN*) arba onkogenuose (*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*) – tai rodo, jog tiriamų ląstelių linijų genomai nestabilūs, tinkamai neveikia DNR pažaidų taisymo mechanizmai. DLD1, HCT116 ir HT29 ląstelių linijoms būdingas aukštas CpG salų metilinimo lygis.

Tiriamos SŽV ląstelių linijos taip pat buvo sugrupuotos pagal skirtingas nepriklausomų mokslininkų grupių pasiūlytas klasifikacijos sistemas, sudarytas remiantis SŽV ląstelių genų raiškos profiliais (2 lentelė). Pagal Marisa et al., COLO320, DLD1, HCT116 ir SW620 ląstelių linijos priskiriamos kamieniškam fenotipui, HT29, LS1034 ir NCI-H508 būdingas chromosominis nestabilumas bei slopinamas priešvėžinis imuninis atsakas, o LoVo ląstelių linijai būdinga sutrikusi DNR bazių neatitikimo reparacijos sistemos veikla.

1 lentelė. Tiriamųjų ląstelių linijų COLO320, DLD1, HCT116, HT29, LoVo, LS1034, NCI-H508 ir SW620 charakteristikų apžvalga. Pateikiama ląstelių kilmė, pagrindinės jas apibūdinančios genetinės charakteristikos. MSS – mikrosatelitinių sekų stabilumas, CSMP – CpG salų metilinimo profilis, wt – laukinis tipas.

Ląstelių linija	Kilmė (Ahmed et al. 2013)	Mikrosatelitinių sekų stabilumas (Ghandi et al. 2019)	Mutacijos kritiniuose SŽV vėžio genuose (Berg et al. 2017)				
			TP53	KRAS	BRAF	PIK3CA	PTEN
COLO320	55 m. moteris, kolorektalinė adenocarcinoma	Stabilus	p.R248W	wt	wt	wt	wt
DLD1	vyras, kolorektalinė adenokarcinoma	Nestabilus	p.S241F	p.G13D	wt	p.E545K p.D549N	wt
HCT116	48 m. vyras, kolorektalinė adenocarcinoma, Dukes'o D	Nestabilus	wt	p.G13D	wt	p.H1047R	wt
HT29	44 m. moteris, kolorektalinė adenocarcinoma, Dukes'o C	Stabilus	p.R273H	wt	p.V600E p.T119S	wt	wt
LoVo	56 m. vyras, kolorektalinė adenocarcinoma, Dukes'o C	Nestabilus	wt	p.G13D p.V14A	wt	wt	wt
LS1034	54 m. vyras, aklosios žarnos carcinoma, Dukes'o C	Stabilus	p.G245S	p.A146T	wt	wt	wt
NCI-H508	55 m. vyras, kolorektalinė adenocarcinoma	Stabilus	p.R273H	wt	p.G596R	p.E545K	wt
SW620	51 m. vyras, kolorektalinė adenocarcinoma, Dukes'o C	Stabilus	p.R273H p.P309S	p.G12V	wt	wt	wt

2 lentelė. Tiriamųjų ląstelių linijų suskirstymas pagal kelių skirtingų mokslininkų grupių siūlomas klasifikacijos sistemas, paremtas navikų genų raiškos profiliais. BNR – bazių neatitikimo reparacija, CMS – sutartinis molekulinis subtipas (ang. Consensus Molecular Subtype), CN – chromosominis nestabilumas.

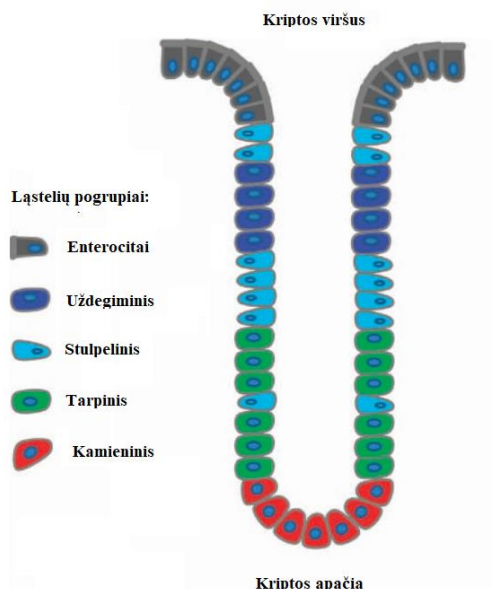
Lastelių linija	Potipis (Marisa et al 2013)	Potipis (Sadanadam et al. 2015)	Potipis (Guinney et al. 2015)
COLO320	Kamieniškias	Kamieniškias	Kita
DLD1	Kamieniškias	Tarpinis	Kita
HCT116	Kamieniškias	Kamieniškias	CMS4
HT29	CN, imuniteto slopinimas	Stulpelinės dalies	CMS3
LoVo	Sutrikusi BNR veikla	Uždegiminis	CMS1
LS1034	CN, imuniteto slopinimas	Tarpinis	CMS2
NCI-H508	CN, imuniteto slopinimas	Tarpinis	CMS2
SW620	CN, Wnt aktyvacija	Kamieniškias	CMS4

Sadanadam et al. klasifikacijos sistema, labiau atsižvelgianti į ląstelių lokalizaciją kriptoje, kamieniškiam tipui priskyrė COLO320, HCT116 ir SW620 ląstelių linijas, DLD1, LS1034 ir NCI-H508 buvo priskirtos tarpiniam fenotipui, HT29 ir LoVo ląstelių linijos atitinkamai buvo priskirtos stulpelinės dalies ir uždegiminiam fenotipams. Šių nepriklausomų tyrėjų klasifikacijos sistemas apjungė Guinney et al., siūlydami SŽV klasifikaciją į 4 sutartinius molekulinis subtipus: CMS1 potipiui priklausantys navikai pasižymi mikrosatelinių sekų nestabilumu bei imunine aktyvacija, CMS2 – epitelinėmis savybėmis, aktyvuotais WNT ir MYC signalo perdavimo keliais, CMS3 priklauso KRAS mutacijas turintys navikai su aktyvuotais metabolizmo keliais bei CMS4, kuris pasižymi mezenchiminėmis savybėmis, aukšta stromos infiltracija, TGF- β ir VEGFR aktyvacija, be to, yra siejamas su prasčiausia klinicine prognoze (Guinney et al., 2015). Pagal šią klasifikaciją HCT116 ir SW620 linijos priskiriamos CMS4; HT29 – CMS3; LS1034 ir NCI-H508 – CMS2; LoVo – CMS1 grupėms; COLO320 ir DLD1 statistškai patikimai negali būti priskirtos konkrečiai CMS grupei. Sugrupavus tiriamas linijas pagal kelias literatūroje siūlomas klasifikacijos sistemas matoma,

jog ląstelių linijos – heterogeniškos ir pasižymi skirtingais fenotipais. Pagal visas klasifikacijos sistemas HCT116 ir SW620 ląstelių linijos priskiriamos kamieniškumo savybėmis pasižyminčioms grupėms.

1.2.2 Storosios žarnos vėžio kamieninės ląstelės

SŽV ląstelės pasižymi šiomis bendromis visoms vėžinėms kamieninėms ląstelėms savybėmis: savęs atsinaujinimu, daugiakrypčiu diferenciacijos potencialu, anomaliu proliferacijos signalų (Wnt, Notch, Hedgehog) aktyvinimu, aukštu gebėjimu inicijuoti naviko susidarymą, atsparumu vaistams bei radiacijai taip pat ir normalių kamieninių ląstelių savybėmis, tokiomis kaip neribotas dalijimosi potencialas, telomerazių aktyvumas bei nuo organo lokalizacijos priklausoma diferenciacija (Y. Zhou et al., 2018). Žmogaus SŽV kamieninės ląstelės pirmą kartą buvo išskirtos pagal CD133 paviršiaus žymenį ir buvo pademonstruotas jų gebėjimas inicijuoti navikus imunodeficitinėse pelėse (Ricci-Vitiani et al., 2007). Sveika storoji žarna yra sudaryta iš skirtingos diferenciacijos, turinčių specifines funkcijas epitelinių ląstelių, sudarančias raukšlėtą paviršių. Tarpai tarp raukšlių vadinami kriptomis, kurių pagrindą sudaro kamieninės bei dalinai diferencijuotos ląstelės, pasižyminčios aukšta Wnt signalo perdavimo kelio aktyvacija (Munro et al., 2018). Pademonstruota, jog ištyrus 44 kamieniškumu pasižyminčius navikus, 98% jų kilmė buvo susijusi su kripta (Sadanandam et al., 2013) (2 pav.). Siūlomos dvi teorijos, kaip atsiranda kamieninės SŽV ląstelės: pagal vieną iš jų sveikos kamieninės ląstelės įgyja onkogenines mutacijas ir pradeda nekontroliuojamą proliferaciją, pagal kitą – vėžinės ląstelės dediferencijuoja į kamieniškumu pasižyminčias ląsteles (Munro et al., 2018).



2 pav. Pagal Sadanadam sudaryti SŽV ląstelių pogrūčiai pagal savo transkripcijos profilius bei lokalizaciją kripteje. Nuo kriptos viršaus į apačią gradientiškai didėja Wnt signalo kelio aktyvinimas. Adaptuota pagal Medico (Medico et al., 2015).

Vienas iš būdų, kaip vėžinės ląstelės gali įgyti kamieniškumo savybes, yra epitelinė-mezenchiminė transformacija (EMT) – jai įvykus ląstelės tampa invazyvesnės, lengviau migruoja, geba inicijuoti naujų audinių susidarymą, o tai yra siejama su kamieniškumo savybėmis. Už EMT atsakingi transkripcijos faktoriai sukelia vėžinių epitelinių ląstelių dediferenciaciją, tuo pačiu VKL pasižymi aukštesne mezenchiminių žymenų raiška – tai rodo, jog ląstelių kamieniškumas ir EMT yra glaudžiai susiję (H. Wang & Unternaehrer, 2019).

1.2.3 Storosios žarnos vėžio kamieninių ląstelių žymenys

Svarbiausi SŽV kamieninių ląstelių molekuliniai žymenys:

CD133 (promininas-1) – transmembraninis glikoproteinas, kurio raiška pasižymi hematopoetinės, endotelio ir neuroepitelio ląstelės (Y. Zhou et al., 2018). Šis baltymas svarbus ląstelės morfologijai bei prisideda prie membranos pralaidumo chlorido jonams (Hori et al. 2019). Viename tyrime buvo pademonstruota, kad CD133⁺ ląstelės išskiria citokiną IL-4 ir taip išvengia chemoterapinio gydymo sukeltos apoptozės – tai patvirtino stebėjimas, jog IL-4 receptoriaus blokavimas specifiniais antikūnais stipriai padidino CD133⁺ ląstelių jautrumą chemoterapijai (Todaro et al., 2007).

CD44 – tai hialurono rūgšties receptorius, transmembraninis baltymas kuris reguliuoja ląstelių adheziją, tarpląstelines sąveikas bei migraciją (Y. Zhou et al., 2018). CD44 transkripcija bent iš dalies priklauso nuo Wnt signalo aktyvacijos, jo raiška vyksta ankstyvoje adenomos transformacijos į karcinomą stadijoje (Munro et al., 2018).

OCT 3/4 – turi reikšmės embriogenezeje, kamieninių ląstelių priežiūroje, naviko augimui bei metastazavimui (Munro et al., 2018). Šio žymens raiška taip pat stebima ląstelėse vykstant epitelinei – mezenchiminei transformacijai (Dai et al., 2013).

SOX2 – su DNR sąveikaujantis transkripcijos faktorius, dalyvaujantis homeostazėje, palaikant nediferencijuotą ląstelių būseną, regeneracijoje. Taip pat pademonstruota, jog SOX2 dalyvauja VKL populiacijos palaikyme SŽV (Takeda et al., 2018).

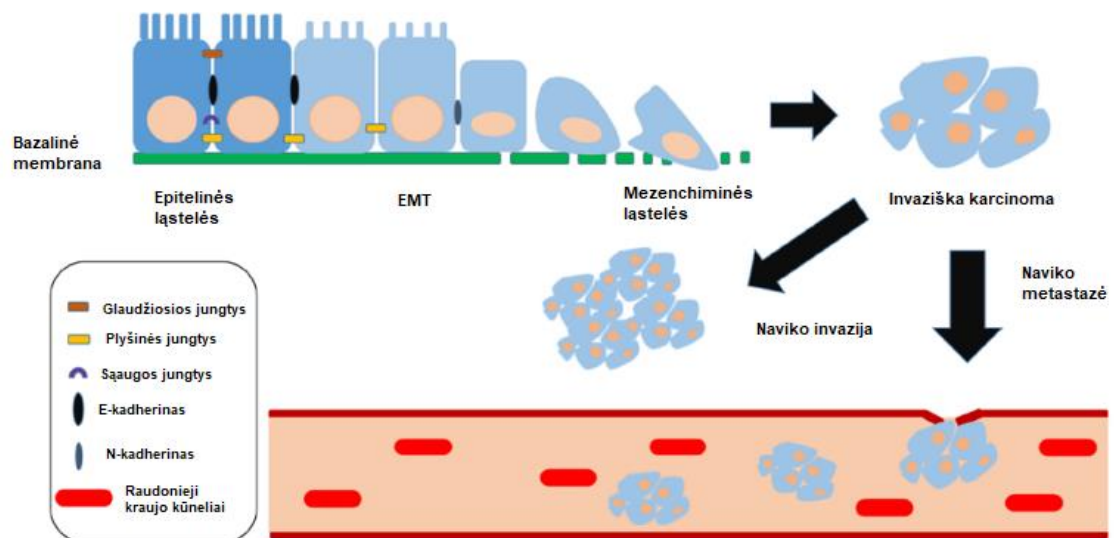
NANOG – vienas pagrindinių embrioninio vystymosi ir ląstelės perprogramavimo reguliatorių, dalyvaujantis ir signalo perdavime atsparumo chemoterapijai vystymosi, EMT, metastazės ir kituose VKL būdinguose procesuose. Taip pat siejamas su bloga ligos prognoze SŽV atvejuose (Jeter et al., 2015).

c-Myc – transkripcijos faktorius, reguliuojantis ląstelių augimą, ląstelės ciklą, metabolizmą ir išgyvenimą. Taip pat prisideda ir prie VKL būdingo atsparumo chemoterapijai (Elbadawy et al., 2019).

STAT3 – dalyvauja daugelyje sudėtingų procesų, skatinančių ir palaikančių VKL savybes. Tiesiogiai sąveikauja su daugeliu su VKL siejamų transmembraninių glikoproteinų (CD44, CD133) bei dalyvauja signalo perdavime, susijusiame su EMT, kuris yra laikomas vienu iš VKL susidarymo mechanizmų (Galoczova et al., 2018).

1.2.4 Epitelinė-mezenchiminė transformacija

Epitelinė-mezenchiminė transformacija (EMT) yra procesas, kurio metu epitelinės ląstelės įgyja mezenchiminį fenotipą (3 pav.). Pagal fiziologinį audinio kontekstą EMT skirstoma į tris tipus: embrioninio vystymosi/organų formavimosi, žaizdų gijimo/organų fibrozės ir vėžio progresavimo (Thiery et al., 2009). Vykstant EMT nutraukiamos naviko ląstelių glaudžiosios jungtys, išnyksta apikalinis – bazalinis poliariškumas, persitvarko ląstelės citoskeletas – tai padeda išsivystyti invaziškam ląstelių fenotipui (Vu & Datta, 2017). EMT procese dalyvaujantys veiksniai išskiriami į tris grupes: efektorinės molekulės, kurios vykdo EMT programą, EMT reguliatoriai (transkripcijos veiksniai) ir EMT induktoriai, kurie ją inicijuoja (Tsai & Yang, 2013).



3 pav. Epitelinė-mezenchiminės transformacijos modelis, kuriam būdingas epitelinių ląstelių poliškumo, tarpląstelinės jungčių praradimas jas paverčiant mezenchiminėmis ląstelėmis, kurioms būdingas judrumas ir invaziškumas. Paveikslėlis adaptuotas pagal Li (Li et al., 2018).

EMT charakterizuojama sumažėjusia epitelinių ląstelių jungtis sudarančių baltymų raiška (E – kadherinas, klaudinais, okludinais) ir, priešingai, padidėjusia baltymų, skatinančių mezenchiminę

adheziją, raiška (vimentinas, fibronektinas ir N - kadherinas) (Vu & Datta, 2017). Svarbiausias iš šių efektorinių baltymų laikomas E-kadherinas, kurio raiškos praradimas yra siejamas su bloga ligos prognoze trečios stadijos storosios žarnos vėžyje (Yun et al., 2014). Išskiriamos trys pagrindinės grupės EMT aktyvuojančių transkripcijos faktorių:

SNAIL – tai cinko pirštų fragmentą turinčių TF šeima, kurie skatina EMT pirmiausia slopindami E-kadheriną jungdamiesi prie jo geno promotoriaus ir taip pritraukdami histonų deacetilazes, demetilazes ir kitus baltymus (Vu & Datta, 2017). SNAIL šeimos baltymai taip pat aktyvina mezenchiminiam fenotipui būtinų baltymų (fibronektino, N-kadherino) raišką bei gali sąveikauti su β -kateninu ir taip aktyvinti Wnt signalo perdavimo kelią (Stemmer et al., 2008).

TWIST – turi spiralės-kilpos-spiralės motyvą ir dalyvauja įvairiuose ląstelės diferenciacijos ir vystymosi procesuose. EMT dalyvauja TWIST1 ir TWIST2 baltymai, kurie represuoja E-kadheriną bei skatina fibronektino, N-kadherino raišką (Yang et al., 2004). Šių baltymų raiška storosios žarnos navikuose pagrinde pasižymi stromos ląstelės, ir ši raiška siejama su labiau pažengusiomis limfmazgių metastazėmis bei blogesniu pacientų išgyvenamumu (Vu & Datta, 2017).

ZEB – EMT dalyvauja du šios TF šeimos atstovai – ZEB1 ir ZEB2, kurie prijungia reguliacines sekas, vadinamas E-dėžutėmis taip dalyvaudami kitų baltymų, tokių kaip SMAD, raiškos reguliacijoje (Vu & Datta, 2017). Pademonstruota, jog ZEB2 geno nutildymas miRNR sumažino storosios žarnos vėžio ląstelių migraciją bei invaziškumą (Kahlert et al., 2011).

Svarbiausi EMT indukuojantys signalo perdavimo keliai:

WNT / β -katenino – Wnt signalo kelias reguliuoja keletą biologinių procesų, tokių kaip ląstelių proliferacija, diferenciacija, organų formavimasis, audinių regeneracija ir naviko susidarymas (Jung & Park, 2020). SŽV pasižymi aukštu APC mutacijų skaičiumi (~70% visų atvejų) – šis baltymas formuoja β -katenino degradacijos kompleksą ir taip mažina Wnt kelio aktyvumą, dėl šios priežasties SŽV pasižymi Wnt kelio hiperaktyvumu (Jung & Park, 2020).

TGF- β – šis kelias yra išsiderinęs daugelyje susirgimų, įskaitant ir onkologinius. Sveikose ląstelėse ir ankstyvosiose vėžio stadijose šis kelias pasižymi naviką slopinančiu poveikiu, dalyvaudamas apoptozėje ir ląstelės ciklo arešte, tačiau vėlesniųjų stadijų onkologiniuose susirgimuose šis signalo kelias skatina naviko augimą, metastazavimą ir atsparumą chemoterapijai. Aukštas šio kelio aktyvumas siejamas su blogesne ligos prognoze (Colak & ten Dijke, 2017). Vėžinės ląstelės išvengia citotoksinio poveikio įgydamos mutacijas svarbius šiame signalo kelyje

dalyvaujančius baltymus (PI3K, AKT, RAS, MAPK, p53) koduojančiuose genuose. Tokiose ląstelėse TGF- β /SMAD kelias pradeda skatinti EMT, invaziškumą ir metastazavimą indukuodamas SNAIL ir SLUG, kurie slopina E-kadherino raišką (Moustakas & Heldin, 2016). TGF- β pasižymi imunitetą slopinančiu poveikiu prieš dendritines, NK ląsteles, makrofagus, CD4⁺ ir CD8⁺ T ląsteles bei skatina diferenciaciją į imunitetą slopinančias reguliacines T_{reg} ląsteles (W. Chen & Ten Dijke, 2016).

1.2.5 Kamieniškumą slopinančių junginių – SB-431542 ir salinomicino – veikimo mechanizmas

Pažengusių stadijų navikai pasižymi per aukšta TGF- β raiška, kuri veikia vėžinių ląstelių savybes ir sukuria mikroaplinką, palankią naviko metastazavimui (Xie et al., 2018). TGF- β signalo kelias perduodamas ligandui prisijungus prie TGF- β receptorių, kurie dimerizuojasi ir fosforilina savo specifinius receptorius (ALK – activin receptor like kinase) taip aktyvuodami bendrus kanoninius ir nekanoninius signalo perdavimo kelius (Staudacher et al., 2017). Mažamolekulinis junginys SB-431542 yra selektyvus ir stiprus ALK4, ALK5 ir ALK7 konkurencinis slopiklis (Cui et al., 2019). Pademonstruota, jog šis slopiklis geba sumažinti su vėžio kamieninėmis ląstelėmis siejamą CD133⁺ ląstelių populiaciją kasos vėžio modelyje (Lonardo et al., 2011). Kepenų vėžio modelyje šis junginys sumažino Smad baltymų aktyvaciją reikalingą vėžio kamieninių ląstelių atsinaujinimui, taip pat sumažino su kamieniškumu siejamų žymenų CD133, NANOG, Oct4, Sox2 raišką (Xia et al., 2017).

