

Mikroprostředí nádoru – možnosti výzkumu v podmínkách *in vitro*

Tumor Microenvironment – Possibilities of the Research Under *In Vitro* Conditions

Chlapek P.¹, Chovanová S.^{1,2}, Sláviková V.¹, Veselská R.^{1,3}

¹ Laboratoř nádorové biologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

² Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

³ Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

Souhrn

Tumorigeneze je vždy doprovázena změnami v mikroprostředí příslušné tkáně. Nádorové mikroprostředí představuje heterogenní komplex, který širokou škálou vnějších podnětů kontroluje buněčnou proliferaci, diferenciaci, nekrózu nebo apoptózu a může vést k vývoji agresivního fenotypu buněk nádoru. Vliv nádorového mikroprostředí je také často spojován s rezistencí k běžně používaným léčebným postupům. Specifika nádorového prostředí jsou těsně spojena se strukturálními i funkčními abnormalitami cévní sítě v nádoru, stejně jako se změnami v buněčném metabolismu. Pro nádorové tkáně je typické zejména zvýšení podílu glykolýzy, zvýšený příjem glukózy, produkce laktátu a CO₂, rovněž jako přítomnost hypoxických oblastí a oblastí se sníženým pH. V současné době existuje množství metod vhodných pro *in vitro* simulaci a výzkum některých z těchto podmínek a množství nových metod se nadále vyvíjí. Bližší poznání specifík nádorového mikroprostředí tak bude stále více ovlivňovat vývoj nových léčebných prostředků pro nádorová onemocnění u člověka.

Klíčová slova

mikroprostředí nádoru – hypoxie – acidické pH – glukózová deprivace – podmínky *in vitro*

Summary

Tumorigenesis is always accompanied by alterations of the microenvironment in the respective tissue. The tumor microenvironment represents a heterogeneous complex, in which cell proliferation, differentiation, necrosis or apoptosis are regulated by various extracellular stimuli, and it can also lead to development of an aggressive phenotype of tumor cells. Influence of tumor microenvironment is also often connected with resistance to frequently used therapeutic procedures. Specifics of the tumor microenvironment are closely associated with the structural and functional abnormalities of tumor microvessels and altered cellular metabolism. Moreover, changes such as increase in glycolysis, elevated glucose uptake, production of lactate and CO₂, and presence of hypoxic regions and regions with acidic pH are typical features of tumor tissues. At present, there is a lot of methods for *in vitro* simulation and investigation of some of these specific conditions, and a number of new methods are being developed. A detailed understanding of the specifics of the tumor microenvironment should increasingly improve the development of new treatment possibilities of human cancers.

Key words

tumor microenvironment – hypoxia – acidic pH – glucose deprivation – *in vitro* conditions

Práce byla podpořena projektem CEB: OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0183, dále projektem MUNI/C/0944/2013 a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státní rozpočet České republiky (RECAMO; CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

This study was supported by project CEB: OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0183), by project MUNI/C/0944/2013 and by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO; CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Petr Chlapek, DiS., Ph.D.
Laboratoř nádorové biologie
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
e-mail: chlapek@sci.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 15. 1. 2014

Přijato/Accepted: 5. 5. 2014

Specifika nádorového mikroprostředí

Původní redukcionistický pohled na biologii solidních nádorů předpokládal, že nádorové onemocnění vzniká pouze v důsledku mutací, které následně způsobují progresi nádoru. Podle této teorie nádorová masa, v jejíchž buňkách se kumulují mutace, existuje víceméně izolovaně a s okolním prostředím ve tkáni komunikuje jen minimálně. Současné pojetí vychází ze skutečnosti, že tkáň nádoru je tvořena buňkami transformovanými i buňkami nenádorovými, což jsou zejména buňky stromální nebo buňky imunitního systému. Tato tkáň přijímá množství signálů ze svého okolí, které v konečném důsledku rozhodují o metabolismu, růstu a přežívání nádorově transformovaných buněk [1,2].