Salinomicinas yra monokarboksilinis polietėrinis antibiotikas, kuris, kaip buvo pademonstruota, pasižymi selektyviomis slopinančiomis savybėmis prieš kelių skirtingų audinių vėžio (krūties vėžio, leukemijos, storosios žarnos vėžio) kamienines ląsteles (J. Zhou et al., 2019). Taip pat kiaušidžių vėžio modelyje buvo pademonstruota, jog salinomicinas, veikiant kartu su paklitakseliu, sumažino su kamieniškumu siejamų žymenų, tokių kaip SOX2 ir OCT3/4 raišką, bei skatino kamieninių ląstelių apoptozę (Lee et al., 2017). Pademonstruota, jog salinomicinas buvo citotoksiškas CD44⁺ ESA⁺ SŽV ląstelių populiacijai, indukuodamas tokių ląstelių apoptozę, be to pelių modelyje šis vaistas slopino naviko augimą iš minėtų ląstelių populiacijos ir slopino Twist1 baltymo raišką (C. Zhang et al., 2015). Tikslus šio slopiklio veikimo mechanizmas nėra iki galo paaiškintas.

1.3 Naviko mikroaplinka

Naviko mikroaplinka – tai normalios ląstelės, molekulės bei kraujagyslės, apsupančios naviką ir sąveikaujančios su vėžinėmis ląstelėmis (NCI Dictionary of Cancer Terms). Naviko mikroaplinkoje esančios stromos ląstelės padeda naviko ląstelėms įgyti bei palaikyti Hanahan ir Weinberg išskirtas pagrindines vėžinių ląstelių charakteristikas skatindamos užląstelinės erdvės persitvarkymą, ląstelių

migraciją, neoangiogenezę bei padeda apsaugoti nuo priešvėžinio imuninio atsako išskirdamos įvairius augimo faktorius, chemokinus bei citokinus (Hanahan & Coussens, 2012). Su naviku susijusios stromos ląstelės kyla iš šešių skirtingų ląstelių tipų: fibroblastų, pericitų, kaulų čiulpų mezenchiminių ląstelių, adipocitų, endotelio ląstelių bei vėžinių ląstelių (Bussard et al., 2016).

Fibroblastai – normaliomis sąlygomis fibroblastai yra pagrindiniai tarpląstelinio užpildo gamintojai, taip pat atlieka esminį vaidmenį audinių atnaujinime, pažaidų taisyme (gamindami TGF- β), gali skatinti angiogenezę (gamindami VEGFA) bei koordinuoja imuninės sistemos darbą išskirdami įvairius citokinus bei chemokinus (Sahai et al., 2020). Su naviku susiję fibroblastai atlieka skirtingas funkcijas, kurios padeda naviko augimui: efektyviai dalyvauja užląstelinio matrikso pertvarkyme modifikuojant integrino palaikomą adheziją bei aktomiozino citoskeletą (Hooper et al., 2010), taip pat prisideda prie didesnio naviko audinio tvirtumo (Nguyen et al., 2019), išskiria augimo faktorius bei kitus citokinus, tokius kaip TGF- β , HGF, VEGF, IL-6, kurie taip pat gali slopinti imuninį atsaką (Sahai et al., 2020).

Pericitai ir endotelio ląstelės – naviko angiogeneze vadinamas procesas, kurio metu susidaro į ir iš naviko išeinančios naujos kraujagyslės, būtinos naviko augimui, nes tiekia deguonį, maisto medžiagas, pašalina metabolizmo produktus bei suteikia galimybę susidaryti metastazėms (Hida et al., 2018). Šių kraujagyslių vidų sudaro endotelio ląstelės ir pericitai, kurie apsupa kraujagysles iš išorės ir dalyvauja jų susitraukime ir atsipalaidavime. Pericitai išskiria VEGF, kuris skatina endotelio ląstelių išlikimą ir apsaugo jas nuo angiogenezę slopinančių vaistų poveikio (Meng et al., 2015).

Mezenchiminės stromos ląstelės – tai nesubrendusios stromos ląstelės, esančios įvairiuose organuose ir galinčios diferencijuotis į įvairius kitus ląstelių tipus, tokius kaip chondrocitai, osteoblastai, adipocitai, endotelio ląstelės ir miocitai (Phinney & Sensebé, 2013). Šios ląstelės dalyvauja naviko vystymesi skatindamos piktybines mutacijas, angiogenezę, metastazių formavimąsi, prisideda prie atsparumo priešvėžiniams vaistams bei palaiko vėžio kamieninių ląstelių populiaciją bei palaiko jų kamieniškumo savybes (Herve et al., 2017).

Adipocitai – buvo pademonstruota, jog susiję su naviku adipocitai išskiria faktorius, kurie dalyvauja užląstelinio užpildo pertvarkyme, skatina vėžinių ląstelių išlikimą ir invazyvumą bei indukuoja EMT (Xiong et al., 2015).

1.3.1 Uždegimas naviko mikroaplinkoje

Hanahan ir Weinberg naviko mikroaplinkai būdingą uždegimą apibūdino kaip vieną iš naviko vystymąsi įgalinančių veiksnių, kuris prisideda prie genominio nestabilumo, epigenetinių modifikacijų, vėžinių ląstelių proliferacijos skatinimo, apoptozės slopinimo bei vėžinių ląstelių atsiskyrimo nuo pirminio naviko (Hanahan & Weinberg, 2011). Uždegimas geriausiai žinomas kaip esminis procesas padedantis organizmui įveikti patogenus, tačiau šis procesas taip pat labai svarbus audinių pažeidimų taisymui, regeneracijai bei pertvarkymui ir audinių homeostazės palaikymui (Medzhitov, 2008). Atlikus daug tyrimų prieita prie išvados, jog imuninė sistema atlieka tiek slopinančią, tiek aktyvinančią funkciją visose tumorigenezės stadijose (Greten & Grivennikov, 2019). Efektyviam priešvėžiniam imuniniam atsakui susidaryti reikalingi keli etapai, vadinami vėžio-imuniteto ciklu: pirmiausia onkogenozės neoantigenai yra atpažįstami ir apdorojami dendritinių ląstelių (efektyviai aktyvacijai reikalingi uždegiminiai signalai iš citokinų bei žūstančių vėžinių ląstelių). Toliau dendritinės ląstelės ant MHC kompleksų pateikia antigenus naviesiems T limfocitams limfmazgiuose. T limfocitai aktyvuojasi ir migruoja į naviką, kur, atpažinusios antigeną ant vėžinių ląstelių, pastarąsias nužudo (D. S. Chen & Mellman, 2013). Ankstyvosiose vėžio stadijose citotoksinės imuninės ląstelės (NK ir $CD8^+$) atpažįsta imunogeniškas vėžines ląsteles ir taip selektyviai atranka imunitetui nepastebimų vėžinių ląstelių populiaciją tolimesnei proliferacijai (Teng et al., 2015). Pagrindiniai naviko mikroaplinkoje aptinkami imuninių ląstelių tipai:

Makrofagai – tai įgimtojo imuniteto ląstelės, kurios po ekstravazacijos į audinius diferencijuojasi iš kraujotakoje cirkuliuojančių monocitų ir yra prisitaikiusios aptikti bei reaguoti į infekcijas, audinių pažeidimus, dalyvauja audinių pažeidimų taisyme bei homeostazės užtikrinime (Lavin et al., 2015). Makrofagai yra viena iš gausiausių naviką infiltruojančių imuninių ląstelių grupių ir dalyvauja visose naviko vystymosi stadijose, didesnis jų kiekis naviko mikroaplinkoje paprastai koreliuoja su blogesne ligos eiga bei trumpesniu išgyvenamumu (Noy & Pollard, 2014).

Neutrofilai – tai vienos iš ankstyviausiai pritraukiamų į pažeistą audinį ląstelių, kurios atlieka patogenų pašalinimo, uždegimo moduliavimo funkcijas vykdydami fagocitozę, išskirdami antibakterinius baltymus, išskleisdami neutrofilinius užląstelinius tinklus bei vykdydami proteazių turinčių granulių egzocitozę (Kolaczowska & Kubes, 2013). Su naviku susiję neutrofilai pasižymi funkciniu heterogeniškumu – storosios žarnos vėžio atveju neutrofilai, pasižymintys aukšta $CD66^+$ raiška sustiprina $CD8^+$ T ląstelių gebėjimą žudyti vėžines ląsteles, tačiau taip pat pastebėta, kad IL-

17 jautrūs neutrofilai skatina naviko augimą, skatina angiogenezę išskirdami MMP9 ir VEGF (Gonzalez et al., 2018).

NK ląstelės – tai įgimtojo imuniteto ląstelės, pasižyminčios stipriu citoliziniu aktyvumu prieš infekuotas arba transformuotas ląsteles bei ant paviršiaus turinčios didelę įvairovę slopinančių ir aktyvinančių receptorių, kurios užtikrina tokių ląstelių atpažinimą (Cerwenka & Lanier, 2016). NK ląstelių infiltracija storosios žarnos bei skrandžio vėžiuose koreliuoja su geresne ligos prognoze – tai susiję su NK ląstelių gebėjimu aptikti nenormalios ląstelių proliferacijos, DNR pažeidų, RAS signalo kelio aktyvacijos išskiriamus ligandus, kuriuos atpažįsta aktyvuojantis NKG2D receptorius (Gonzalez et al., 2018).

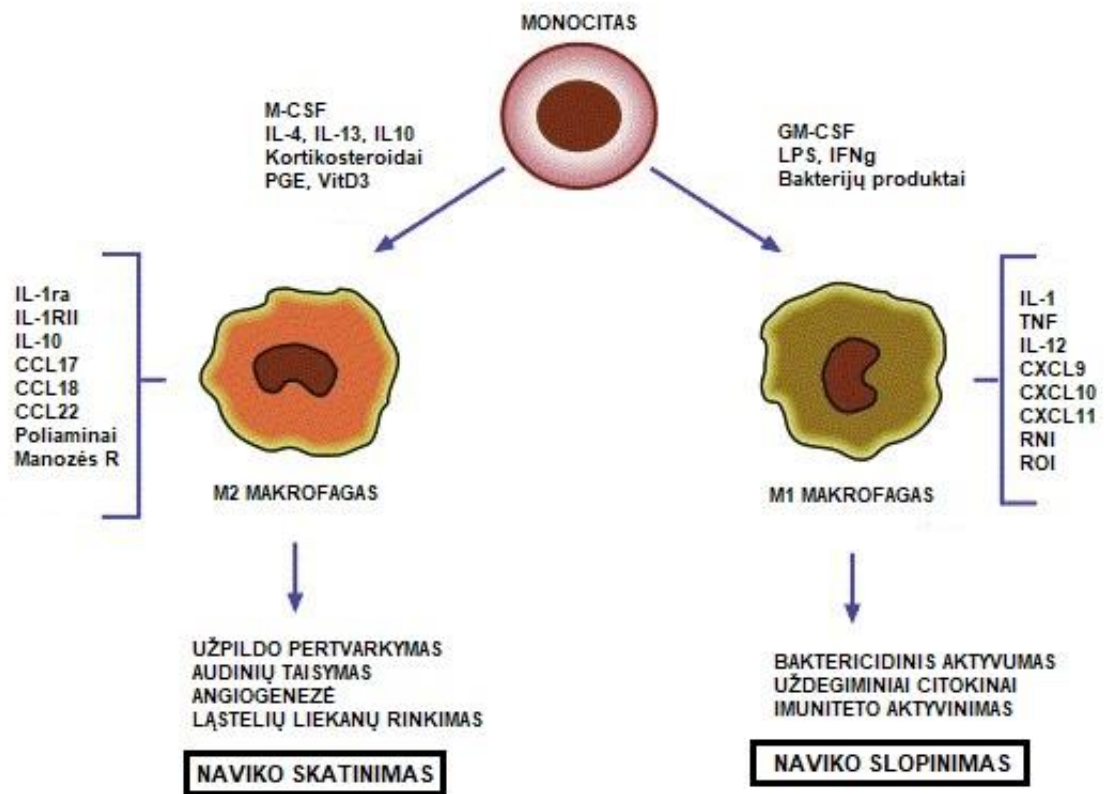
Dendritinės ląstelės – tai specializuotos antigenus MHC molekulių pagalba T ląstelėms pateikiančios ląstelės, naviko kontekste atliekančios esminį vaidmenį aktyvuodamos įgytąjį imunitetą. Buvo pademonstruota, jog storosios žarnos vėžio modelyje naviko ląstelės išskiria prostaglandiną E2 ir taip trukdo nuo NK ląstelių priklausomu mechanizmu pritraukti dendritines ląsteles į naviko mikroaplinką (Böttcher et al., 2018).

T limfocitai – tai įgytojo imuniteto komponentai, kurie priklausomai nuo imunologinių sąlygų gali veikti tiek skatindami uždegimą tiek jį slopindami (Speiser et al., 2016). Tai antra pagal paplitimą navikuose ląstelių rūšis po makrofagų ir aukšto lygio T ląstelių infiltracija yra siejama su geresne ligos prognoze (Gonzalez et al., 2018). Pagrindinės efektorinės priešvėžinio imuninio atsako ląstelės yra CD8⁺ T limfocitai, kurie atpažinę ant dendritinių ląstelių pateiktą antigeną, diferencijuoja į citotoksinius T limfocitus. Citotoksiniai T limfocitai, išskirdami perforino ir granzimo turinčias granules, žudo vėžines ląsteles, o šį poveikį stiprina CD4⁺ ląstelės, išskiriančios uždegiminius citokinus, tokius kaip IL-2, TNF- α ir IFN- γ (Gonzalez et al., 2018).

B limfocitai – po aktyvacijos limfinių organų gemaliniuose centruose, B ląstelės pasižyminčios aukšto afiniškumo antikūnų raiška diferencijuoja į plazmos ląsteles, kurios užtikrina humoralinio imuniteto veikimą (De Silva & Klein, 2015). Keli tyrimai demonstruoja, jog B limfocitai prisideda prie naviko augimo skatinimo slopindamos imunitetą per IL-10, TGF- β gamybą, skatina vėžinių ląstelių proliferaciją išskirdamos IL-35 ir stimuliuoja angiogenezę bei chronišką uždegimą išskirdamos imunoglobulinus į naviko mikroaplinką (Gonzalez et al., 2018).

1.3.2 Makrofagai naviko mikroaplinkoje

Besivystančio naviko mikroaplinka sudaryta iš besidalijančių ir žūstančių ląstelių, jai būdinga žema deguonies koncentracija, rūgštinis pH – šios sąlygos inicijuoja uždegiminę reakciją, kuri yra panaši į paprastą audinio pažeidimą (Ostuni et al., 2015). Bandydami atstatyti tokio nenormalaus audinio homeostazę, su naviku susiję makrofagai pasitelkia audinių pažeidimų gijimo mechanizmus, tokius kaip naujų kraujagyslių susidarymo skatinimas, ląstelių liekanų pašalinimas, trofinių signalų generavimas, audinių pertvarkymas bei imuniteto slopinimas (Noy & Pollard, 2014). Pagal skirtingas funkcines ypatybes bei priklausomai nuo mikroaplinkos generuojamų signalų makrofagai skirstomi į dvi grupes: klasikiniu būdu aktyvuoti M1 (būdingi žymenys: CD11c, CD68, CD69, CD80, CD86, CD195, CD197, CD274, HLA-DR) tipo makrofagai bei alternatyviai aktyvuoti M2 (būdingi žymenys: CD163, CD206) makrofagai (Gordon et al., 2014) (4 pav.). Makrofagus į M1 tipą



4 pav. Monocitų diferenciacijos keliai į klasikiniu būdu aktyvuotus, naviko augimą slopinančius M1 tipo makrofagus ir į alternatyviai aktyvuotus, naviko augimą skatinančius M2 tipo makrofagus. Adaptuota pagal Quatromoni (Quatromoni & Eruslanov, 2012).

polarizuoja mikrobiniai stimulai, tokie kaip lipopolisacharidas (LPS), ir Th1 citokinai, tokie kaip IFN-γ (Ruffell et al., 2012). M1 tipo makrofagai dalyvauja uždegiminiuose, mikrobicidiniuose ir priešvėžiniuose procesuose. Šią funkciją užtikrina kelios M1 makrofagų savybės: gebėjimas pristatyti antigenus, aukšta IL-6, IL-12 ir IL-23 gamyba, toksiškų metabolitų, tokių kaip aktyvių

deguonies ir azoto oksidų, sintezė, užpildo metaloproteazės MMP12 raiška (Cheng et al., 2019). Į M2 tipą makrofagus poliarizuoja Th2 citokinai, tokie kaip IL-4 ir IL-13 ir šio tipo makrofagai dalyvauja priešūždegiminiuose, audinių taisymo ir pertvarkymo, naviko augimą skatinančiuose bei imunoreguliaciniuose procesuose (Cheng et al., 2019).

Sutariama, jog su naviku susiję makrofagai ankstyvosiose stadijose demonstruoja M1 makrofagų savybes, tačiau vėlesnėse stadijose tampa panašūs į M2 tipo makrofagus, kurie skatina naviko augimą, tarpląstelinio užpildo pertvarkymą bei išskiria priešūždegiminius citokinus. Taip pat išskirdami chemokinus, šie makrofagai geba į naviką pritraukti cirkuliuojančius monocitus ir juos poliarizuoti į M2 fenotipą per IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 ir TGF- β (J. Wang et al., 2019). Krūties vėžio modelyje pademonstruotas teigiamas grįžtamasis ryšys tarp su naviku susijusių makrofagų ir EMT vykdančių vėžinių ląstelių – vėžinių ląstelių išskiriamas GM-CSF aktyvavo makrofagus, kurių išskiriamas CCL18 indukavo vėžinių ląstelių EMT (Su et al., 2014). Taip pat pademonstruota, jog su naviku susijusių makrofagų augimo terpė (sekretomas) padidino kamieniškumo savybes kepenų vėžio ląstelėse per TGF- β 1 indukuotą EMT (Q. M. Fan et al., 2014). M2 makrofagų išskiriamas TGF- β 1 indukavo gliomos ląstelių kamieniškumą bei migracines savybes per SMAD2/3 signalo perdavimo kelią (Liu et al., 2018). Krūties vėžio modelyje pademonstruota, jog svarbaus EMT transkripcijos faktoriaus SNAIL1 aktyvacija vėžinėse ląstelėse turėjo įtakos makrofagų poliarizacijai per GM-CSF, IL-1 α , IL-6 ir TNF- α gamybos reguliavimą (Brenot et al., 2018). Vėžio kamieninės ląstelės kiaušidžių vėžio modelyje gebėjo padidinti M2 makrofagų žymens CD206 raišką, taip pat buvo pademonstruotas teigiamojo grįžtamojo ryšio mechanizmas, kuriame tokie makrofagai palaikė vėžinių ląstelių kamieniškumą per Wnt signalo kelio aktyvaciją (Raghavan et al., 2019). Vėžio kamieninių ląstelių įtaką makrofagų poliarizacijai taip pat parodė ir glioblastomos kamieninių ląstelių išskiriamos egzomosos poliarizavo monocitus į imunitetą slopinantį M2 makrofagų tipą per STAT3 signalo perdavimo kelią (Gabusiewicz et al., 2018). Minėti eksperimentai rodo, jog vėžinių ląstelių kamieniškumas bei vykdoma epitelinė-mezenchiminė transformacija gali turėti įtakos makrofagų poliarizacijai į naviko vystymuisi palankesnę M2 tipą. Nors neseniai *in vitro* parodytas SŽV ląstelių linijų gebėjimas poliarizuoti makrofagus į M2 tipą (Lian et al., 2019a), šio tyrimo autoriai netyrė skirtumų tarp skirtingo molekulinio subtipo ląstelių linijų, todėl klausimas apie SŽV kamieniškumo ir imunomoduliacinių savybių ryšį išlieka ne iki galo atsakytas.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Aparatūra ir priemonės

2.1.1 Aparatūra

Tėkmės citometras (*BD Biosciences LSR II*), laminarinio oro srauto boksas (*Labgard NU-440, Nuair*), CO₂ inkubatorius (*Autoflow NU-5510, Nuair*), automatinis ląstelių skaičiuotuvas (*Adam, Digital Bio*), termostatas (*Model200, Memmert*), šaldoma centrifuga (*Rotixa 50RS Hettich*), šaldoma centrifuga (*ALC PK 120R*), šaldoma centrifuga (*Mikro22R, Hettich*), Eppendorf mėgintuvėlių centrifuga (*Centrifuge 5810R, eppendorf*), purtyklė (*Vortex V1 plus, Biosan*), inversinis mikroskopas (*Biolum P-1, Lomo*), termocikleris (*Eco Real-Time PCR system, Illumina*), termocikleris (*SensQuest lab cycler, Norway grants*), spektrofotometras (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*), chemoluminescencijos detektacijos aparatas C-DiGit (*LI-COR*).

2.1.2 Kitos priemonės

Automatinės pipetės ir antgaliai, ląstelių auginimo flakonai, 6 šulinėlių lėkštelės ląstelių auginimui, 96 šulinėlių plokštelės, 1,5 ml „Eppendorff“ tipo mėgintuvėliai, citometriniai mėgintuvėliai, 15/50 ml konusiniai mėgintuvėliai, vienkartinės graduotos 5 ir 10 ml pipetės, vienkartinės Pastero pipetės, „AccuChip“ plokštelės ląstelių skaičiavimui aparatu (*Adam, Digital Bio*), PGR plokštelės, plėvelė PGR plokštelės sandarinimui, įdėklai šulinėliams ląstelių kokultyvacijai (*SARSTEDT*).

2.1.3 Programinė įranga

Tėkmės citometro duomenų rinkimui skirta programa *FACS Diva* (*BD Biosciences*), tėkmės citometro duomenų analizei skirta programa *FlowJo* (*Tree Star*), kiekybinės PGR rezultatų analizei skirta programa *Eco Study* (*Illumina*), statistinė analizė bei karštųjų taškų žemėlapiui buvo gauti naudojant R programavimo kalbą programoje *RStudio* (*RStudio Team*).

2.2 Medžiagos

2.2.1 Reagentai

Su fluorochromais konjuguoti monokloniniai antikūnai (3 lentelė), dažų rinkinys, skirtas gyvų ir negyvų ląstelių skaičiaus nustatymui (*AccuStain Solution T/N*), Trizol (*Thermo Scientific*), chloroformas (*Sigma-Aldrich*), kopijinės DNR sintezės rinkinys „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit“ (*Thermo Scientific*), kiekybinės PGR reakcijos mišinys „Maxima SYBR Green qPCR

Master Mix (2x), no ROX“ (*Thermo Scientific*), RayBio žmogaus citokinų imunobloto gardelė C1000 (*RayBio*), citokinai IFN γ , IL-4 (*Thermo Scientific*), LPS (*R&D systems*), SB-431542 (*R&D Systems*), salinomicino natrio druska (*R&D Systems*).

3 lentelė. Darbe naudoti su fluoroforais konjuguoti monokloniniai antikūnai

Antikūnas	Fluoroforas	Gamintojas	Koncentracija	Dažymui naudotas kiekis	Žymuo
CD44	APC	<i>Miltenyi Biotec</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	2 μ l	Kamieniškumo
CD133	PE	<i>Miltenyi Biotec</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	2 μ l	Kamieniškumo
CD206	BV421	<i>BioLegend</i>	100 μ g/ml	1 μ l	M2 makrofagų
CD86	FITC	<i>EXBIO</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	3 μ l	M1 makrofagų
CD197	PE-Cy7	<i>BD Biosciences</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	1 μ l	M1 makrofagų
CD195	APC	<i>BD Biosciences</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	2 μ l	M1 makrofagų
CD274	FITC	<i>BD Biosciences</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	3 μ l	M1 makrofagų
CD80	V450	<i>BD Biosciences</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	1 μ l	M1 makrofagų
CD68	APC	<i>BioLegend</i>	25 μ g/ml	1 μ l	M1 makrofagų
CD69	PE	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	2 μ l	M1 makrofagų
HLA-DR	V500	<i>BD Biosciences</i>	Pagal gamintojo rekomendacijas	1 μ l	M1 makrofagų
CD11c	PE	<i>BD Biosciences</i>	400 μ g/ml	2 μ l	M1 makrofagų

2.2.2 Tirpalai

PBS – fosfatinis buferis (sudėtis: NaCl, NaH₂PO₄, NaH₃) (*Lonza*), Trypsin/EDTA tirpalas (*Gibco*).

2.2.3 Terpės

Darbe buvo naudota mitybinė terpė RPMI (*Lonza*), papildyta 10% fetalinio veršelio serumu (*Gibco*) ir antibiotikais (0,1 mg/ml streptomicino ir 100 µg/ml penicilino) (*Gibco*).

2.2.4 Genai ir pradmenys

4 lentelė. Darbe tirti genai ir jų padauginimo pradmenys

Genas	Koduojamas baltymas	Tiesioginis pradmuis	Atvirkštinis pradmuis	Žymuo
<i>ACTB</i>	β-aktinas	ATGGATGATGATATCGCC	ATCTTCTCGCGGTTGGCCTT	Kontrolinis genas
<i>HLA-DRA</i>	HLA-DR α grandinė	CAGGGATCCGCAGAGAATTAC	GTCCTGCAGTCACTCACCTCGGC G	M1
<i>CD274</i>	PD-L1	TGCCGACTACAAGCGAATTACTG	CTGCTTGTCCAGATGACTTCGG	M1
<i>STAT1</i>	STAT1	AACAGAAAAATGCTGGCACC	AGAGGTCGTCTCGAGGTCAA	M1
<i>IFNG</i>	IFNγ	CCAACGCAAAGCAATACATGA	CCTTTTTCGCTTCCCTGTTTTA	M1
<i>CD68</i>	CD68	TGTA AACGACGGCCAGT	CAGGAAACAGCTATGACC	M1
<i>IL6</i>	IL-6	GTAGCCGCCCCACACAGA	CATGTCTCCTTTCTCAGGGCTG	M1
<i>IL10</i>	IL-10	TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA	TCAGACAAGGCTTGGAACCCA	M2
<i>MMR</i>	MMR	CCTCTGGTGAACGGAATGAT	AGGCCAGCACCCGTTAAAAT	M2
<i>CD163</i>	CD163	CGAGTTAACGCCAGTAAGG	GAACATGTCACGCCAGC	M2
<i>ARG1</i>	Arg1	GGCAAGGTGATGGAAGAAAC	AGTCCGAAACAAGCCAAGGT	M2
<i>MARCO</i>	MARCO	CTGGTGGTCCAAGTTCTGAATCT	TCAGCCGCCAGAGTGTCA	M2
<i>CLEC7A</i>	Dektinas	TCTTTCCAGCCCTTGTCTCTC	CCAGTTGCCAGCATTGTCTT	M2

2.2.5 Tiriamoji medžiaga

Žmogaus SŽV ląstelių linijos (COLO320, DLD1, HCT116, HT29, LoVo, LS1034, NCI-H508 ir SW620) pirkto iš ATCC (*American Type Culture Collection*). Makrofagų diferenciacijai naudoti monocitai išskirti iš sveikų kraujo donorų trombocitų-leukocitų sluoksnio (pagal Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komisijos leidimą Nr. 158200-14-720-237).

2.3 Metodai

2.3.1 Makrofagų išskyrimas, diferenciacija ir poliarizacija

Monocitų išskyrimui ir tolimesnei makrofagų poliarizacijai naudojamas sveikų donorų periferinio kraujo leukocitų-trombocitų sluoksnis. Pradinė medžiaga centrifuguojama 15 min 1200 g su lėtu stabdymu. Geltonas plazmos sluoksnis pašalinamas. Baltas ląstelių sluoksnis (PKML – periferinio kraujo mononukleariniai leukocitai) nusiurbiamas ir du kartus skiedžiamas PBS. Į atskirus mėgintuvėlius įpilama po 10 ml fikolio, ant viršaus švelniai lašinama 10 ml PKML suspensijos. Mėgintuvėliai centrifuguojami 30 min 900 g su lėtu stabdymu. Po centrifugavimo ląstelės surenkamos ir praplaunamos 4 kartus šaltu PBS, centrifuguojama +4 °C 7 min 250 g su vidutiniu stabdymu. Ląstelės suskaičiuojamos ir užsėjamos po 3 mln PKML į 10 ml RPMI terpės be serumo į 100 mm skersmens Petri lėkštelę ir paliekamos per naktį prikibti prie augimo paviršiaus. Kitą dieną nusiurbiamą terpę su plaukiojančiais limfocitais. Prikibę monocitai atkabinami Trypsin/EDTA tirpalu, surenkami, perskaičiuojami tėkmės citometru įvertinant monocitų dalį surinktų ląstelių populiacijoje ir užsėjami į 6 šulinėlių plokštelę (0,5 mln monocitų į šulinėlį), užpilama 2 ml RPMI terpės su serumu. Veikiant 25 ng/ml M-CSF auginama 6 paras, kurių metu monocitai diferencijuojasi į M0 makrofagus. Toliau esant poreikiui 48 val. poliarizuojama į M1 tipą naudojant 15 ng/ml LPS ir 25 ng/ml IFN γ , arba į M2 tipą naudojant 25 ng/ml IL-4.

2.3.2 Tiriamų SŽV linijų genų raiškos skirtumų analizė naudojant viešai prieinamų duomenų bazių duomenis

Tiriamų ląstelių linijų charakterizavimui *in silico* buvo naudojami jų genų raiškos duomenys iš Vėžio genomo atlaso Vėžinių ląstelių linijų enciklopedijos duomenų bazės. Analizei atrinkti 55 su tiriamų ląstelių linijų kamieniškumu ir EMT susijusių genų raiškos profiliai buvo atsisiųsti naudojant cBioPortal internetinę programą (www.cbioportal.org). Naudojami genų raiškos duomenys buvo normalizuoti naudojant z-transformaciją, lyginant visų enciklopedijoje esančių ląstelių linijų genų raiškos duomenis. Skirtumų tarp ląstelių linijų reikšmingumui nustatyti buvo naudojamas neparametrinis Mann-Whitney-Wilcoxon kriterijus, grupuojant ląstelių linijas pagal paviršiaus žymenų raiškos tyrimų metu gautus rezultatus bei skirtingų literatūros šaltinių naudojamas klasifikacijas, konkrečiai, į kamieniškumu pasižyminčius ir nepasižyminčius subtipus (Guinney et al., 2015; Sadanandam et al., 2013).

2.3.3 Vėžinių ląstelių auginimas, persėjimas ir gyvybingumo skaičiavimas

Visos tiriamos storosios žarnos vėžio ląstelės (COLO320, DLD1, HCT116, HT29, LoVo, LS1034, NCI-H508, SW620) auginamos RPMI terpėje, praturtintoje 10% fetalinio veršelio serumo. Ląstelės užsėjamos į vienkartinius flakonus ir auginamos inkubatoriuje 37 °C esant 5% CO₂. Suformavus vienasluoksnį, ląstelės yra persėjamos (paprastai kas 3-4 dienas). Ląstelių persėjimas atliekamas laminariniam bokse, kuriame yra palaikomos sterilios sąlygos. Persėjant ląsteles pirmiausia nupilama sena terpė, praplaunama užpilant 1 ml PBS. Ląstelių atkabimui naudojama 1 ml Trypsin/EDTA tirpalo, inkubuojama apie 5 min 37 °C inkubatoriuje esant 5% CO₂. Ląstelės surenkamos iš flakono ir perkeliama į citometrinių mėgintuvėlių. Ląstelių gyvybingumo matavimas atliekamas naudojant rinkinio „AccuStain Solution T/N“ dažus: T (dažo visas ląsteles) ir N (dažo negyvas ląsteles). Ląstelės sumaišomos su dažu santykiu 1:1 ir užlašinamos ant specialios „AccuChip“ plokštelės. Ląstelių gyvybingumas ir skaičius įvertinami „Adam“ aparatu, į jį įdėjus plokštelę. Į naują flakoną įpilama 5 ml mitybinės terpės ir ląstelės užsėjamos 30000 ląst./ cm² tankiu.

2.3.4 Citokinų detekcija ląstelių linijų lizatuose naudojant baltyminę gardelę

Tyrimui naudoti vėžinių ląstelių lizatai gauti Trypsin/EDTA pagalba atkabintas ląsteles suspendavus PBS ir užšaldžius iki -20 °C. Tyrimo dieną ląsteles atšildžius iki kambario temperatūros gaunamas ląstelių lizatas. Citokinų detekcijai buvo naudojama RayBio C-1000 žmogaus citokinų imunobloto gardelė. Pirmiausia ant į atskirus šulinėlius įdėtų membranų su antikūnais prieš tiriamus citokinus užpilama 2 ml blokavimo buferio ir inkubuojama 30 min kambario temperatūroje. Tuomet aspiravus buferį į kiekvieną šulinėlį atskiroms ląstelių linijoms įpilama po 1 ml 5 mg/ml ląstelių lizato, inkubuojama per naktį +4 °C. Nusiurbus lizatą membranos plaunamos dviem skirtingais plovimo buferiais po 3 kartus. Toliau ant kiekvienos membranos užpilama 1 ml biotinilintų antikūnų tirpalo, inkubuojama 2 val. kambario temperatūroje. Tirpalas aspiruojamas ir kartojamas plovimas abiem plovimo buferiais. Ant nuplautų membranų užpilama 2 ml HRP-Streptavidino tirpalo ir inkubuojama 2 val. kambario temperatūroje, po inkubacijos kartojamas praplovimas. Paruoštos membranos perkeliama ant lygaus paviršiaus, ant jų užpilama detekcijos buferių mišinio ir inkubuojama 2 min. Iškart po inkubacijos membranos su išlaikymu fotografuojamos chemiliuminescenciją fiksuojančiu aparatu C-DiGit. Rezultatai analizuojami ImageJ programa, naudojant Protein Array Analyzer (Gilles Carpentier, 2010) papildinį.

2.3.5 Vėžinių ląstelių augimo terpės paruošimas

Ląstelės užsėjamos 3000 ląst./cm² tankiu į 100 mm skersmens Petri lėkštelę, kurioje yra 10 ml RPMI terpės (10% serumo) ir auginamos iki vienasluoksnio. Tada terpė nusiurbama, ląstelės praplaunamos PBS ir 24 val. inkubacijai užpilama RPMI terpė be serumo. Kitą dieną ši terpė nusiuriama ir nucentrifuguojama kambario temperatūroje 10 min 2000 g, supernatantas (eksperimentuose naudojama ląstelių augimo terpė) užšaldoma.

2.3.6 Netiesioginis makrofagų ir storosios žarnos vėžio ląstelių linijų kokultivavimas

Po 6 dienų makrofagų diferenciacijos 6 šulinėlių plokštelėje (0,5 mln ląstelių šulinėlyje) nupilama terpė ir patalpinami pusiau laidūs įdėklai, ant kurių 0,4 μm skersmens porų membranos užsėta po 0,5 mln storosios žarnos vėžio ląstelių. Įpilami 4 ml šviežios RPMI terpės su 10% serumo. Kokultivavimas vykdomas 48 val. po kurio surenkami abiejų ląstelių rūšių mėginiai tėkmės citometrijai bei kiekybinei PGR.

2.3.7 Dažymas monokloniniais antikūnais

Ląstelės atkabinaamos nuo augimo paviršiaus, surenkamos į citometrinį mėgintuvėlį. Nucentrifuguojama 5 min 250 g, nupilama terpė. Užpilama 1 ml PBS, vėl centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis ir nupilamas supernatantas. Ląstelės resuspenduojamos 100 μl PBS. Dažoma monokloniniais antikūnais. Inkubuojama 25 min +4 °C tamsoje. Po inkubacijos užpilama 1 ml PBS, ląstelės supipetuojamos bei nucentrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis, supernatantas nupilamas ir užpilama 30 μl PBS.

2.3.8 Ląstelių rinkimas tėkmės citometru ir jų analizė

Nudažius monokloniniais antikūnais ląstelės yra surenkamos *BD Biosciences LSR II* tėkmės citometru ir duomenys analizuojami *FlowJo* ir *FACSDiva* programomis. Ląstelės analizuojamos pagal jų dydį (FSC) ir granuliuitumą (SSC) bei pagal prie ląstelių paviršiaus antigenų prisijungusių monokloninių antikūnų fluorescensiją.

2.3.9 RNR išskyrimas ir gryninimas

Ląstelių kultūra lizuojama naudojant 0,5 ml Trizolio. Inkubuojama 5 min kambario temperatūroje, užpilama 0,1 ml chloroformo ir 15 s papurtoma, kad fazės gerai susimaišytų. Inkubuojama 2-3 min kambario temperatūroje ir centrifuguojama 15 min +4 °C šaldomoje centrifugoje 12000 g. Viršutinė bespalvė fazė nusiurbama į naują mėgintuvėlį, vidurinė ir apatinė

fazės pašalinamos. Ant viršutinės fazės užpilama 500 μ l izopropanolio, suvorteksuojama ir inkubuojama 10 min kambario temperatūroje. Centrifuguojama 10 min +4 °C 12000 g. Supernatantas nupilamas, nuosėdos užpilamos 1 ml 75% etanolio. Centrifuguojama 5 min +4 °C 7500 g, etanolis nusiurbiamas, o nuosėdos užpilamos 50 μ l vandens be nukleazių. RNR koncentracija matuojama „Nanodrop“ spektrofotometru ir vertinama RNR kokybė.

2.3.10 Kopijinės DNR sintezė

Kopijinė DNR sintetinama iš 500 ng RNR. Į kiekvieną mėginį pridedama 2 μ l atvirkštinės transkriptazės, 4 μ l reakcijos mišinio, vandens iki bendro 20 μ l tūrio ir viskas suvorteksuojama. Termocikleryje vykdoma atvirkštinės transkripcijos reakcija: inkubuojama 10 min +25 °C temperatūroje, vykdoma kDNR sintezė 30 min +50 °C ir reakcija baigiama fermentų inaktyvacija kaitinant 5 min +85 °C temperatūroje.

2.3.11 Kiekybinė PGR

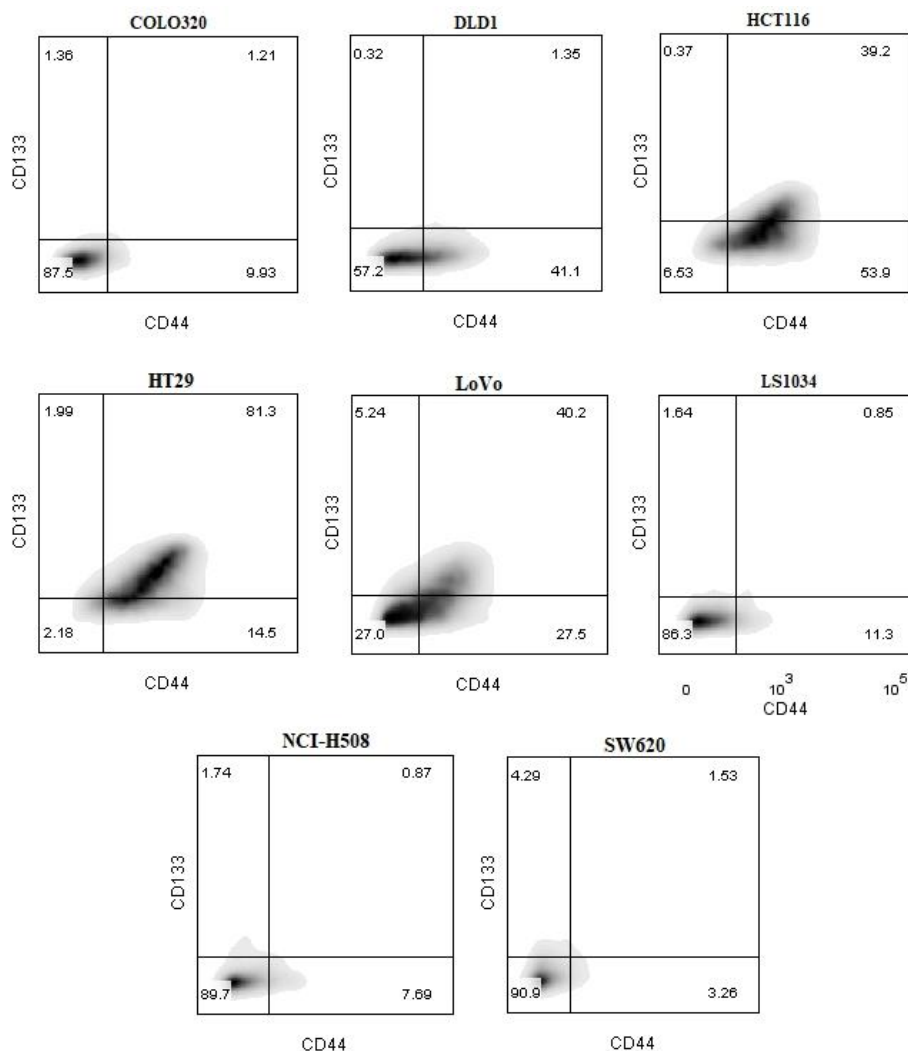
Į kiekvieną šulinėlį įpilama 2,5 μ l kDNR reakcijos produkto, 2,5 μ l pradmenų mišinio (0,2 μ M koncentracija galutiniame mišinyje) bei 5 μ l polimerazės mišinio. PGR reakcijos sąlygos: polimerazės aktyvacija atliekama 5 min +95 °C, tada vykdoma 40 ciklų po 40 s (10 s 95 °C ir 30 s 60 °C). Santykinis genų raiškos lygis buvo vertinamas naudojant β -aktino kontrolinį geną.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 SŽV ląstelių linijų su kamieniškumu susijusių paviršiaus žymenų raiškos tyrimas

Norint įvertinti tiriamų SŽV ląstelių linijų paviršiaus žymenų, susijusių su vėžinių ląstelių kamieniškumu, raišką, ląstelės buvo dažomos monokloniniais antikūnais prieš CD44, CD117, CD133 ir ESA žymenis bei tėkmės citometru buvo įvertinta juos turinti populiacijos dalis. Gauti rezultatai buvo lyginami su kontroliniu (nedažytu antikūnais) mėginiu. Visos ląstelių linijos pasižymėjo žema CD117 raiška (iki 5%). Visos ląstelių linijos, išskyrus COLO320, pasižymėjo aukšta ESA žymens raiška (ši žymenį turėjo daugiau nei 90% ląstelių populiacijos) – tokį rezultatą galima paaiškinti tuo, jog COLO320 ląstelių linija yra neuroendokrininės kilmės (Berg et al., 2017).