Zatímco přímé vzájemné interakce nádorově transformovaných buněk s buňkami netransformovanými lze v současnosti v systémech *in vitro* zkoumat jen obtížně, při kultivaci nádorových buněk je možné využít úprav kultivačního prostředí tak, aby co nejvíce odpovídalo podmínkám uvnitř nádorové tkáně. V praxi to znamená zejména nižší obsah kyslíku a glukózy v kultivačním prostředí, protože nekontrolovaný růst nádorové masy všeobecně vede k nedostatečnému zásobení jednotlivých buněk kyslíkem a živinami. Současně se jedná o snížené pH kultivačního média, což odpovídá podmínkám v nádorové tkáni, kde je pokles pH způsoben hromaděním odpadních produktů buněčného metabolismu a CO₂ [3]. Buňky nádorové tkáně *in vivo* se s těmito problémy vyrovnávají pomocí specifických změn metabolismu a stimulací neoangiogeneze [4].

Oproti normálně diferencovaným buňkám, které pro získání energie potřebné k buněčnému metabolismu upřednostňují mitochondriální oxidativní fosforylacii, většina nádorových buněk přechází i za přítomnosti kyslíku na glykolýzu – tento fenomén se označuje jako Warburgův efekt [5]. Aerobní glykolýza ovšem představuje ve srovnání s oxidativní fosforylací poměrně neefektivní cestu, jak energii ve formě ATP vyprodukovat. Proto se neustále diskutuje o tom, jaké další výhody může využívání aerobní glykolýzy nádorovým buňkám posky-

tovat. V současné době se má za to, že meziproducty glykolýzy jsou důležité pro biosyntetické procesy, které jsou nezbytné při rychlé proliferaci nádorových buněk [1,6,7]. Navíc produkce a hromadění laktátu přispívá k agresivnímu chování nádoru. Ukázalo se, že tvorba a akumulace laktátu narušuje metabolismus T lymfocytů a tím brání nádorovou tkáň před imunitním systémem. Laktát také funguje jako antioxidant a přispívá tak k rezistenci vůči léčebným postupům, které využívají indukci reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS). Produkce laktátu dále indukuje degradaci extracelulární matrix a usnadňuje tak migraci nádorových buněk. Je také známo, že laktát je schopen indukovat angiogenezi [8–11].

Cévní zásobení nádorové tkáně se vyznačuje typickou chaotickou architekturou, postrádá lymfatické cévy a kromě jiného je také často příčinou vyššího tlaku v nádorové tkáni [12]. Neoangiogeneze tedy problémy v zásobování nádorové tkáně řeší jen částečně a chaotická architektura v kombinaci s relativně častými přestavbami cévního řečiště přispívá k heterogenitě nádorové tkáně. Pro nádorové mikroprostředí jsou charakteristické vlastnosti hypoxie, extracelulární acidóza a nedostatek glukózy, k nimž dochází právě v důsledku nedostatečného cévního zásobení. I z hlediska těchto podmínek je však nádorová tkáň značně heterogenní a jednotlivé oblasti nádoru se v uvedených parametrech mohou navzájem značně lišit [13].

Měření parametrů mikroprostředí v podmínkách *in vivo*

V minulosti bylo pH nádorové tkáně v podmínkách *in vivo* měřeno pomocí skleněných nebo ocelových mikroelektrod, nevýhodou těchto přístupů však byla jejich invazivita [14]. V současnosti jsou proto upřednostňovány neinvazivní metody, zejména pozitronová emisní tomografie (PET), magnetická rezonance (MRI), popřípadě optické měření s využitím fluorescenčně značených sond [14,15]. Obdobně tomu je i u měření parciálního tlaku kyslíku, kdy se místo jehlových elektrod [16] dnes využívají metody PET a MRI v kombinaci s exogenními, popř. endogenními markery. Jako exogenní markery

jsou užívány nitrožilně nebo i orálně aplikované značené nitroaromatické sloučeniny. O nich je známo, že v buňkách dochází k redukci jejich nitro-skupin na amino-skupiny, což je proces sice běžný, ovšem za nepřítomnosti kyslíku nevratný. Jako endogenní markery slouží proteiny, jejich exprese je spojena s přítomností nebo nepřítomností kyslíku a lze je detekovat např. v plazmě, krvi nebo imunohistochemicky v nádorové tkáni získané biopsií [17,18]. Pomocí PET a MRI, nejčastěji s využitím značených analogů příslušných sloučenin, se také stanovuje metabolická spotřeba glukózy, aminokyselin nebo lipidů v nádorové tkáni [19,20].