Įvertinus CD44 ir CD133 paviršiaus žymenų raišką buvo nustatyti skirtumai tarp ląstelių linijų (5 pav.).



5 pav. Reprezentatyvi tėkmės citometru surinktų ląstelių tankio diagrama. X ašyje atidėtas CD44, Y ašyje – CD133 žymens fluorescencijos intensyvumas. Grafikas suskirstytas į ketvirčius pagal nedažytą antikūnais kontrolinį mėginį.

Aukšta CD44 žymens raiška pasižymėjo HT29, HCT116 ir LoVo ląstelių linijos – šį žymenį turėjo atitinkamai 95,8%, 93,1% ir 67,7% ląstelių populiacijos, DLD1 linija pasižymėjo vidutine (42,4%) raiška, likusios – žema (iki 13%) raiška. Aukšta arba vidutine CD133 žymens raiška pasižymėjo HT29, LoVo ir HCT116 ląstelių linijos (atitinkamai 83,3%, 45,4% ir 39,6%), likusios pasižymėjo žema (iki 6%) šio žymens raiška. Ląstelių linijos pasižymėjo tokiais pačiais dėsningumais ir pagal ląstelių dalį turinčią ir CD44, ir CD133 paviršiaus žymenis – vidutine arba aukšta raiška pasižymėjo HT29, LoVo ir HCT116 linijos.

3.2 Tiriamų SŽV ląstelių linijų genų raiškos skirtumų analizė naudojant viešai prieinamų duomenų bazių duomenis

Iš Vėžio genomo atlaso Vėžinių ląstelių linijų enciklopedijos duomenų bazės (www.cbioportal.org) buvo atrinkti 55-ių su kamieniškumu susijusių genų (I priedas) raiškos profiliai tirtose SŽV ląstelių linijose. Grupuojant linijas pagal gautus rezultatus tiriant paviršiaus žymenų CD44 ir CD133 raišką bei skirtingų literatūros šaltinių naudojamas klasifikacijas į kamieniškumu pasižymintį ir nepasižymintį subtipus (Marisa et al. 2013; Sadanadam et al. 2013; Guinney et al. 2015) buvo atlikta lyginamoji analizė naudojant Mann-Whitney-Wilcoxon testą siekiant rasti genų raiškos skirtumus tarp taip sugrupuotų ląstelių linijų.

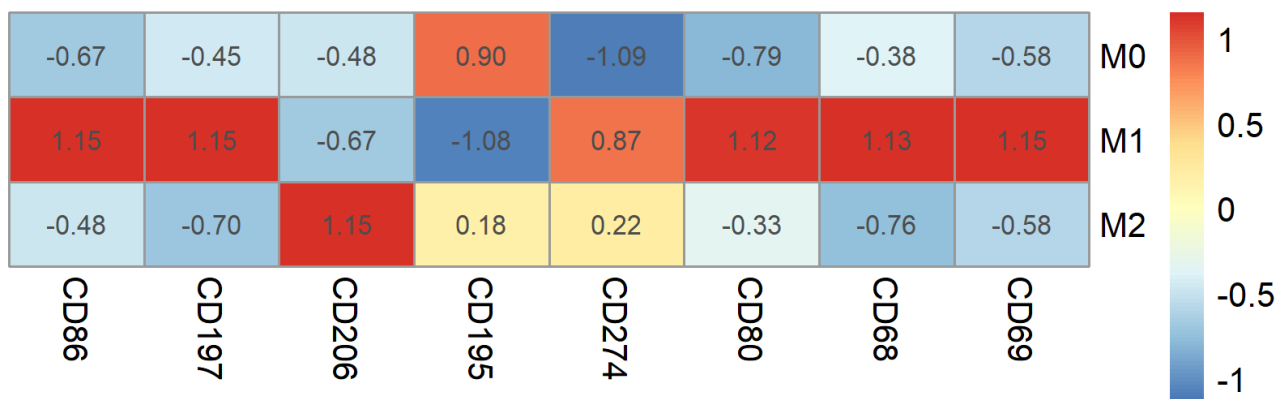
Pagal Guinney et al. kamienišku laikomam CMS4 subtipui priskiriamos HCT116 ir SW620 ląstelių linijos nuo likusių skyrėsi aukštesne *WNT1* geno raiška ($p = 0.04$). Pagal Sadanadam et al. kamieniškomis laikomos COLO320, HCT116 ir SW620 nuo kitų skyrėsi aukštesne *WNT1*, *SNAIL*, *ZEB1* bei žemesne *CDH1* ir *EPCAM* ($p < 0,05$) genų raiška. Sugrupavus linijas pagal gautus paviršiaus žymenų (CD44 ir CD133) raiškos tyrimo rezultatus HCT116, HT29 ir LoVo ląstelių linijos buvo priskiriamos vienai grupei (aukšta ir vidutinė raiška) ir nuo likusių statistiškai reikšmingai skyrėsi aukštesne *WNT7B*, *APC* ir *SMAD3* ($p < 0,04$) genų raiška.

Analizės rezultatai parodė, jog iš tirtų genų, daugiausia statistiškai reikšmingų pokyčių buvo pastebėta grupuojant linijas pagal Sadanadam et al. – COLO320, HCT116 ir SW620 linijoms, lyginant su kitomis, buvo būdingi EMT būdingi genų raiškos pokyčiai – aukštesnė EMT TF raiška, žemesnė epitelinių ląstelių žymenų raiška. Charakterizavus ląsteles pagal jų kamieniškumo/EMT žymenų raišką *in vitro* ir *in silico* buvo nuspręsta toliau ištirti, ar skirtingas kamieniškumo savybių išreikštumas (tuo pačiu skirtingas aplinkos permodeliavimo, EMT vykdymo potencialas) tiriamose ląstelių linijose gali turėti įtakos makrofagų poliarizacijai.

3.3 SŽV ląstelių linijų gebėjimo poliarizuoti makrofagus tyrimas

Tiriamųjų SŽV ląstelių linijų (COLO320, DLD1, HCT116, HT29, LoVo, LS1034, NCI-H508 ir SW60) imunomoduliacinės savybės buvo tiriamos įvertinant jų sekretomo gebėjimą sukelti makrofagų poliarizaciją.

Pirmiausia, iš sveikų donorų kraujo išskirti monocitai buvo diferencijuojami šešias dienas M-CSF pagalba iki M0 tipo makrofagų. SŽV sekretomo gavimui vėžinės ląstelės buvo auginamos iki vienasluoksnio, tuomet jų augimo terpė pakeičiama nauja terpe be serumo ir inkubuojama su makrofagais 24 val. Po inkubacijos surinkta augimo terpė atspindi ląstelių linijų sekretomą. Surinkta terpė pilama ant diferencijuotų M0 makrofagų santykiu 1:1 su standartine RPMI augimo terpe (10% serumo) 48 val. inkubacijai, po kurios tėkmės citometru matuojama paviršiaus žymenų raiška. Kaip teigiama kontrolė buvo naudojami makrofagai, kurie buvo poliarizuoti pagal standartinį protokolą: M1 poliarizacija sukelia 48h inkubacijos terpėje su LPS ir IFN γ , o M2 – tokios pačios trukmės inkubacija terpėje esant IL-4. Po poliarizacijos paviršiaus žymenų raiška tirama tėkmės citometru, kaip kiekybinį raiškos matą naudojant fluorescencijos intensyvumo medianą (FIM). Norint palyginti skirtingų ląstelių linijų sukeltus pokyčius makrofaguose, kiekvienam žymeniui gautiems duomenims atlikta z-transformacija, norint parodyti, kiek standartinių nuokrypių nuo visų žymens verčių vidurkio pasislinkusios kiekvieno mėginio FIM vertės. Taip pat mėginiai sugrupuoti naudojant hierarchinį klasterizavimą, norint įvertinti jų žymenų raiškos profilių panašumą. Kontroliniai M0, M1 ir M2 makrofagų tipų paviršiaus žymenų raiškos profiliai pateikiami 6 pav.

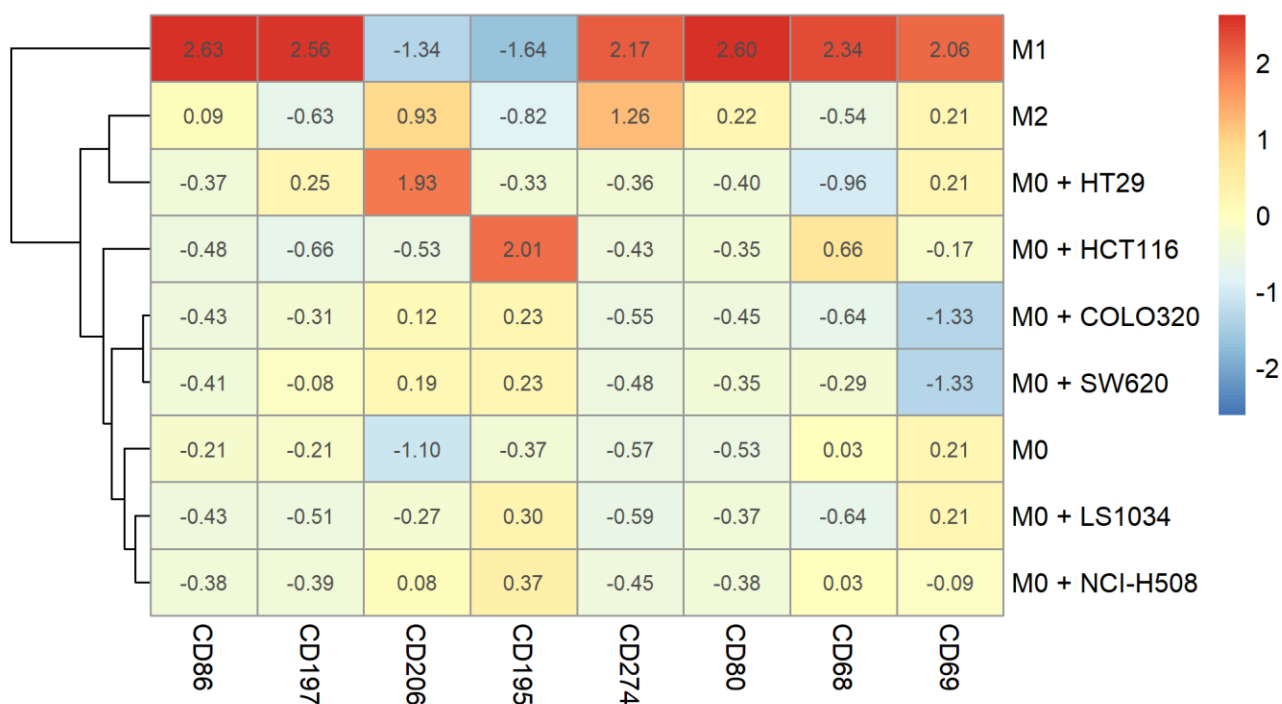


6 pav. Kontrolinių M0 ir pagal standartinį protokolą poliarizuotų M1 ir M2 makrofagų raiškos profiliai, atvaizduoti karštųjų taškų žemėlapyje. Kiekvieno žymens skirtingų mėginių FIM vertėms buvo atlikta z-transformacija ir kontroliniai mėginiai palyginami pagal gautas reikšmes. Raudona spalva žymi aukštesnę z-vertę, mėlyna – žemesnę.

Gauti rezultatai rodo, jog po M0 poliarizacijos į M1 tipą, padidėjo CD86, CD197, CD274, CD80, CD68, CD69 raiška, sumažėjo CD195 bei silpnai sumažėjo CD206 raiška. M2 poliarizacijos metu, lyginant su M0 makrofagais, ryškiai nesikeitė CD86, CD80, CD197, CD68 ir CD69 žymenų raiška,

tačiau padidėjo CD206, lyginant su M0, sumažėjo CD195 raiška (sumažėjimas mažesnis nei M1 poliarizacijos metu) bei lyginant su M1 tipu sumažėjo CD274 paviršiaus žymens raiška. Remiantis gautomis pagal standartinį protokolą atliktos poliarizacijos tendencijomis buvo vertinami ir SŽV ląstelių linijų sukelti pokyčiai makrofaguose.

SŽV linijų poveikis makrofagų poliarizacijai pateikiamas 7 pav. Rezultatai gauti skirtingomis ląstelių linijomis paveikus makrofagus apskaičiuojant dviejų eksperimentų metu gautų FIM vidurkių kiekvienam paviršiaus žymeniui. Norint įvertinti pokyčius, sukeltus skirtingų poveikių, kiekvienam žymeniui buvo atlikta z – transformacija bei linijos sugrupuotos naudojant hierarchinį klasterizavimą.

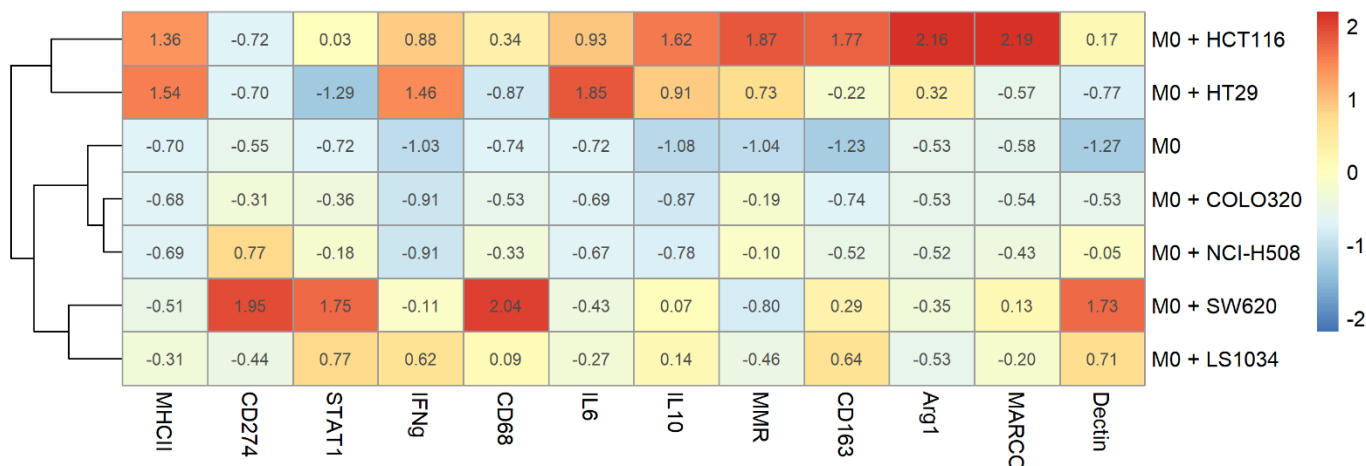


7 pav. Makrofagų paviršiaus žymenų raiškos pokyčiai po 48 val. poveikio SŽV augimo terpe atvaizduoti karštųjų taškų žemėlapyje bei hierarchinio klasterizavimo metodu sugrupuoti pagal žymenų raiškos panašumą. Kiekvieno žymens skirtingų mėginių FIM vertėms atlikta z-transformacija. Kiekvienas stulpelis atspindi paviršiaus žymenį, kiekviena eilutė – makrofagų mėginį paveiktą skirtingomis sąlygomis.

Rezultatai rodo, jog nei viena ląstelių linija neskatinė poliarizacijos į M1 tipo makrofagus – visų su M1 siejamų žymenų raiška buvo mažesnė nei klasikiniu būdu indukuotuose makrofaguose. Didžiausią panašumą į M2 poliarizuotus makrofagus sukėlė HT29 linijos sekretomo poveikis – svarbu atkreipti dėmesį į padidėjusią svarbaus M2 žymens CD206 raišką. Likusios ląstelių linijos savo paviršiaus žymenų raiškos profiliais buvo panašesnės į M0 tipo makrofagus, tačiau iš jų HCT116, COLO320 ir SW620 pagal klasterizavimo metu sudarytą dendrogramą savo transkripcijos profiliais buvo artimesnės M2 tipui nei LS1034 ir NCI-H508 ląstelių linijos – svarbu atkreipti dėmesį

į tai, jog poliarizaciją, artimesnę M2 tipui sukėlė ląstelių linijos pagal Guinney et al priskiriamos CSM4 (pasižyminčiai kamieniškumu) navikų grupei.

Norint padidinti SŽV linijų poveikį makrofagams bei ištirti makrofagų poveikį vėžinėms ląstelėms, tolimesniuose tyrimuose buvo vykdoma netiesioginė 48 val. ląstelių kokultivacija, kurios metu abiejų tipų ląstelės fiziškai nesiliesdamos tarpusavyje auga dalindamosi ta pačia augimo terpe. Po 48 val. kokultivacijos surinktų ląstelių paviršiaus žymenų (HLA-DR, CD206, CD80, CD86 ir CD11c) raiška buvo tiriama tėkmės citometru įvertinant nudažytų makrofagų fluorescencijos intensyvumą. Lygiagrečiai buvo atlikta kiekybinė PGR, kurios metu buvo matuojama šešių būdingų M1 (*HLA-DR*, *CD274*, *STAT1*, *IFNG*, *CD68*, *IL6*) ir šešių būdingų M2 (*IL10*, *MMR*, *CD163*, *ARG1*, *MARCO*, *CLEC7A*) genų raiška. Kiekybinės PGR metodu stebėtų pokyčių skalė buvo didesnė nei matuojant tėkmės citometru, todėl išsamesnei analizei buvo pasirinkti transkripciniai raiškos matavimo rezultatai (8 pav.).

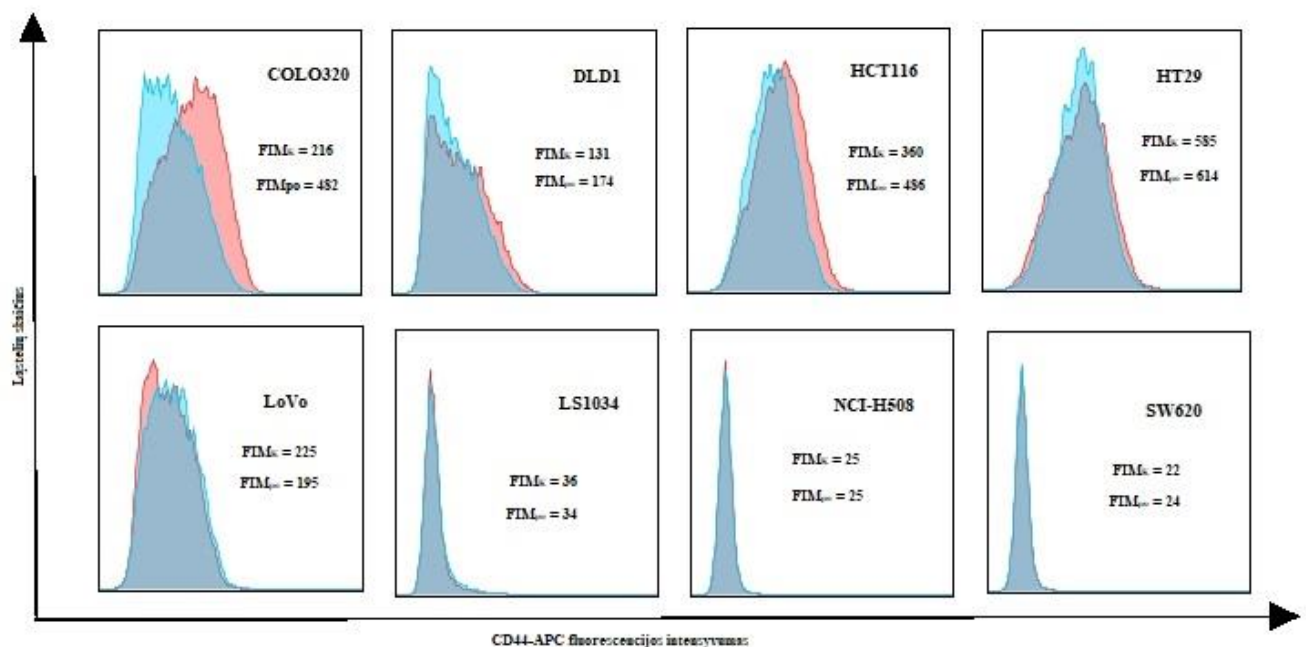


8 pav. Kiekybinės PGR metu gauti makrofagų žymenų raiškos pokyčiai po 48 val. netiesioginės kokultivacijos su SŽV ląstelėmis. Kiekvienam žymeniui skirtingiems mėginiams gautiems raiškos pokyčiams buvo atlikta z-transformacija. Kiekvienas stulpelis atspindi makrofagų žymenį, eilutė – skirtingomis linijomis paveiktus makrofagus.

Pagal gautus rezultatus tirtas SŽV ląstelių linijas galima suskirstyti pagal tarpusavio transkripcijos profilių panašumą bei gebėjimo poliarizuoti makrofagus lygį. Silpniausiu potencialu poliarizuoti makrofagus pasižymėjo COLO320 ir NCI-H508 ląstelių linijos, po klasterizavimo patenkančios į tą pačią grupę kaip ir M0 kontroliniai makrofagai. Į antrąją grupę pateko transkripcijos profiliais panašios SW620 ir LS1034 ląstelių linijos, iš kurių SW620 linija, lyginant su M0, makrofaguose stipriai padidino *CD274*, *STAT1*, *CD68* (M1 žymenys) bei *CLEC7A* (M2 žymuo) raišką – tai leidžia daryti prielaidą apie galimai stiprų šios linijos makrofagų poliarizacijos potencialą (labiau linkstantį į M1 tipą), tuo tarpu LS1034 potencialas buvo tik vidutiniškas. Į trečiąją, labiausiai besiskiriančią nuo kitų, grupę pateko HCT116 ir HT29 ląstelių linijos. Iš jų ypač stipriu poliarizacijos

potencialu pasižymėjo HCT116 linija – ja paveiktuose makrofaguose lyginant su kitomis linijomis stipriai padidėjo M2 specifinių žymenų (*IL6*, *IL10*, *MMR*, *CD163*, *Arg1*, *MARCO*) bei M1 žymenų (*HLA-DR*, *IFNG*) raiška. HT29 linijos poliarizacijos potencialas buvo vidutiniškas, tačiau šia linija paveikti makrofagai išsiskyrė aukštesne *HLA-DR*, *IFNG* (M1) ir *IL6* (M2) genų raiška. Kokultivavimas su HCT116 ir SW620 linijomis sukėlė didžiausius transkripcinius pokyčius makrofaguose, tačiau svarbu pabrėžti, jog šiuose makrofaguose didėjo abiejų makrofagų tipų žymenų raiška. Tai gali reikšti, jog kokultivavimas su šiomis ląstelių linijomis, kurios pagal literatūros šaltinius priskiriamos kamieniškumu pasižyminčių ląstelių linijų grupei, gali indukuoti poliarizaciją tiek į M1, tiek į M2, tiek į potencialiai mišrų makrofagų tipą.

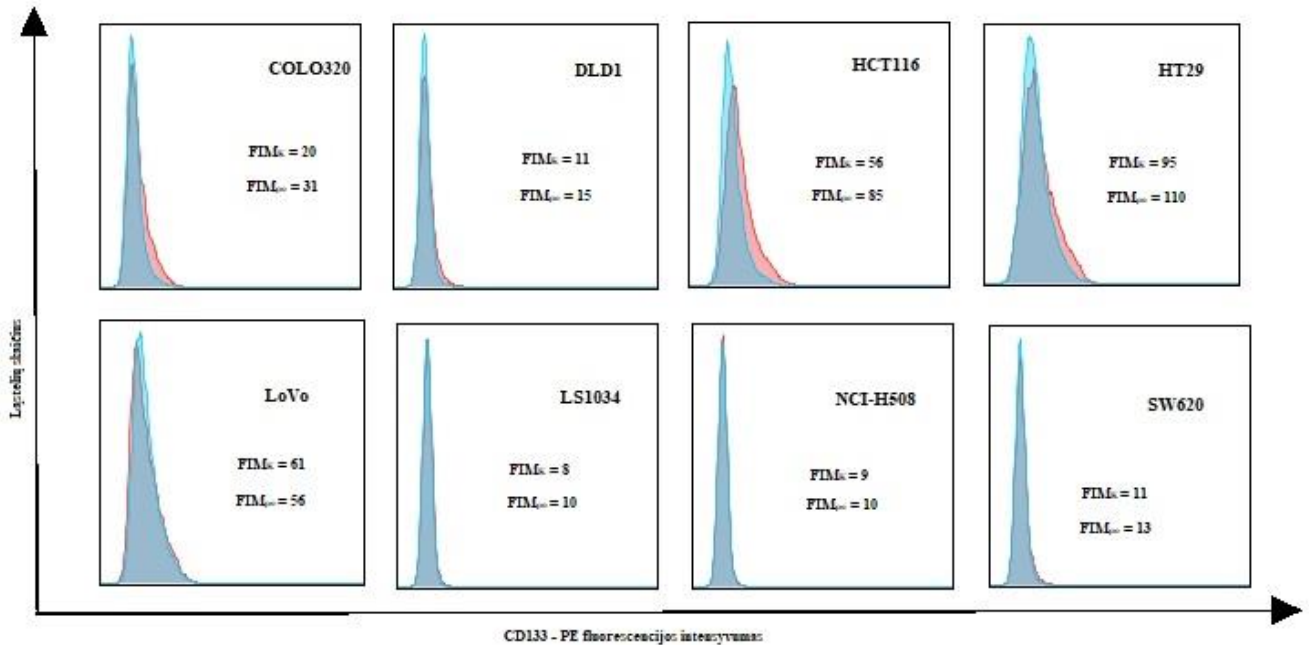
Norint įvertinti makrofagų poveikį SŽV ląstelėms po 48 val. kokultivavimo dėl pakankamos raiškos ankstesniuose tyrimuose buvo pasirinkti CD44 ir CD133 paviršiaus žymenys. CD44 ir CD133 žymenų raiškos pokytis buvo įvertintas pagal FIM vertę prieš ir po kokultivavimo ir grafiškai pavaizduotas nubraižius histogramas (9 ir 10 pav.).



9 pav. Histogramos, demonstruojančios CD44 žymens raiškos pokyčius SŽV ląstelių linijose prieš ir po kokultivacijos su makrofagais. Mėlynos spalvos histogramos žymi ląstelių populiaciją prieš, raudonos – po kokultivacijos. Grafikų X ašyje atidėtas CD44 fluorescencijos intensyvumas, Y – ląstelių skaičius.

Po kokultivavimo stebimas silpnas CD44 žymens raiškos padidėjimas keliuose ląstelių linijose. Didžiausias raiškos pokytis buvo stebimas COLO320 paveiktuose makrofaguose – FIM vertė padidėjo daugiau nei 2 kartus. HCT116 ir DLD1 paveikti makrofagai pasižymėjo ~30%, HT29 – iki 5% didesne FIM verte. Likusiose ląstelių linijose ši vertė išliko žema ir nepakitusi.

Panašios tendencijos buvo stebimos ir CD133 žymens raiškos pokyčiuose: jie buvo nedideli ir stebimi tų pačių ląstelių linijų paveiktuose makrofaguose. Su COLO320 ir HCT116 kokultivuoti makrofagai pasižymėjo ~50%, DLD1 – apie 35%, HT29 – iki 15% didesne CD133-PE fluorescencijos intensyvumo mediana.



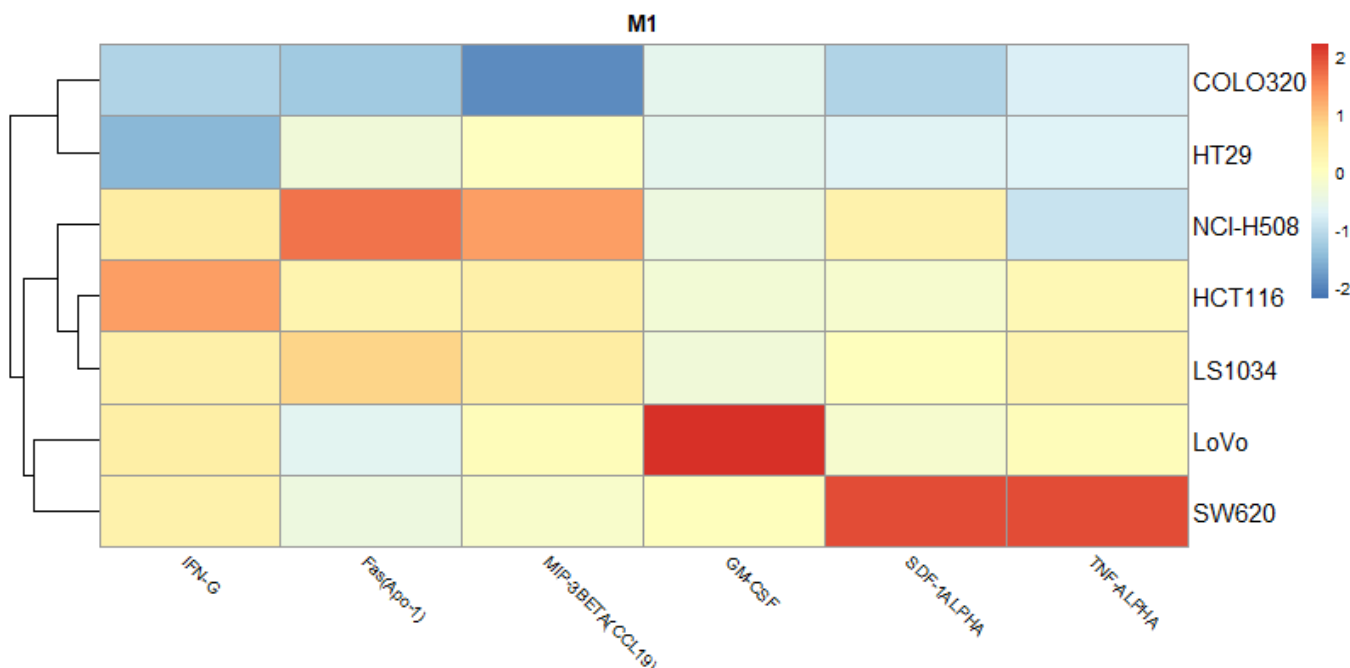
10 pav. Histogramos, demonstruojančios CD133 žymens raiškos pokyčius SŽV ląstelių linijose prieš ir po kokultivacijos su makrofagais. Mėlynos spalvos histogramos žymi ląstelių populiaciją prieš, raudonos – po kokultivacijos. Grafikų X ašyje atidėtas CD133 fluorescencijos intensyvumas, Y – ląstelių skaičius.

Nors pastebėti pokyčiai CD44 ir CD133 raiškoje nedideli, tačiau panašios tendencijos atsispindėjo ir pakartotiniuose kokultivacijos tyrimuose – tai leidžia daryti prielaidą, jog makrofagai parakrininio signalo perdavimo keliu gali veikti šių žymenų raišką vėžinėse ląstelėse.

3.4 SŽV linijų charakterizavimas naudojant žmogaus citokinų imunobloto gardelę

Norint paaiškinti kokultivacijos tyrimuose gautus rezultatus bei plačiau charakterizuoti tirtas SŽV ląstelių linijas buvo atliekama proteominė analizė naudojant 120 žmogaus citokinų tyrimo gardelę, kurios pagalba pusiau kiekybiškai galima įvertinti linijoms būdingų citokinų profilius. Tyrimas buvo atliekamas su septynių ląstelių linijų lizatais (COLO320, HCT116, HT29, LoVo, LS1034, NCI-H508, SW620) paveikiant membranas su konjuguotais antikūnais, naudojant biotino-HRP-streptavidino žymėjimo sukeltą chemiliuminescenciją kaip detekcijos sistemą. Gauti rezultatai analizuojami ImageJ programos Protein Array Analyzer papildiniu (Gilles Carpentier, 2010), normalizuojant duomenis pagal didžiausią chemiliuminescencijos vertę membranose. Gauti rezultatai atvaizduoti karštųjų taškų žemėlapyje, naudojant hierarchinį klasterizavimą grupuojant SŽV ląstelių linijas pagal citokinų profilių panašumą.

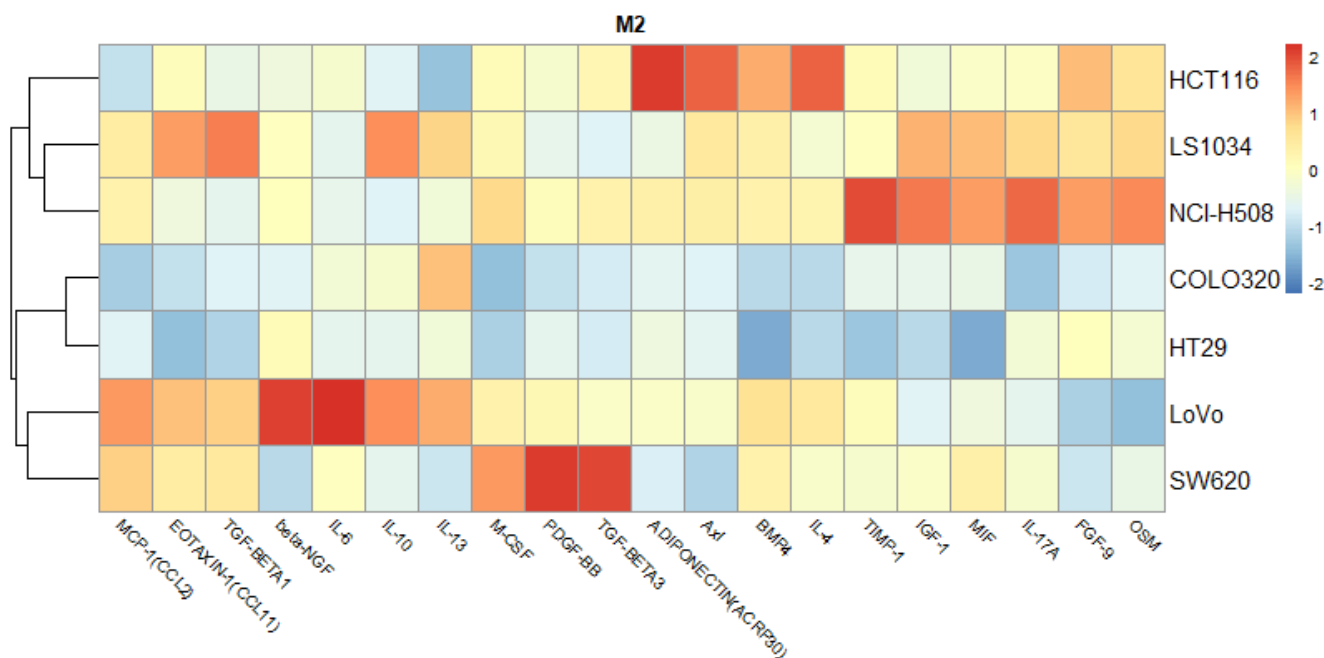
Pirmiausia iš visų tirtų baltymų buvo atrinkti šeši citokinai, dalyvaujantys makrofagų poliarizacijoje į M1 tipą (11 pav.). Gauti rezultatai rodo, jog lyginant su likusiomis linijomis, SW620 linija pasižymėjo didžiausia SDF-1 α ir TNF- α citokinių koncentracija.



11 pav. Su M1 makrofagų poliarizacija susijusių citokinių karštųjų taškų žemėlapis, atspindintis normalizuotas citokinių raiškos tyrimo gardelės chemoluminescencijos intensyvumo vertes. Kiekvienas stulpelis atspindi ląstelių liniją, eilutė – citokiną. Virš žemėlapio esanti dendrograma atspindi citokinių profilių panašumą.

Svarbu atkreipti dėmesį, jog kokultivacijos tyrimuose SW620 linija galimai pasižymėjo potencialu poliarizuoti makrofagus į M1 tipą – šis gebėjimas gali būti susijęs su padidėjusia minėtų citokinių, ypač stipriu uždegimą skatinančiu poveikiu pasižyminčiu TNF α , koncentracija. Iš tirtų linijų HCT116 pasižymėjo didesne nei likusių linijų IFN- γ koncentracija.

Toliau buvo atrinkti M2 makrofagų poliarizacijoje dalyvaujantys citokinai (12 pav.). Analizuojant gautus duomenis stebima, jog COLO320 ir HT29 linijos pasižymėjo žemesne nei kitų visų citokinių koncentracija. HCT116 ląstelių linijai būdinga didesnė nei likusių linijų ACRP30, Axl, BMP4 ir IL-4 koncentracija. NCI-H508 būdinga didesnė TIMP-1, IGF-1, MIF, IL-17A, FGF-9 ir OSM koncentracija, LoVo išsiskyrė didžiausiomis iš tirtų linijų CCL2, β -NGF, IL-6, IL-13 koncentracijomis. SW620 būdinga didesnė nei likusių M-CSF, PDGF-BB, TGF- β -3 koncentracija.



12 pav. Su M2 makrofagų poliarizacija susijusių citokinų karštųjų taškų žemėlapis, atspindintis normalizuotas citokinų raiškos tyrimo gardelės chemoluminescencijos intensyvumo vertes. Kiekvienas stulpelis atspindi ląstelių liniją, eilutė – citokiną. Virš žemėlapio esanti dendrograma atspindi citokinų profilių panašumą.

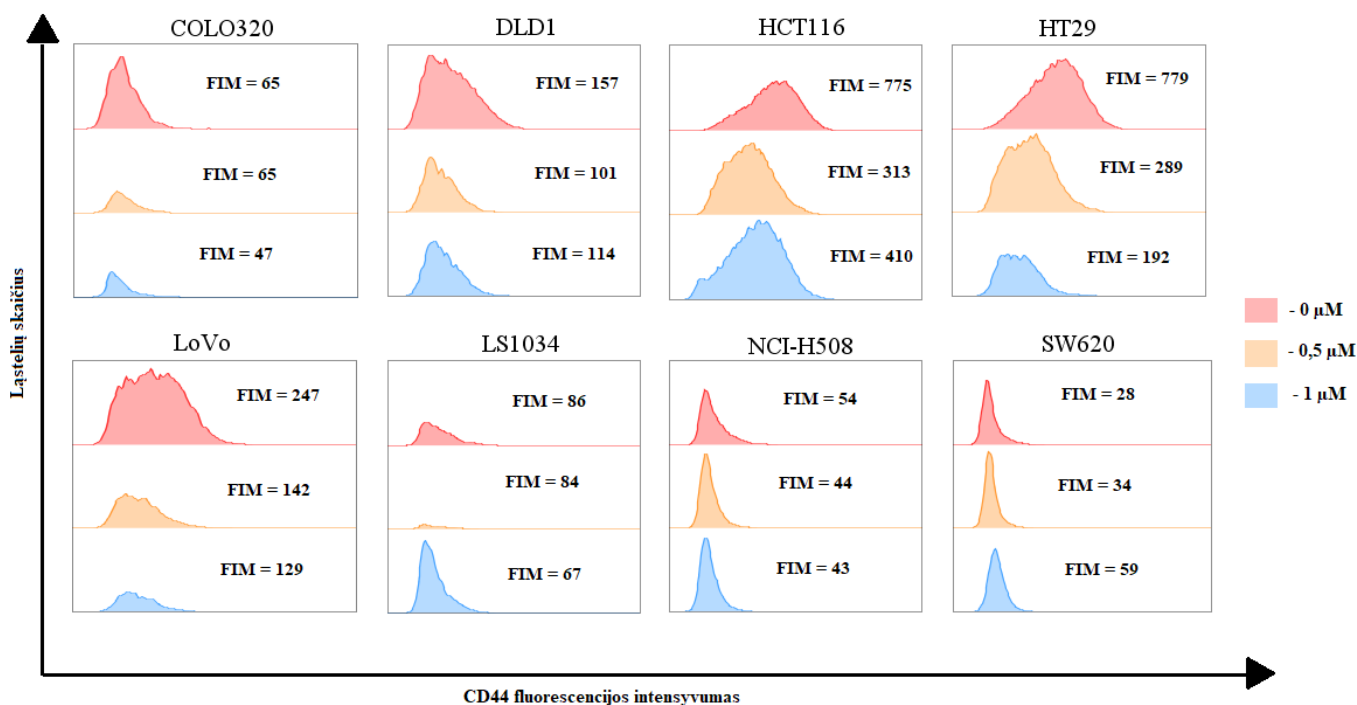
Apibendrinant, COLO320 pasižymėjo mažiausiomis tiek į M1, tiek į M2 poliarizuojančių citokinų koncentracijomis – tai sutampa su kokultivacijos metu stebėtu silpnu šios linijos gebėjimu indukuoti M0 tipo makrofagų poliarizaciją. Atrinkus M2 poliarizuojančius citokinus, ląstelių linijos pasižymėjo skirtingais citokinų profiliais – HCT116, LS1034, NCI-H508, LoVo ir SW620 pasižymėjo didesnėmis, lyginant su kitomis linijomis, tam tikrų citokinų grupių koncentracijomis. Netiesioginės kokultivacijos metu stipriausiu polinkiu poliarizuoti į M2 tipą pasižymėjusi HCT116 linija pasižymėjo didesne nei likusių IL-4 koncentracija – tikėtina, tai yra svarbus šios linijos poliarizacijos potencialo faktorius, atsižvelgiant į tai, jog klasikinei M2 makrofagų poliarizacijai (pasitelktai ir šiame tyrime) naudojamas būtent šis citokinas.