Změny obsahu kyslíku v nádorové tkáni

V lidských orgánech se koncentrace kyslíku výrazně liší mezi jednotlivými tkáněmi. V dobře prokrvených orgánech (např. játra, ledviny, srdce) se koncentrace kyslíku pohybuje v rozmezí 4–14 %. Oproti tomu v relativně málo prokrvených orgánech, kam patří mozek (0,5–7 %), oko (1–5 %) či kostní dřev (0–4 %), jsou hodnoty nižší [21]. Hodnocení, kdy se v nádorovém mikroprostředí již jedná o hypoxii, je tedy třeba vždy porovnávat k okolní tkáni.

Hypoxie je jedním z nejtypičtějším jevů charakterizujících nádorovou tkáň. Asi polovina solidních nádorů bez ohledu na velikost a jiné parametry obsahuje hypoxické oblasti, které vznikají v důsledku exponenciální proliferace nádorových buněk v kombinaci se specifickou strukturou cévního řečiště [22]. Vzhledem k faktu, že kyslík je schopen ve tkáni difundovat pouze do vzdálenosti kolem 100 μm, se během růstu nádoru neustále zvyšuje nerovnováha mezi přísunem a spotřebou kyslíku [23–25].

Hypoxie výrazně ovlivňuje všechny metabolické procesy v buňce – a to nejen způsob využívání glukózy a s tím spojený výše popsaný Warburgův efekt, ale je také příčinou využívání alternativních zdrojů energie, jako např. aminokyseliny glutaminu [5]. Dalším metabolickým procesem, který je spojován s hypoxií, je *de novo* syntéza mastných kyselin. Ta se u většiny nenádorových buněk vyskytuje jen ojediněle [26]. To je pro buňky nádoru jedna z možností, jak ovlivňovat

redoxní rovnováhu porušenou zvýšenou glykolýzou [27]. V případě vyšší exprese syntázy mastných kyselin byla zjištěna korelace s agresivitou nádorového fenotypu [28]. Hypoxie také indukuje nebo naopak potlačuje expresi množství genů, které hrají důležitou roli v procesech angiogeneze, nádorové progresy, metastazování nebo při produkci glykolytických enzymů, růstových faktorů a transkripčních faktorů. Velmi často se tak děje prostřednictvím transkripčního faktoru HIF-1 α [29]. Již dlouho je také známo, že hypoxické nádorové buňky jsou 3–5krát rezistentnější k ionizujícímu záření v porovnání s normoxií. To souvisí se schopností kyslíku vytvářet následkem ionizujícího záření ROS, které poškozují membrány buněk a mohou způsobovat i dvouřetězcové zlomy v molekule DNA. V hypoxických podmínkách tak není tvorba ROS pro efektivitu terapie dostačující [30–32]. Stejným způsobem hypoxie zvyšuje rezistenci k některým léčivům, jako je cyklofosamid, karboplatina nebo melphalan [33].

Možnosti navození hypoxie v podmínkách *in vitro*

Pro experimentální dosažení krátkodobého maximálního anoxického efektu je možné použít směs plynů 95% N₂/5% CO₂ a inkubaci ve fosfátovém pufru s přísadou EC Oxyrase, což je biokatalytická agens redukcující zbytkový kyslík v inkubačním roztoku [34,35]. Nejčastější způsob, jak v laboratoři zajistit hypoxické podmínky, je využití hypoxické komůrky, popřípadě inkubátoru s možností úpravy a monitorování obsahu kyslíku v kultivační atmosféře. Inkubace při hladinách kritické hypoxie (1% O₂) se často využívají při výzkumu kmenových buněk, neboť hypoxie potlačuje diferenciaci a je považována za významnou vlastnost tzv. niche kmenových buněk [21,36], tedy specifického mikroprostředí okolo kmenových buněk, které se podílí na udržení biologických vlastností těchto buněk, zejména schopnosti sebeobnovy [37,38]. Stejně tak je hypoxie studována v souvislosti s hypotézou nádorových kmenových buněk a jejich mikroprostředí [39,40]. Tato teorie předpokládá existenci určité populace nádorových buněk s některými vlastnostmi buněk kmenových. Tyto vlastnosti, jako je vlastní niche, nižší frekvence

proliferace a naopak schopnost produkovat rychle se dělící progenitorové buňky, činí tyto buňky často rezistentní ke konvenční terapii.