3.5 Salinomicino ir SB-431542 įtaka su kamieniškumu susijusių paviršiaus žymenų raiškai SŽV ląstelių linijose

Makrofagų kokultivavimo su SŽV ląstelių linijomis metu pastebėta, jog didesniu makrofagų poliarizacijos potencialu pasižymėjo ląstelės, priskiriamos kamieniškam subtipui (HCT116 ir SW620). Siekiant patyrinėti kamieniškumo savybių įtaką SŽV ląstelių imunomoduliacinėms savybėms buvo pasitelkti du slopikliai: vėžio kamieninių ląstelių slopiklis salinomicinas ir specifinis TGF- β receptoriaus kinazės slopiklis SB-431542. Pirmiausia buvo įvertinta šių slopiklių įtaka tiriamų

SŽV ląstelių linijų paviršiaus žymenų CD44 ir CD133 raiškai – ląstelės buvo veikiamos skirtingomis abiejų junginių koncentracijomis (salinomicinas – 0,5 ir 1 μ M, SB-431542 – 1 ir 10 μ M) ir auginamos įprastinėmis sąlygomis 48 val. Po inkubacijos ląstelės buvo dažomos monokloniniais antikūnais ir tėkmės citometru įvertinamas fluorescencijos intensyvumas.

Po inkubacijos su salinomicinu atrinktose gyvose ląstelėse šio slopiklio sukelti CD44 žymens raiškos kiekybiniai pokyčiai grafiškai pavaizduoti histogramomis (13 pav.). Raiškos pokyčiai buvo vertinami lyginant fluorescencijos intensyvumo medianos (FIM) vertes tarp kontrolinio ir paveikto 1 μ M salinomicino mėginių.

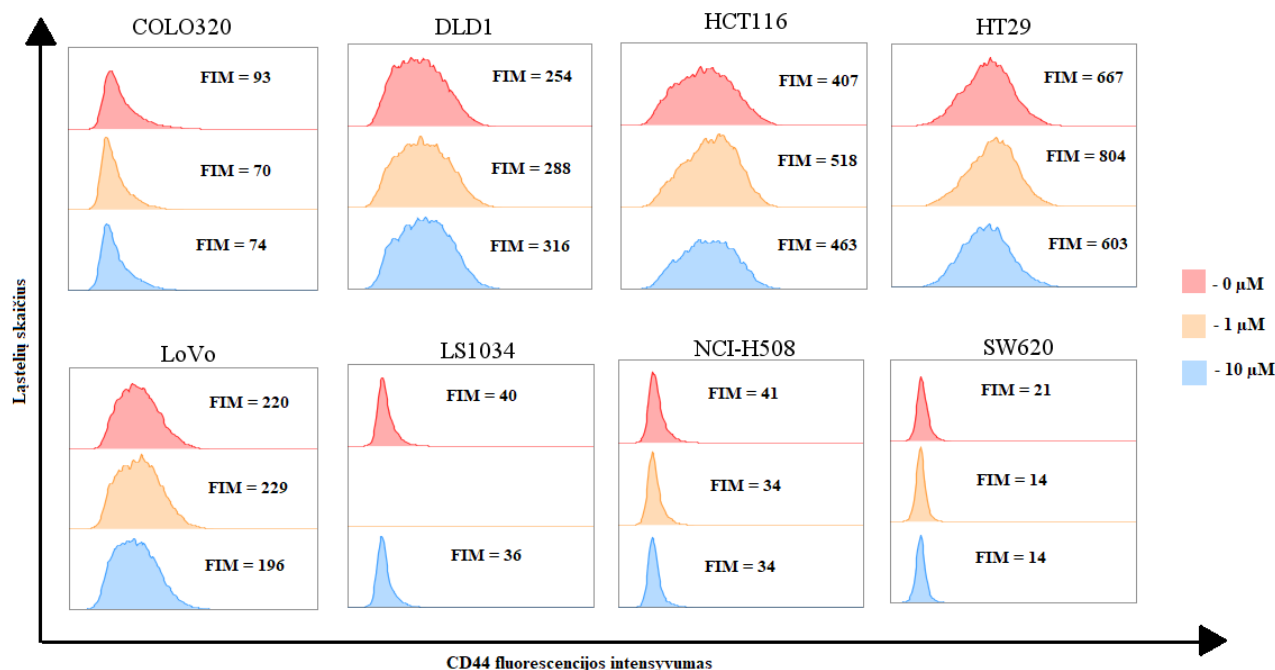


13 pav. Skirtingų salinomicino koncentracijų sukelti CD44 žymens raiškos pokyčiai pavaizduoti skirtingų spalvų histogramomis. X ašyje nurodyta CD44 fluorescencijos intensyvumas, Y ašyje – ląstelių skaičius. Raudona spalva žymima 0 μ M, oranžinė – 0,5 μ M, mėlyna – 1 μ M salinomicino koncentracija. Šalia nurodytos FIM (fluorescencijos intensyvumo medianos) konkrečiam mėginiui.

Didžiausias pokytis pastebėtas HT29, HCT116 ir LoVo ląstelių linijose – stebimas FIM vertės sumažėjimas atitinkamai 75%, 47% ir 48%. Svarbu atkreipti dėmesį, jog šiose ląstelių linijose prieš inkubaciją CD44 žymens raiška buvo didžiausia. Vidutiniškai arba silpnai šio žymens raiška sumažėjo COLO320, DLD1, LS1034 ir NCI-H508 linijose (FIM sumažėjimas svyravo nuo 28% iki 20%). Apibendrinant, po inkubacijos su salinomicinu stebimas CD44 raiškos sumažėjimas visose ląstelių linijose, išskyrus SW620, kurioje žymens raiška nežymiai padidėjo.

CD133 žymens raiškos sumažėjimo skalė, lyginant su CD44, buvo mažesnė – FIM vertė buvo nežymiai mažesnė COLO320, HT29, LoVo, NCI-H508 ir SW620 ląstelių linijose.

Po inkubacijos su SB-431542 tirta CD44 raiška atvaizduota histogramose (14 pav.). Įvertinus skirtingų mėginių fluorescencijos intensyvumo medianas pastebėta, jog šešiose iš aštuonių linijų po tirto slopiklio poveikio šio dydžio vertė nežymiai sumažėjo. Taip pat pastebėta jog šis sumažėjimas priklausė nuo SB-431542 koncentracijos. DLD1 ir HCT116 linijose CD44 žymens raiška nesumažėjo arba padidėjo. Po inkubacijos tiriant CD133 žymens raišką jokių pokyčių nepastebėta.



14 pav. Skirtingų SB-431542 koncentracijų sukelti CD44 žymens raiškos pokyčiai pavaizduoti skirtingų spalvų histogramomis. X ašyje nurodyta CD44 fluorescencijos intensyvumas, Y ašyje – ląstelių skaičius. Raudona spalva žymima 0 μM, oranžine – 1 μM, mėlyna – 10 μM SB-431542 koncentracija. Šalia nurodytos FIM (fluorescencijos intensyvumo medianos) konkrečiam mėginiui.

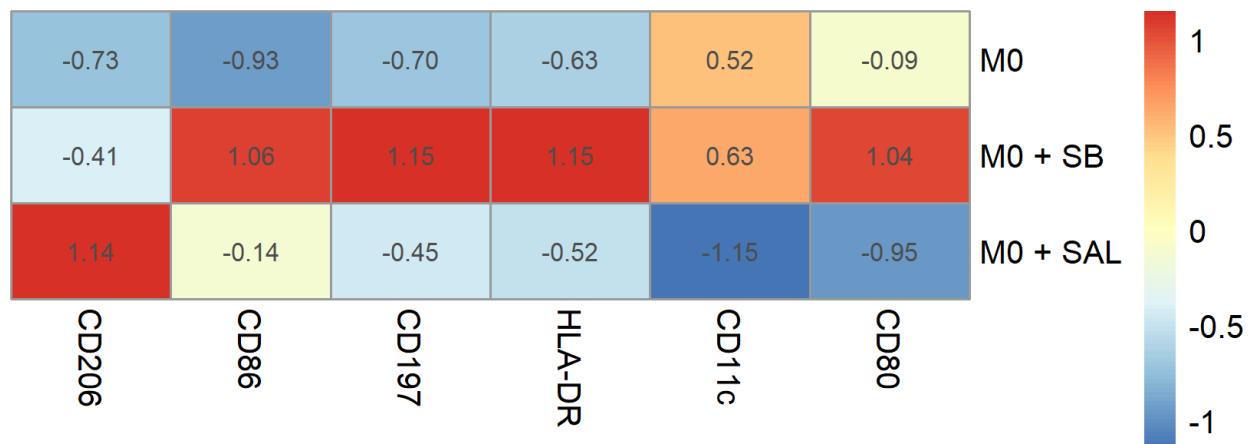
Lyginant su rezultatais, gautais po inkubacijos su salinomycinu, SB-431542 sukelti tirtų paviršiaus žymenų (CD44 ir CD133) raiškos pokyčiai buvo mažesni. Tai rodo stipresnę salinomicino potencialą slopinti su kamieniškumu siejamų paviršiaus žymenų raišką SŽV ląstelių linijose bei platesnio spektro kamieniškumo slopinimo poveikį, lyginant su SB-431542, kuris specifiskai blokuoja tik viena iš kamieniškumo vystymesi dalyvaujančių kelių – TGF-β.

3.6 SB-431542 ir salinomycinu paveiktų SŽV ląstelių linijų gebėjimo poliarizuoti makrofagus tyrimas

Norint įvertinti kamieniškumo savybes slopinančiais junginiais paveiktų SŽV ląstelių linijų gebėjimą poliarizuoti makrofagus buvo atliekama anksčiau aprašyta vėžinių ląstelių netiesioginė kokultivacija su makrofagais, papildomai į augimo terpę įdedant 10 μM SB-431542 arba 0,5 μM salinomicino ir inkubuojant standartinėmis sąlygomis 48 val. Pokyčių makrofaguose įvertinimui tėkmės citometrijos būdu buvo pasirinkti CD11c, CD80, CD86, CD197, CD206 ir HLA-DR

paviršiaus žymenys. Duomenys analizuojami ir pateikiami ta pačia metodika kaip ir ankstesni makrofagų poliarizacijos po kokultivavimo įvertinimo tyrimai.

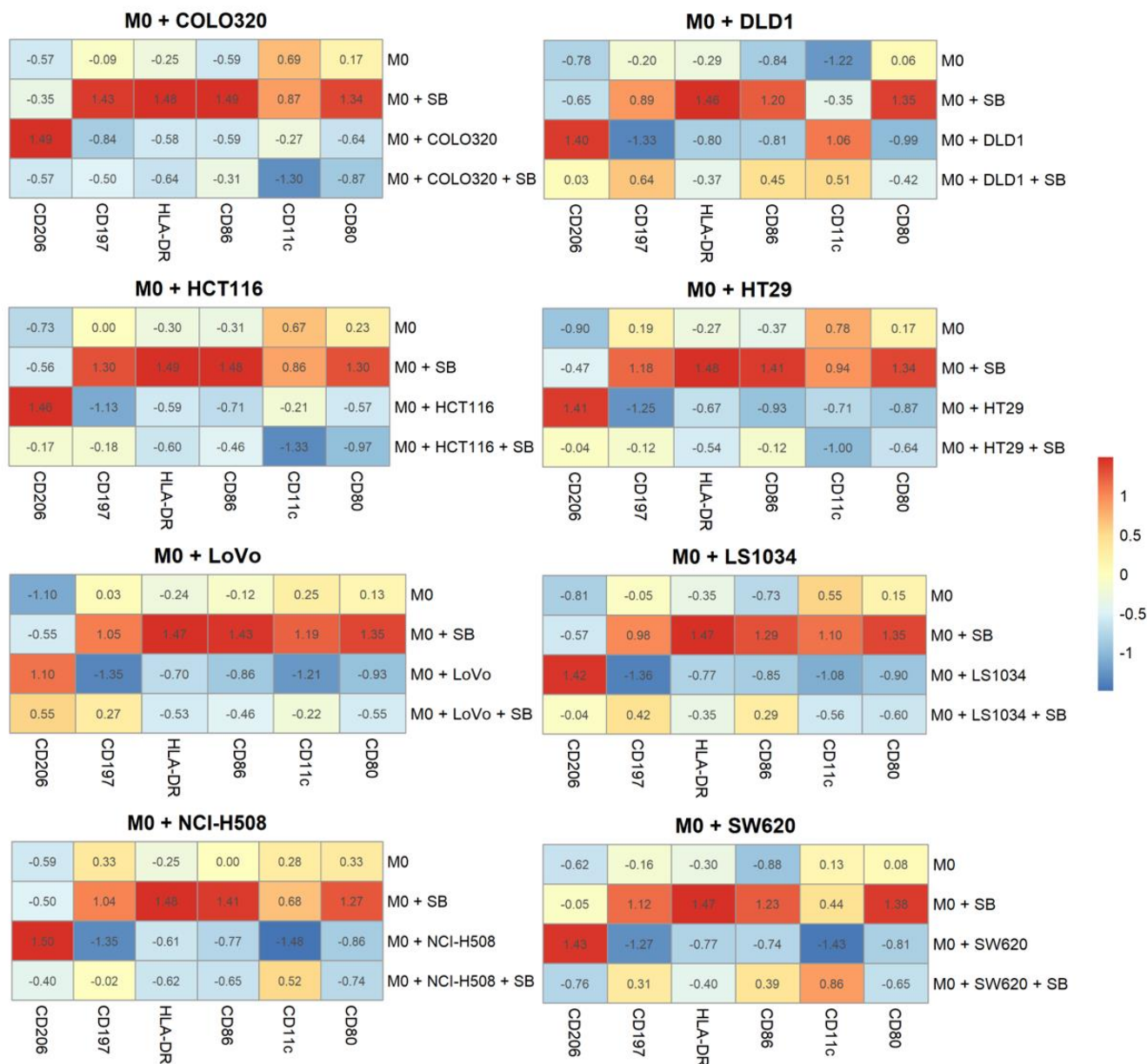
Pirmiausia buvo tiriamas SB-431542 ir salinomicino poveikis M0 tipo makrofagams juos 48 val. inkubuojant esant anksčiau minėtai šių junginių koncentracijai (15 pav.). Pastebėta, jog SB-431542, lyginant su M0, padidino visų su M1 tipu siejamų žymenų (CD197, HLA-DR, CD86, CD11c ir CD80) raišką – tai gali būti siejama su šios molekulės, kaip TGF- β receptoriaus kinazės inhibitoriaus, savybėmis, nes TGF- β signalo perdavimo kelias yra aktyvus M2 makrofagų poliarizacijoje.



15 pav. Karštųjų taškų žemėlapis, rodantis skirtingą SB-431542 ir salinomicino poveikį kontroliniams M0 makrofagams. Eilutės atspindi skirtingus mėginius, stulpeliai – tirtų ląstelių paviršiaus žymenys. Langeliuose nurodyta z-reikšmė lyginant konkretaus žymens FIM tarp skirtingų mėginių, dešinėje pateikiama spalvų legenda, nurodanti kokia spalva atitinka konkrečią z-reikšmę. Naudojamos santrumpos: M0_SB – SB-431542, M0_SAL – salinomicinu paveikti makrofagai, M0_K – kontrolinis mėginys.

Po inkubacijos su salinomicinu buvo pastebėta M0 atžvilgiu padidėjusi M2 žymens CD206 raiška, taip pat sumažėjusi M1 žymenų – CD11c ir CD80 – raiška.

Po netiesioginio kokultivavimo su vėžinėmis ląstelėmis terpėje esant SB-431542 surinkus makrofagus ir ištryrus jų paviršiaus žymenų raišką tėkmės citometru buvo tikrinama, koks bus šio junginio poveikis makrofagams, lyginant su kontroliniais mėginiais, kur SB-431542 sukėlė M1 makrofagų žymenų raiškos padidėjimą (16 pav.). Lyginant pavienį SB-431542 ir kokultivavimo su SŽV ląstelėmis poveikį M0 makrofagams, daugumoje atvejų stebimi priešingi žymenų raiškos pokyčiai. Nors poveikis SB-431542 indukuoja M1 būdingų žymenų raišką, visuose su ląstelių linijomis kokultivuotuose makrofagų mėginiuose stebima žemesnė daugumos tirtų M1 žymenų raiška. Be to, kokultivavimas su ląstelių linijomis padidino M2 būdingo žymens CD206 raišką stipriau nei poveikis SB-431542, tačiau kokultivuojant makrofagus su SŽV ląstelėmis ir kartu terpėje esant TGF- β signalo kelio slopikliui, paviršiaus žymenų raiškos pokyčių skalė daug mažesnė.

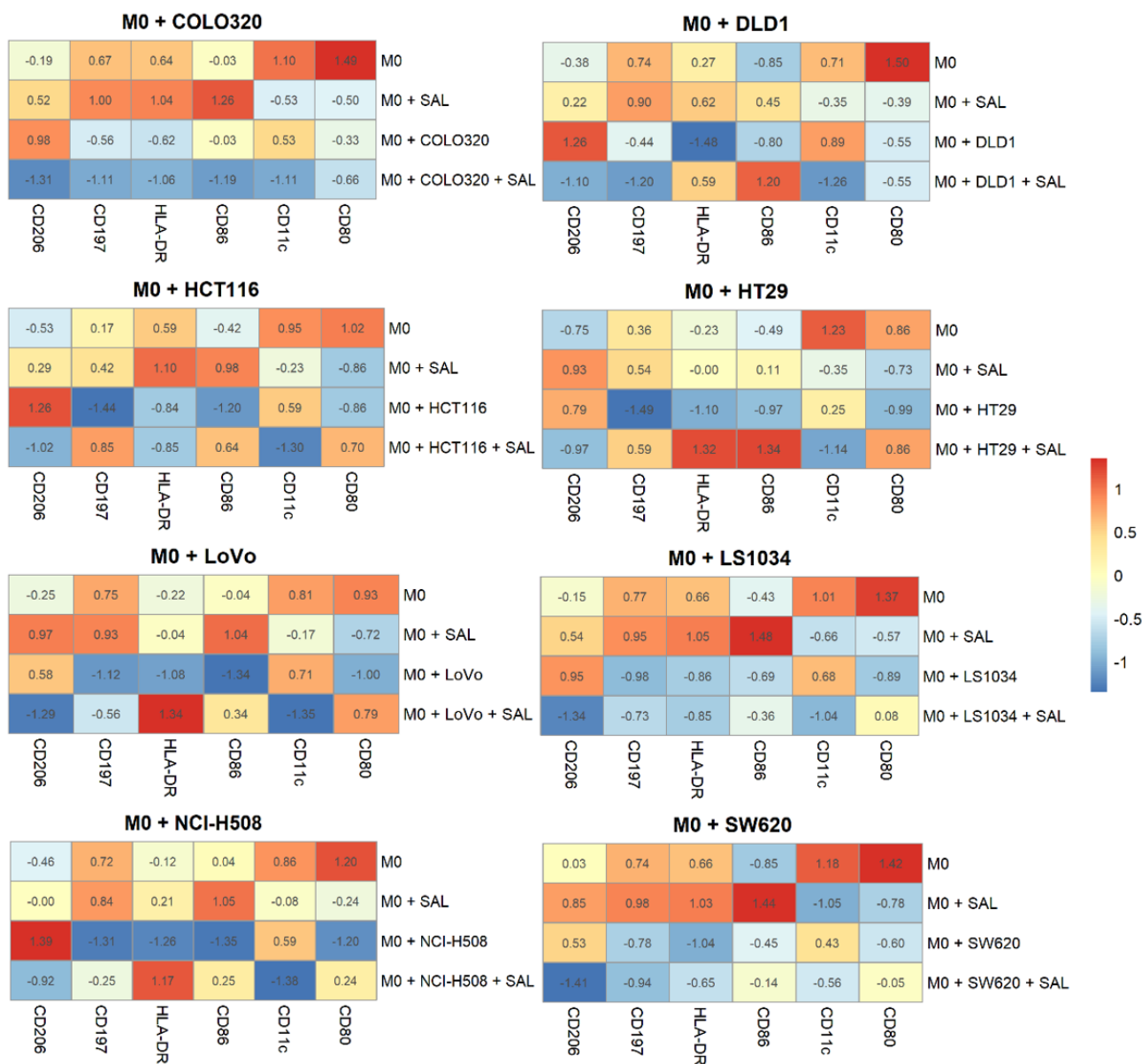


16 pav. SB-431542 poveikis tiriamomis SŽV ląstelėmis paveiktuose makrofaguose. Eilutės atspindi skirtingus mėginius, stulpeliai – tirtus ląstelių paviršiaus žymenis. Langeluose nurodyta z-reikšmė lyginant konkretaus žymens FIM tarp skirtingų mėginių, dešinėje pateikiama spalvų legenda, nurodanti kokia spalva atitinka konkrečią z-reikšmę. Kiekvienoje lentelėje palyginami kontroliniai makrofagų mėginiai be ir su SB-431542 bei kokultivuoti su nurodytomis ląstelių linijomis be ir su SB-431542 mėginiai.