Změny pH v nádorové tkáni

Další charakteristickou vlastností nádorové tkáně je alkalické intracelulární pH (pHi) s hodnotami v rozmezí 7,0–7,4 a kyselá extracelulární pH (pHe), jehož hodnoty dosahují 6,2–7,0 [41]. U nenádorových tkání je tomu naopak – hodnoty pHi se pohybují v intervalu 6,99–7,2 a hodnoty pHe okolo 7,4 [42,43]. Acidifikace nádorového mikroprostředí je přisuzována slabě rozvinuté cévní síti v nádorové tkáni a akumulaci kyseliny mléčné, což je produkt aerobní glykolýzy, v extracelulárním prostoru [44]. Dalším významným zdrojem acidity v hypoxickém prostředí je CO₂ [13,45], který je přeměňován pomocí anhydrázy kyseliny uhličitě na hydrogenuhličitán a proton. Kyselá pHe v okolí nádoru je spojeno s jeho progresí, konkrétně se zvýšenou produkcí angiogenních faktorů a proteáz, s pozměněnou transkripcí genů a se zvýšením invazivity nádoru [46]. Nízké pH a nahromaděná kyselina mléčná také ovlivňuje imunitní reakci organismu, neboť T lymfocyty podobně jako nádorové buňky upřednostňují glykolýzu i za přítomnosti kyslíku a přebytečné kyseliny mléčné se zbavují transportem do okolí díky koncentračnímu gradientu. V nádorovém prostředí je ovšem tento gradient zablokovaný a kyselina mléčná uvnitř T lymfocytů narušuje jejich metabolismus a znemožňuje tak jejich správnou funkci [47]. Snížené pHe také přispívá k nestabilitě genomu, a to hlavně kvůli poškození reparačních mechanismů. V podmínkách *in vitro* se potvrdilo, že buňky vystavené kyselému pH a hypoxii vykazovaly nižší schopnost reparace ve srovnání s buňkami kultivovanými v normoxických podmínkách. Příčinou je inhibiční působení nízkého pH a nízkého pO₂ na reparační systém N-ER (nucleotide excision repair) [48]. Další genomové změny jsou zapříčiněny klastogenním působením kyselého pH, které může způsobit zlomy DNA, výměny chromatid a přestavby chromozomů [49]. V nádorovém prostředí se rovněž často vyskytují buňky s poruchou reparačního systému MMR (DNA mismatch repair), jež

jsou náchylnější ke vzniku spontánních mutací. Důvodem jejich zvýšeného výskytu je skutečnost, že buňky s touto poruchou jsou rezistentní k apoptóze vyvolané hypoxií nebo nízkým pH [46]. Kyselý charakter nádorového mikroprostředí je spojován také s rezistencí nádorových buněk k některým chemoterapeutikům. Může za to fakt, že množství chemoterapeutik se do buněk dostává v neutrální formě a díky působení kyselého pH dochází k protonaci chemoterapeutických činidel a tím ke znemožnění jejich prostupu přes cytoplazmatickou membránu. Mezi takto ovlivněná chemoterapeutika patří např. vinkristin a doxorubicin [44]. V nádorovém mikroprostředí *in vivo* je tedy jejich příjem buňkou snížen a pacient se stává k daným léčivům rezistentním. V současnosti se proto využívají různé přístupy, jak takovému lékové rezistenci překonat – patří k nim např. alkalizace nádorového mikroprostředí nebo enkapsulace léčiv do micel [25].

Možnosti navození změn pH v podmínkách *in vitro*

Pro navození acidických podmínek se v systémech *in vitro* využívá především upravené médium, v kterém jsou buňky kultivovány za jinak standardních podmínek. Do média se přidává specifický organický pufrovací systém, aby v kultivačních podmínkách (37°C/5% CO₂) bylo udrženo žádané pH. Nejčastěji se pH upravuje na hodnoty v rozmezí pHe 6,5–6,8 pomocí NaOH a HCl. Pro výzkum působení alkalického prostředí používají různí autoři rozdílné hodnoty pH i odlišné pufrы.

Popsáno bylo např. použití 15mM MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) a Bis-Tris při výzkumech vlivu nízkého pH na vznik chromozomálních aberací [49,50]; 25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) [48] a 25 mM MOPS (4-morpholinepropanesulfonic acid); 20 mM HEPES, 20 mM MES a 10 mM tricinI [41] a také 25 mM NaHCO₃ [13].