Vienintelio tirtu M2 makrofagų žymens CD206 raiška po poveikio SB-431542 žymiai sumažėjo visuose su SŽV kokultivuotų makrofagų mėginiuose, lyginant juos su kokultivuotais be šio slopiklio. CD197 raiška, lyginant ląstelių linijomis paveiktus, be ir su terpėje esančiu SB-431542, makrofagus, visuose mėginiuose, išskyrus augintus su COLO320, buvo ryškiai padidėjusi. HLA-DR raiška, lyginant kokultivuotus mėginius, nežymiai padidėjo kokultivuojant terpėje su slopikliu ir keliomis ląstelių linijomis (DLD1, LS1034, SW620), kituose mėginiuose išliko nepakitusi. Visuose su SŽV kokultivuotuose makrofagų mėginiuose (išskyrus kokultivuotus su NCI-H508) padidėjo CD86

žymens raiška. CD11c raiška, kuri kontroliniuose mėginiuose buvo didesnė makrofaguose, veiktuose su SB-431542, dalyje makrofagų mėginių sumažėjo (kokultivuojant su COLO320, DLD1, HCT116 ir HT29), kitoje pusėje (LS1034, LoVo, NCI-H508, SW620) padidėjo. Lyginant kokultivuotus su skirtingomis SŽV linijomis makrofagus terpėje esant ir nesant slopiklio, CD80 žymens raiškoje žymių pokyčių nebuvo. Apibendrinant, kokultivacijos su SŽV metu terpėje esant SB-431542 padidėjo daugelio M1 žymenų raiška, tačiau šių pokyčių skalė buvo mažesnė – taip pat makrofagai terpėje esant slopiklio, lyginant su kokultivuotais be jo, po kokultivacijos pasižymėjo mažesne CD206 žymens raiška – atsižvelgiant į tai, jog kontroliniuose mėginiuose SB-431542 šio žymens raišką padidino, galima daryti prielaidą, jog terpėje esant TGF- β signalo kelio slopikliui sumažėjo bendras SŽV ląstelių makrofagų poliarizavimo potencialas.

Ištyrus po netiesioginio kokultivavimo su vėžinėmis ląstelėmis terpėje esant salinomicino surinktų makrofagų paviršiaus žymenis, buvo tikrinama, koks bus šio junginio poveikis lyginant su kontroliniais mėginiais, kur salinomicinas indukavo CD206, bei kelių M1 žymenų (CD197, HLA-DR, CD86) raiškos padidėjimą. Lyginant pavienį salinomicino poveikį ir šio junginio poveikį kokultivuojant abiejų tipų ląsteles stebimi jo skirtumai (17 pav.): kokultivuojant makrofagus su visomis SŽV linijomis be salinomicino stebimas svarbaus M2 žymens CD206 raiškos padidėjimas, tačiau terpėje esant šio slopiklio ląstelės praranda potencialą poliarizuotą į M2 tipą, taip pat keliuose makrofagų kokultivavimo su terpėje esančiu salinomicinu mėginiuose stebima repoliarizacija į M1 tipą. COLO320 ląstelių linija terpėje esant salinomicino galimai prarado bet kokią poliarizavimo potencialą. CD197 žymens raiška terpėje esant salinomicino sumažėjo kokultivuojant su COLO320, DLD1 ir SW620, padidėjo kokultivuojant su likusiomis ląstelių linijomis. HLA-DR raiška, lyginant kokultivuotus makrofagus be ir su slopikliu, sumažėjo mėginyje su COLO320, nepakito su HCT116, LS1034, padidėjo su DLD1, SW620, HT29, LoVo, NCI-H508 ląstelių linijomis. Kokultivuojant su visomis ląstelių linijomis, išskyrus COLO320, terpėje esant salinomicino padidėjo CD86 žymens raiška. CD11c raiškos pokyčiai kokultivuojant buvo tokie patys kaip ir kontroliniuose mėginiuose – šio žymens raiška terpėje esant salinomicino buvo mažesnė nei ten kur jo nebuvo. CD80 žymens raiška terpėje su salinomicinu sumažėjo su COLO320, nepakito su DLD1 ir padidėjo su likusiomis linijomis kokultivuotuose makrofaguose.



17 paveikslėlis. Salinomicino poveikis tiriamoms SŽV ląstelėms paveiktuose makrofaguose. Eilutės atspindi skirtingus mėginius, stulpeliai – tirtus ląstelių paviršiaus žymenis. Langeliuose nurodyta z-reikšmė lyginant konkretaus žymens FIM tarp skirtingų mėginių, dešinėje pateikiama spalvų legenda, nurodanti kokia spalva atitinka konkrečią z-reikšmę. Kiekvienoje lentelėje palyginami kontroliniai makrofagų mėginiai be ir su salinomicinu bei kokultivuoti su nurodytomis ląstelių linijomis be ir su salinomicinu mėginiai.

CD206 raiškos pokyčiuose matomos tokios pačios tendencijos kaip ir veikiant ląsteles SB-431542 – kokultivuojant terpėje esant salinomicino šio žymens raiška visuose tirtuose makrofaguose buvo mažesnė nei kontroliniuose kokultūros mėginiuose – tai parodo šių junginių gebėjimą kokultivuojant SŽV ląstelių linijas su makrofagais sumažinti šio M2 žymens raišką.

REZULTATŲ APTARIMAS

Šio tyrimo metu buvo tiriamos makrofagų ir SŽV tarpusavio sąveikos netiesioginio kokultivavimo *in vitro* metu, atkreipiant dėmesį į vėžinių ląstelių kamieniškumo ir gebėjimo poliarizuoti makrofagus sąsajas. Skirtumai tarp SŽV ląstelių linijų jas charakterizavus naudojant CD44, CD117, CD133 ir ESA paviršiaus žymenis buvo pastebėti CD44 ir CD133 žymenų raiškoje – išsiskyrė HT29, HCT116 ir LoVo linijos, pasižyminčios didesne abu žymenis turinčių ląstelių populiacijos dalimi lyginant su kitomis linijomis. Bandant rasti reikšmingų skirtumų tarp tiriamų ląstelių linijų, atsižvelgiant į jų kamieniškumo savybes, išanalizavus Vėžinių ląstelių enciklopedijos duomenų bazėje esančių su kamieniškumu ir EMT susijusių genų raiškos duomenis rasta, jog pagal Sadanadam et al. kamieniškoms priskiriamų linijų - COLO320, HCT116 ir SW620 – grupei buvo būdinga aukštesnė mezenhiminių bei žemesnė epitelinių žymenų raiška, lyginant su likusiomis linijomis.

Kadangi iki šiol atlikti SŽV ląstelių linijų imunomoduliacinių savybių tyrimai neatsižvelgė į vėžio molekulinis subtipus (Lian et al., 2019), šio tyrimo metu, pastebėjus *in vitro* ir *in silico* skirtumus tarp tiriamųjų SŽV linijų, buvo nuspręsta toliau tirti, ar kamieniškumo/EMT savybių išreikštumas gali turėti įtakos makrofagų poliarizacijai. SŽV ląstelių ir makrofagų tarpusavio sąveikoms sukurti buvo pasirinkti du metodai: makrofagų veikimas vėžinių ląstelių augimo terpe bei netiesioginė abiejų ląstelių tipų kokultivacija. Augimo terpe paveikti makrofagai nedemonstravo tokių ryškių pokyčių kaip poliarizuoti pagal klasikinius protokolus, tačiau tam tikrų linijų sekretomu paveikti makrofagai skyrėsi nuo M0 makrofagų kai kurių žymenų raiška. Pavyzdžiui, HT29 linija paveikti makrofagai skyrėsi žymiai aukštesne CD206 (M2 žymuo) raiška; HCT116 linijos poveikis padidino CD195 (M1 žymuo) raišką. Gauti rezultatai sutampa su literatūroje randamais SŽV ląstelių linijų augimo terpės sukeliama pokyčiais makrofagų paviršiaus žymenų raiškoje, kai stebima poliarizacija į mišrią M1/M2 populiaciją (Sawa-Wejksza et al., 2018). Po netiesioginės kokultivacijos atlikus makrofagų M1/M2 žymenų transkripcijos pokyčių analizę kiekybinės PGR metodu pastebėta didesnė raiškos pokyčių skalė nei paveikus makrofagus augimo terpe. Pagal poveikį makrofagams ląstelės buvo galima suskirstyti pagal jų poliarizacijos potencialą – didžiausius pokyčius sukėlė kokultivavimas su pagal Guinney et al. priskiriamoms kamieniškam CMS4 subtipui HCT116 ir SW620 ląstelių linijomis. Nepaisant pastebėjimo, jog su HCT116 kokultivuotuose makrofaguose daugiau padidėjo M2, o su SW620 – M1 makrofagų žymenys, abiejų linijų poveikis indukavo poliarizaciją tiek į M1, tiek į M2 tipą, todėl pagal šiuos rezultatus galima preliminariai vertinti tik jų poliarizacijos potencialą, bet ne poliarizacijos kryptingumą. Vis dėlto, svarbu pabrėžti, jog šie SŽV

ląstelių linijų tyrimo rezultatai patvirtina kitose vėžio lokalizacijose pademonstruotą reiškinį, kai stipriau išreikštos kamieniškumo/EMT savybės siejamos su didesniu gebėjimu indukuoti makrofagų poliarizaciją (Hsieh et al., 2018; Raghavan et al., 2019). Be to, šis *in vitro* tyrimas pasižymėjo realesniu naviko mikroaplinkos sąlygų atspindėjimu, kadangi buvo tiriami *ex vivo* iš sveikų donorų periferinio kraujo išdiferencijuoti makrofagai, skirtingai negu kituose SŽV imunomoduliacinių savybių tyrimuose, kur makrofagų gavimui buvo naudojama riboto diferenciacijos potencialo modelinė ūminės monocitinės leukemijos linija THP-1 (Lian et al., 2019; Sawa-Wejksza et al., 2018). Kokultivacijos metu taip pat buvo pastebėti su kamieniškumu siejamų žymenų (CD44, CD133) raiškos pokyčiai ant SŽV ląstelių linijų paviršiaus. Nepaisant to, kad ši tendencija sutampa su anksčiau publikuotais duomenimis apie vienpusę makrofagų sekretomo įtaką SŽV ląstelių kamieniškumo/EMT savybių indukavimui (F. Fan et al., 2018), šiame tyrime naudota netiesioginės kokultivacijos sistema gali būti sėkmingai naudojama toliau tiriant abipuses vėžinių ląstelių ir makrofagų sąveikas. Bandant paaiškinti stebėtą HCT116 ir SW620 makrofagų poliarizacijos potencialą buvo ištirti šioms linijoms būdingų citokinų profiliai, kurie atskleidė, jog už galimą SW620 linijos polinkį poliarizuoti makrofagus į M1 tipą gali būti atsakinga šiai linijai būdinga aukšta TNF- α ir SDF-1 α koncentracija. HCT116 potencialą M2 makrofagų poliarizacijai gali paaiškinti aukštesnė nei likusių tirtų linijų Axl, BMP4, adiponektino ir ypač klasikinio M2 poliarizacijos citokino IL-4 koncentracija.

Norint patvirtinti kamieniškumo ir makrofagų poliarizacijos potencialo ryšį, buvo bandoma nuslopinus SŽV linijų kamieniškumo savybes įvertinti poliarizacijos potencialo pasikeitimus. Iš dviejų naudotų slopiklių – SB-431542 ir salinomicino – pastarasis pasižymėjo stipresniu bei platesnio spektro kamieniškumo slopinimo potencialu. Tai galima paaiškinti tuo, jog SB-431542 specifiskai blokuoja tik vieną – TGF- β signalo perdavimo kelią, tuo tarpu salinomicino veikimo mechanizmas slopinant kamieniškumą dar nėra iki galo išaiškintas. Kokultivacijos tyrimuose augimo terpėje esant ir nesant kamieniškumo slopiklių buvo pastebėti skirtumai M2 būdingo žymens CD206 raiškoje: netiesiogiai kokultyvuojant makrofagus su SŽV ląstelėmis CD206 raiška didėja, tačiau terpėje esant slopiklių matomas CD206 raiškos sumažėjimas, dažnu atveju pasiekiantis pradinį lygį, stebimą neveiktuose M0 makrofaguose. Šie rezultatai galimai parodo kamieniškumą slopinančių junginių gebėjimą sumažinti SŽV ląstelių linijų makrofagų poliarizavimo į M2 tipą potencialą bei taip pat neleidžia paneigti ryšio tarp SŽV ląstelių kamieniškumo bei makrofagų poliarizacijos potencialo. Be to, daugėjant tyrimų, kuriuose kamieniškumo slopikliai naudojami tiriant makrofagų įtaką vėžinių ląstelių kamieniškumui (Y. Chen et al., 2018; Liu et al., 2018; F. Zhang et al., 2016), tikslinga

nuodugniau tirti šių junginių imunomoduliacines savybes bei potencialų taikymą taikiniame vėžio gydyme.

Tolimesniuose tyrimuose būtų galima ištirti daugiau ląstelių linijų, viduląstelių abiejų tipų ląstelių žymenų, kitų vėžinių ląstelių kamieniškumo slopiklių, kurie galėtų patvirtinti šio tyrimo metu pastebėtas tendencijas. Taip pat būtų galima plačiau panagrinėti kamieniškam CMS4 subtipui priskiriamas ląstelių linijas (HCT116 ir SW620) bei jų sąveikas su makrofagais, bandant įvertinti citokinų analizėje pastebėtų HCT116 būdingo IL-4 ir SW620 – TNF- α poveikį poliarizacijai, išveiklinant vėžinėse ląstelėse už šių citokinų produkciją atsakingus genus.

IŠVADOS

1. Tirtos storosios žarnos vėžio ląstelių linijos tarpusavyje skyrėsi populiacijos, pasižyminčios su kamieniškumu siejamų žymenų CD44 ir CD133 raiška, dalimi. Be to, kamieniškumo savybėmis pasižyminčios linijos – COLO320, HCT116 ir SW620 – nuo likusių reikšmingai skyrėsi kamieniškumo/EMT procesuose dalyvaujančių genų raiškos profiliu.
2. Skirtingo kamieniškumo ląstelių linijos pasižymėjo skirtingu makrofagų poliarizacijos potencialu. Netiesioginės kokultivacijos modelinėje sistemoje kamieniškam molekulinam subtipui priskiriamos storosios žarnos vėžio ląstelių linijos pasižymėjo didžiausiu gebėjimu skatinti makrofaguose M1/M2 tipams būdingų žymenų raišką – HCT116 linija, kuriai būdinga aukšta IL-4 raiška, pasižymėjo polinkiu poliarizuoti makrofagus į M2 tipą, o SW620 linija, kuriai būdinga aukšta TNF- α raiška – į M1 tipą.
3. Vėžinių ląstelių kamieniškumą slopinantys junginiai – salinomicinas ir SB-431542 – sumažino su kamieniškumu siejamų paviršiaus žymenų CD44 ir CD133 raišką tiriamose ląstelių linijose bei netiesioginės kokultivacijos metu sumažino storosios žarnos vėžio ląstelių linijų gebėjimą skatinti M2 makrofagų žymens CD206 raišką.

SANTRAUKA

Marius Baltramonaitis

Storosios žarnos vėžio ląstelių linijų imunomoduliuojančių savybių tyrimas

Storosios žarnos vėžio (SŽV) ligos prognozei ir gydymui didelės reikšmės turi aukštas SŽV heterogeniškumas. Vienai iš SŽV klasifikacijos sistemos grupių priskiriami išreikštomis kamieniškumo savybėmis pasižymintys navikai, kuriems būdingas atsparumas chemoterapijai, savęs atsinaujinimas, epitelinė-mezenchiminė transformacija. SŽV mikroaplinkoje vienas pagrindinių infiltruojančių imuninių ląstelių tipų yra makrofagai, kurių poveikis naviko vystymesi priklauso nuo jų poliarizacijos: klasikiniai skatinantys uždegimą M1 makrofagai slopina, o alternatyviai aktyvuoti, natūraliai audinių reparacijoje bei imuninio atsako slopinime dalyvaujantys M2 makrofagai – skatina naviko augimą. Pademonstruota, jog makrofagų poliarizacijai į M2 tipą turi įtakos skirtingų tipų (krūties, kiaušidžių, glioblastomos) vėžių kamieninės ląstelės bei jų išskiriamos molekulės, tačiau nėra daug informacijos apie storosios žarnos vėžio ir makrofagų tarpusavio sąveikas naviko mikroaplinkoje.

Šio tyrimo metu buvo tiriamas ryšys tarp SŽV ląstelių kamieniškumo ir jų gebėjimo indukuoti makrofagų poliarizaciją *in vitro*. Nustatyti kamieniškumo/EMT procesuose dalyvaujančių genų bei CD44 ir CD133 raiškos skirtumai tarp tirtų SŽV ląstelių linijų. Taip pat parodyta, jog netiesioginės kokultivacijos modelyje kamieniškam molekuliniam subtipui priskiriamos ląstelių linijos pasižymėjo didžiausiu gebėjimu skatinti makrofaguose M1/M2 būdingų žymenų raišką – HCT116 linija, kuriai būdinga aukšta IL-4 raiška, pasižymėjo polinkiu poliarizuoti makrofagus į M2 tipą, o SW620 linija, kuriai būdinga aukšta TNF- α raiška – į M1 tipą. Paveikus linijas vėžinių ląstelių kamieniškumo slopikliais – salinomicinu ir SB-431542 – stebimas sumažėjęs SŽV linijų gebėjimas skatinti M2 makrofagų žymens CD206 raišką.

SUMMARY

Marius Baltramonaitis

Immunomodulating Properties of Colorectal Cancer Cell Lines

High colorectal cancer (CRC) heterogeneity has serious effect on disease prognosis and treatment. One of the groups of CRC classification system contains tumors that can be characterized by cancer stem cell properties such as chemoresistance, self-renewal and epithelial-mesenchymal transition. One of the main populations of infiltrating immune cells in CRC microenvironment are macrophages. Macrophages can have different roles in tumor progression, depending on their polarization. Classically activated inflammatory M1 type macrophages inhibit tumor growth, contrary to alternatively activated M2 macrophages, which play an important role in tissue regeneration and immunosuppression, supporting tumor progression. It was shown that different types of cancer (breast, ovarian and glioblastoma) stem cells and their secreted molecules induce macrophage polarization towards M2 type. However, the data on the interactions between CRC cells and macrophages in tumor microenvironment is still incomplete.

In this research we studied the link between the stemness of CRC cells and their ability to induce macrophage polarization *in vitro*. We established the differences in the expression of genes and surface markers associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition between studied cell lines. Furthermore, using indirect coculture system, we showed that CRC cell lines, belonging to stem-like molecular subtype, were able to induce macrophage polarization the most. In particular, HCT116 cell line, characterized by the high expression of IL-4, demonstrated the trend to polarize macrophages into M2 type, while SW620, characterized by high expression of TNF- α , was more likely to induce M1 type macrophage polarization. In the presence of stemness inhibitors, salinomycin and SB-431542, CRC cell lines showed decreased ability to induce M2 surface marker CD206.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Berg, K. C. G., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Johannessen, B., Bruun, J., Danielsen, S. A., Bjørnslett, M., Meza-Zepeda, L. A., Eknæs, M., Lind, G. E., Myklebost, O., Skotheim, R. I., Sveen, A., & Lothe, R. A. (2017). Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Molecular Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0691-y>
- Blank, A., Roberts, D. E., Dawson, H., Zlobec, I., & Lugli, A. (2018). Tumor heterogeneity in primary colorectal cancer and corresponding metastases. Does the apple fall far from the tree? *Frontiers in Medicine*, 5(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00234>
- Bogaert, J., & Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. In *Annals of Gastroenterology* (Vol. 27, Issue 1, pp. 9–14). The Hellenic Society of Gastroenterology. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>
- Böttcher, J. P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrerizo, M., Sammiceli, S., Rogers, N. C., Sahai, E., Zelenay, S., & Reis e Sousa, C. (2018). NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*, 172(5), 1022–1037.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.004>
- Brenot, A., Knolhoff, B. L., Denardo, D. G., & Longmore, G. D. (2018). SNAIL1 action in tumor cells influences macrophage polarization and metastasis in breast cancer through altered GM-CSF secretion. *Oncogenesis*, 7(3). <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0042-x>
- Budinska, E., Popovici, V., Tejpar, S., D'Ario, G., Lapique, N., Sikora, K. O., Di Narzo, A. F., Yan, P., Graeme Hodgson, J., Weinrich, S., Bosman, F., Roth, A., & Delorenzi, M. (2013). Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *Journal of Pathology*, 231(1), 63–76. <https://doi.org/10.1002/path.4212>
- Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C., & Marini, F. C. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. In *Breast Cancer Research* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0740-2>
- Cerwenka, A., & Lanier, L. L. (2016). Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 112–123). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.9>
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chen, W., & Ten Dijke, P. (2016). Immunoregulation by members of the TGFβ superfamily. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 12, pp. 723–740). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.112>
- Chen, Y., Tan, W., & Wang, C. (2018). Tumor-associated macrophage-derived cytokines enhance cancer stem-like characteristics through epithelial–mesenchymal transition. In *OncoTargets and Therapy* (Vol. 11, pp. 3817–3826). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OTT.S168317>
- Cheng, H., Wang, Z., Fu, L., & Xu, T. (2019). Macrophage polarization in the development and

- progression of ovarian cancers: An overview. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00421>
- Chisanga, D., Keerthikumar, S., Pathan, M., Ariyaratne, D., Kalra, H., Boukouris, S., Mathew, N. A., Al Saffar, H., Gangoda, L., Ang, C.-S., Sieber, O. M., Mariadason, J. M., Dasgupta, R., Chilamkurti, N., & Mathivanan, S. (2015). Colorectal cancer atlas: An integrative resource for genomic and proteomic annotations from colorectal cancer cell lines and tissues. *Nucleic Acids Research*, 44, 969–974. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1097>
- Christensen, J., El-Gebali, S., Natoli, M., Sengstag, T., Delorenzi, M., Bentz, S., Bouzourene, H., Rumbo, M., Felsani, A., Siissalo, S., Hirvonen, J., Vila, M. R., Saletti, P., Aguet, M., & Anderle, P. (2012). *Defining new criteria for selection of cell-based intestinal models using publicly available databases*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/274>
- Colak, S., & ten Dijke, P. (2017). Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends in Cancer*, 3(1), 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.008>
- Colorectal cancer Source: Globocan 2018 Number of new cases in 2018, both sexes, all ages. (2018). <http://gco.iarc.fr/today>
- Cui, X., Shang, S., Lv, X., Zhao, J., Qi, Y., & Liu, Z. (2019). Perspectives of small molecule inhibitors of activin receptor-like kinase in anti-tumor treatment and stem cell differentiation (Review). In *Molecular medicine reports* (Vol. 19, Issue 6, pp. 5053–5062). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10209>
- Dai, X., Ge, J., Wang, X., Qian, X., & Li, X. (2013). OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion. *Oncology Reports*, 29(1), 155–160. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2086>
- De Silva, N. S., & Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 137–148. <https://doi.org/10.1038/nri3804>
- Elbadawy, M., Usui, T., Yamawaki, H., & Sasaki, K. (2019). *Molecular Sciences Emerging Roles of C-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer*. <https://doi.org/10.3390/ijms20092340>
- Fan, F., Wang, R., Boulbes, D. R., Zhang, H., Watowich, S. S., Xia, L., Ye, X., Bhattacharya, R., & Ellis, L. M. (2018). Macrophage conditioned medium promotes colorectal cancer stem cell phenotype via the hedgehog signaling pathway. *PLOS ONE*, 13(1), e0190070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190070>
- Fan, Q. M., Jing, Y. Y., Yu, G. F., Kou, X. R., Ye, F., Gao, L., Li, R., Zhao, Q. D., Yang, Y., Lu, Z. H., & Wei, L. X. (2014). Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 352(2), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.05.008>
- Gabrusiewicz, K., Li, X., Wei, J., Hashimoto, Y., Marisetty, A. L., Ott, M., Wang, F., Hawke, D., Yu, J., Healy, L. M., Hossain, A., Akers, J. C., Maiti, S. N., Yamashita, S., Shimizu, Y., Dunner, K., Zal, M. A., Burks, J. K., Gumin, J., ... Heimberger, A. B. (2018). Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. *OncoImmunology*, 7. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1412909>
- Galoczova, M., Coates, P., & Vojtesek, B. (n.d.). *STAT3, stem cells, cancer stem cells and p63*.

<https://doi.org/10.1186/s11658-018-0078-0>

- Gonzalez, H., Hagerling, C., & Werb, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. *Genes and Development*, 32(19–20), 1267–1284. <https://doi.org/10.1101/GAD.314617.118>
- Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews*, 262(1), 36–55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>
- Greten, F. R., & Grivnickov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 51(1), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., De Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa, E. Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., ... Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. In *Cell* (Vol. 100, Issue 1, pp. 57–70). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Herve, A., Kamdje, N., Takam Kanga, P., Simo, R. T., Vecchio, L., Faustin, P., Etet, S., Muller, J. M., Bassi, G., Lukong, E., Goel, R. K., Mbo Amvene, J., & Krampera, M. (2017). *Mesenchymal stromal cells' role in tumor microenvironment: involvement of signaling pathways*. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0033>
- Hida, K., Maishi, N., Annan, D. A., & Hida, Y. (2018). Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19051272>
- Hooper, S., Gaggioli, C., & Sahai, E. (2010). A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *British Journal of Cancer*, 102(2), 392–402. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605469>
- Hori, A., Nishide, K., Yasukuni, Y., Haga, K., Kakuta, W., Ishikawa, Y., Hayes, M. J., Ohnuma, S.-I., Kiyonari, H., Kimura, K., Kondo, T., & Sasai, N. (n.d.). *Prominin-1 Modulates Rho/ROCK-Mediated Membrane Morphology and Calcium-Dependent Intracellular Chloride Flux*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52040-9>
- Hsieh, C. H., Tai, S. K., & Yang, M. H. (2018). Snail-overexpressing Cancer Cells Promote M2-Like Polarization of Tumor-Associated Macrophages by Delivering MiR-21-Abundant Exosomes. *Neoplasia (United States)*, 20(8), 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.06.004>
- Jeter, C. R., Yang, T., Wang, J., Chao, H.-P., & Tang, D. G. (n.d.). *NANOG in cancer stem cells and tumor development: An update and outstanding questions*. <https://doi.org/10.1002/stem.2007>
- Jung, Y. S., & Park, J. Il. (2020). Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling

- beyond β -catenin and the destruction complex. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(2), 183–191. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0380-6>
- Kahlert, C., Lahes, S., Radhakrishnan, P., Dutta, S., Mogler, C., Herpel, E., Brand, K., Steinert, G., Schneider, M., Mollenhauer, M., Reissfelder, C., Klupp, F., Fritzmann, J., Wunder, C., Benner, A., Kloor, M., Huth, C., Contin, P., Ulrich, A., ... Weitz, J. (2011). Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in Vitro. *Clinical Cancer Research*, 17(24), 7654–7663. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2816>
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 159–175). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. In *Cell Stem Cell* (Vol. 14, Issue 3, pp. 275–291). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>
- Kreso, A., O'Brien, C. A., Van Galen, P., Gan, O. I., Notta, F., Brown, A. M. K., Ng, K., Jing, M., Wienholds, E., Dunant, C., Pollett, A., Gallinger, S., McPherson, J., Mullighan, C. G., Shibata, D., & Dick, J. E. (2013). Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science*, 339(6119), 543–548. <https://doi.org/10.1126/science.1227670>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., Van De Velde, C. J. H., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–25. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., & Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 731–744). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3920>
- Lee, H. G., Shin, S. J., Chung, H. W., Kwon, S. H., Cha, S. Do, Lee, J. E., & Cho, C. H. (2017). Salinomycin reduces stemness and induces apoptosis on human ovarian cancer stem cell. *Journal of Gynecologic Oncology*, 28(2). <https://doi.org/10.3802/JGO.2017.28.E14>
- Levin, B., Lieberman, D. A., McFarland, B., Smith, R. A., Brooks, D., Andrews, K. S., Dash, C., Giardiello, F. M., Glick, S., Levin, T. R., Pickhardt, P., Rex, D. K., Thorson, A., & Winawer, S. J. (2008). Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(3), 130–160. <https://doi.org/10.3322/ca.2007.0018>
- Li, M., Bu, X., Cai, B., Liang, P., Li, K., Qu, X., & Shen, L. (2018). Biological role of metabolic reprogramming of cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (Review). *Oncology Reports*, 41(2), 727–741. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6882>
- Lian, G., Chen, S., Ouyang, M., Li, F., Chen, L., & Yang, J. (2019a). Colon Cancer Cell Secretes EGF to Promote M2 Polarization of TAM Through EGFR/PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 18, 1–9. <https://doi.org/10.1177/1533033819849068>
- Lian, G., Chen, S., Ouyang, M., Li, F., Chen, L., & Yang, J. (2019b). Colon Cancer Cell Secretes EGF to Promote M2 Polarization of TAM Through EGFR/PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 18. <https://doi.org/10.1177/1533033819849068>

- Liu, Z., Kuang, W., Zhou, Q., & Zhang, Y. (2018). TGF- β 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(6), 3395–3403. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3923>
- Lonardo, E., Hermann, P. C., Mueller, M. T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., Zagorac, S., Alcala, S., Rodriguez-Arabaolaza, I., Ramirez, J. C., Torres-Ruiz, R., Garcia, E., Hidalgo, M., Cebrián, D. Á., Heuchel, R., Löhr, M., Berger, F., Bartenstein, P., Aicher, A., & Heeschen, C. (2011). Nodal/activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell*, 9(5), 433–446. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.10.001>
- Lynch, H. T., & de la Chapelle, A. (2003). Hereditary Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(10), 919–932. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012242>
- Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M. P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.-C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., Kirzin, S., Chazal, M., Fléjou, J.-F., Benchimol, D., Berger, A., Lagarde, A., Pencreach, E., Piard, F., Elias, D., ... Boige, V. (2013). Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Medicine*, 10(5), e1001453. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001453>
- McGranahan, N., & Swanton, C. (2015). Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell*, 27(1), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.12.001>
- Medico, E., Russo, M., Picco, G., Cancelliere, C., Valtorta, E., Corti, G., Buscarino, M., Isella, C., Lamba, S., Martinoglio, B., Veronese, S., Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Beccuti, M., Mottolese, M., Linnebacher, M., Cordero, F., Di Nicolantonio, F., & Bardelli, A. (2015). The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets. *Nature Communications*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8002>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. In *Nature* (Vol. 454, Issue 7203, pp. 428–435). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Meng, M. Bin, Zaorsky, N. G., Deng, L., Wang, H. H., Chao, J., Zhao, L. J., Yuan, Z. Y., & Ping, W. (2015). Pericytes: A double-edged sword in cancer therapy. *Future Oncology*, 11(1), 169–179. <https://doi.org/10.2217/fon.14.123>
- Molinari, C., Marisi, G., Passardi, A., Matteucci, L., De Maio, G., & Ulivi, P. (2018). Heterogeneity in colorectal cancer: A challenge for personalized medicine? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123733>
- Moustakas, A., & Heldin, C.-H. (2016). Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Medicine*, 5(7), 63. <https://doi.org/10.3390/jcm5070063>
- Munro, M. J., Wickremesekera, S. K., Peng, L., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2018). Cancer stem cells in colorectal cancer: A review. *Journal of Clinical Pathology*, 71(2), 110–116. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204739>
- Nguyen, E. V., Pereira, B. A., Lawrence, M. G., Ma, X., Rebello, R. J., Chan, H., Niranjana, B., Wu, Y., Ellem, S., Guan, X., Wu, J., Skhinas, J. N., Cox, T. R., Risbridger, G. P., Taylor, R. A., Lister, N. L., & Daly, R. J. (2019). Proteomic profiling of human prostate cancer-associated fibroblasts (CAF) reveals LOXL2-dependent regulation of the tumor microenvironment. *Molecular and*

- Cellular Proteomics*, 18(7), 1410–1427. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001496>
- Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 1, pp. 49–61). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J., & Natoli, G. (2015). Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications. *Trends in Immunology*, 36(4), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.004>
- Phinney, D. G., & Sensebé, L. (2013). Mesenchymal stromal cells: Misconceptions and evolving concepts. In *Cytotherapy* (Vol. 15, Issue 2, pp. 140–145). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.11.005>
- Protein Array Analyzer for ImageJ - Gilles Carpentier Research Web Site: Computer Image Analysis.* (n.d.). Retrieved May 28, 2020, from http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Protein-Array-Analyzer-for-ImageJ.html&artpage=6-6#outil_sommaire_5
- Quatromoni, J. G., & Eruslanov, E. (2012). Tumor-associated macrophages: Function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. In *American Journal of Translational Research* (Vol. 4, Issue 4, pp. 376–389). e-Century Publishing Corporation.
- Raghavan, S., Mehta, P., Xie, Y., Lei, Y. L., & Mehta, G. (2019). Ovarian cancer stem cells and macrophages reciprocally interact through the WNT pathway to promote pro-tumoral and malignant phenotypes in 3D engineered microenvironments. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0666-1>
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature05384>
- Roepman, P., Schlicker, A., Tabernero, J., Majewski, I., Tian, S., Moreno, V., Snel, M. H., Chresta, C. M., Rosenberg, R., Nitsche, U., Macarulla, T., Capella, G., Salazar, R., Orphanides, G., Wessels, L. F. A., Bernards, R., & Simon, I. M. (2014). Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *International Journal of Cancer*, 134(3), 552–562. <https://doi.org/10.1002/ijc.28387>
- Ruffell, B., Affara, N. I., & Coussens, L. M. (2012). Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. In *Trends in Immunology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 119–126). Trends Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.12.001>
- Sadanandam, A., Lyssiotis, C. A., Homicsko, K., Collisson, E. A., Gibb, W. J., Wullschleger, S., Gonzalez Ostos, L. C., Lannon, W. A., Grotzinger, C., Rio, D., Lhermitte, B., Olshen, A. B., Wiedenmann, B., Cantley, L. C., Gray, J. W., & Hanahan, D. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*, 19(5), 619–625. <https://doi.org/10.1038/nm.3175>
- Sadanandam, A., Lyssiotis, C. A., Homicsko, K., Collisson, E. A., Gibb, W. J., Wullschleger, S., Ostos, L. C. G., Lannon, W. A., Grotzinger, C., Del Rio, M., Lhermitte, B., Olshen, A. B., Wiedenmann, B., Cantley, L. C., Gray, J. W., & Hanahan, D. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nature Medicine*, 19(5), 619–625. <https://doi.org/10.1038/nm.3175>
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D.,

- Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Puré, E., ... Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 20, Issue 3, pp. 174–186). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>
- Sawa-Wejksza, K., Dudek, A., Lemieszek, M., Kaławaj, K., & Kandefer-Szerszeń, M. (2018). Colon cancer–derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells. *Tumor Biology*, 40(9), 101042831879788. <https://doi.org/10.1177/1010428318797880>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Sottoriva, A., Kang, H., Ma, Z., Graham, T. A., Salomon, M. P., Zhao, J., Marjoram, P., Siegmund, K., Press, M. F., Shibata, D., & Curtis, C. (2015). A big bang model of human colorectal tumor growth. *Nature Genetics*, 47(3), 209–216. <https://doi.org/10.1038/ng.3214>
- Speiser, D. E., Ho, P. C., & Verdeil, G. (2016). Regulatory circuits of T cell function in cancer. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 10, pp. 599–611). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.80>
- Staudacher, J. J., Bauer, J., Jana, A., Tian, J., Carroll, T., Mancinelli, G., Özden, Ö., Krett, N., Guzman, G., Kerr, D., Grippo, P., & Jung, B. (2017). Activin signaling is an essential component of the TGF- β induced pro-metastatic phenotype in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05907-8>
- Stemmer, V., De Craene, B., Berx, G., & Behrens, J. (2008). Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with β -catenin. *Oncogene*, 27(37), 5075–5080. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.140>
- Storosios žarnos vėžio ankstyvosios diagnostikos programa - Nacionalinis vėžio institutas*. (n.d.). Retrieved May 29, 2020, from <https://www.nvi.lt/storosios-zarnos-vezio-prevencija/>
- Su, S., Liu, Q., Chen, J., Chen, J., Chen, F., He, C., Huang, D., Wu, W., Lin, L., Huang, W., Zhang, J., Cui, X., Zheng, F., Li, H., Yao, H., Su, F., & Song, E. (2014). A Positive Feedback Loop between Mesenchymal-like Cancer Cells and Macrophages Is Essential to Breast Cancer Metastasis. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.021>
- Takeda, K., Mizushima, T., Yokoyama, Y., Hirose, H., Wu, X., Qian, Y., Ikehata, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Haraguchi, N., Hata, T., Matsuda, C., Doki, Y., Mori, M., & Yamamoto, H. (2018). Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer. *SciEntific RepoRts* |, 8, 17639. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36251-0>
- Teng, M. W. L., Galon, J., Fridman, W. H., & Smyth, M. J. (2015). From mice to humans: Developments in cancer immunoediting. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 125, Issue 9, pp. 3338–3346). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI80004>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Todaro, M., Alea, M. P., Di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J. P., & Stassi, G. (2007). Colon Cancer Stem Cells Dictate

- Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell*, 1(4), 389–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.001>
- Tsai, J. H., & Yang, J. (2013). Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. In *Genes and Development* (Vol. 27, Issue 20, pp. 2192–2206). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.225334.113>
- Vasen, H. F. A., Tomlinson, I., & Castells, A. (2015). Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 12(2), 88–97. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.229>
- Vu, T., & Datta, P. K. (2017). Regulation of EMT in colorectal cancer: A culprit in metastasis. *Cancers*, 9(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers9120171>
- Wang, H., & Unternaehrer, J. J. (2019). Epithelial-mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: At the Crossroads of Differentiation and Dedifferentiation. *Developmental Dynamics*, 248(1), 10–20. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24678>
- Wang, J., Li, D., Cang, H., & Guo, B. (2019). Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Medicine*, 8(10), 4709–4721. <https://doi.org/10.1002/cam4.2327>
- WHO. (2018). *Cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W., & Hannun, Y. A. (2016). Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 529(7584), 43–47. <https://doi.org/10.1038/nature16166>
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>
- Xia, W., Lo, C. M., Poon, R. Y. C., Cheung, T. T., Chan, A. C. Y., Chen, L., Yang, S., Tsao, G. S. W., & Wang, X. Q. (2017). Smad inhibitor induces CSC differentiation for effective chemosensitization in cyclin D1- and TGF- β /Smad-regulated liver cancer stem cell-like cells. *Oncotarget*, 8(24), 38811–38824. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16402>
- Xie, F., Ling, L., Van Dam, H., Zhou, F., & Zhang, L. (2018). TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 50(1), 121–132. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx123>
- Xiong, Y. (2015). Hematopoietic stem cell-derived adipocytes and fibroblasts in the tumor microenvironment. *World Journal of Stem Cells*, 7(2), 253. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i2.253>
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., & Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117(7), 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>
- Yun, J.-A., Kim, S.-H., Hong, H. K., Yun, S. H., Kim, H. C., Chun, H.-K., Cho, Y. B., & Lee, W. Y. (2014). Loss of E-Cadherin Expression Is Associated with a Poor Prognosis in Stage III Colorectal Cancer. *Oncology*, 86(5–6), 318–328. <https://doi.org/10.1159/000360794>
- Zhang, C., Tian, Y., Song, F., Fu, C., Han, B., & Wang, Y. (2015). Salinomycin inhibits the growth of colorectal carcinoma by targeting tumor stem cells. *Oncology Reports*, 34(5), 2469–2476. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4253>

- Zhang, F., Wang, H., Wang, X., Jiang, G., Liu, H., Zhang, G., Wang, H., Fang, R., Bu, X., Cai, S., & Du, J. (2016). TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*, 7(32), 52294–52306. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10561>
- Zhou, J., Liu, S., Wang, Y., Dai, W., Zou, H., Wang, S., Zhang, J., & Pan, J. (2019). Salinomycin effectively eliminates cancer stem-like cells and obviates hepatic metastasis in uveal melanoma. *Molecular Cancer*, 18(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1068-1>
- Zhou, Y., Xia, L., Wang, H., Oyang, L., Su, M., Liu, Q., Lin, J., Tan, S., Tian, Y., Liao, Q., & Cao, D. (2018). Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(70), 33403–33415. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607>

PRIEDAI

I priedas

1 lentelė. Iš Vėžinių ląstelių linijų enciklopedijos duomenų bazės atrinkti su kamieniškumu/EMT susiję genai.

Genai			
<i>WNT1</i>	<i>WNT9B</i>	<i>SOX2</i>	<i>CDH1</i>
<i>WNT2</i>	<i>WNT10A</i>	<i>FN1</i>	<i>MYC</i>
<i>WNT2B</i>	<i>WNT10B</i>	<i>POU5F1</i>	<i>KLF4</i>
<i>WNT3</i>	<i>WNT11</i>	<i>NANOG</i>	<i>SALL4</i>
<i>WNT3A</i>	<i>WNT16</i>	<i>ABCB1</i>	<i>STAT3</i>
<i>WNT4</i>	<i>APC</i>	<i>ABCC1</i>	<i>ALDH1A1</i>
<i>WNT5A</i>	<i>GSK3B</i>	<i>ABCG2</i>	<i>LGR5</i>
<i>WNT5B</i>	<i>LRP5</i>	<i>SNAI1</i>	<i>EPCAM</i>
<i>WNT6</i>	<i>LRP6</i>	<i>SNAI2</i>	<i>TGFB1</i>
<i>WNT7A</i>	<i>PROM1</i>	<i>TWIST1</i>	<i>TGFBR1</i>
<i>WNT7B</i>	<i>CD44</i>	<i>TWIST2</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>WNT8A</i>	<i>KIT</i>	<i>ZEB1</i>	<i>SMAD2</i>
<i>WNT8B</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>ZEB2</i>	<i>SMAD3</i>
<i>WNT9A</i>	<i>CDH2</i>	<i>VIM</i>	