Změny koncentrace glukózy v nádorové tkáni

Specifickým rysem nádorového mikroprostředí je glukózový deficit. Zatímco průměrná koncentrace glukózy v krvi se typicky pohybuje okolo 1 220 nmol/g,

tj. asi 5,6 nmol/l, v nádorové tkáni byly zaznamenány hodnoty několikanásobně nižší [51,52]. Hlavní příčina tohoto deficitu je nedostatečné prokrvení nádorové tkáně způsobené chaoticky řízenou angiogenezí. Další příčina může být vyšší spotřeba glukózy, ze které nádorové buňky získávají energii častěji glykolýzou než oxidativní fosforylací, a proto jí na stejné množství získané energie spotřebují více. Zvýšená spotřeba glukózy má i přímou souvislost s hypoxií, neboť některé enzymy důležité pro glykolýzu jsou regulovány transkripčním faktorem HIF-1 [25]. Metabolismus glukózy a s ním spojené hromadění laktátu může mít nejen vliv na agresivní chování nádoru a případnou léčbu, jak bylo zmíněno výše, ale glukózová deprivace v kombinaci s hypoxií a nízkým pH může na progresi a expanzi nádoru působit i bezprostředně, protože většina buněk vznikajícího nádoru není schopna se těmto změněným podmínkám přizpůsobit a typickým výsledkem je tak buď indukce nekrózy, nebo apoptózy. Výše zmíněné nádorové kmenové buňky ovšem mohou tuto selekci přežít a v kombinaci s rezistencí k léčbě pak představují potenciální riziko recidivy onemocnění. Identifikace takovýchto buněk a pochopení specifík jejich biologických vlastností otevírá nové perspektivy v protinádorové terapii [25,53–55].

Možnosti navození změn koncentrace glukózy v podmínkách *in vitro*

Vliv snížené hladiny glukózy na nádorově transformované buňky je nejčastěji studován pomocí inkubace v bezglukózovém médiu pouze s přidávkem fetálního telecího séra (10–15 %) se sérovým obsahem glukózy [56,57], nebo s přidáním glukózy v nižším množství, než je v běžném médiu s nízkým obsahem glukózy (5 mM). Například Raffaghello et al [58] popisují, že prostředí se sníženým množstvím glukózy (2,5 mM) může chránit savčí buňky před vysokými dávkami oxidativního poškození nebo před působením chemoterapeutik. Další možností studia je využití některých induktorů proteinů regulovaných glukózou (GRP), jako jsou např. deoxyglukóza, glukosamin či Calimycin A23187 [59].

3D kultivace

V poslední době se výzkumu nádorového mikroprostředí *in vitro* otevírají nové možnosti v podobě kultivací v 3D strukturách. Výhoda takových kultivací je možnost simulovat nejen biochemické faktory, ale zároveň i mechanické podněty, u kterých bylo také zjištěno, že jejich modifikace může mít vliv na buněčný růst, migraci a invazivitu stejně jako na proliferaci a apoptózu [60]. Pochopitelně nej přesnější simulací 3D prostředí je kultivace s využitím kompletních organismů nebo jejich embryí. Mezi úskalí těchto přístupů ovšem patří nemožnost přesně definovat kultivační prostředí, nesnadné zobrazování kultivovaných buněk a také s těmito přístupy spojené otázky ekonomické a etické. V prostoru mezi 2D kultivačními modely a využitím kompletních organismů se tak lze setkat nejčastěji s kultivacemi formou buněčných sfér a nebo s různými modely tkáňového inženýrství [61].

Tkáňové inženýrství bylo původně rozvíjeno ve snaze vyvinout funkční náhražky tkání a orgánů. To vedlo k vytvoření 3D matic a lešení, na která jsou v laboratoři nanášeny různé typy buněk za přítomnosti požadovaných růstových faktorů [62]. Lešení imituje podmínky přirozeně se nacházející v extracelulární matrix, což umožňuje buňkám nabyt přirozený tvar a zajistit přirozenou tkáňovou organizaci [63]. Tyto 3D kultivace rychle zaujaly své místo ve výzkumu, kde jsou využívány především pro sledování angiogenních a tumorigenních mechanismů nádoru [62].

Buněčné sféry jsou v porovnání s tkáňovým inženýrstvím jednoduché 3D modely, založené na schopnosti adhezních buněk agregovat. Tyto modely nevyžadují lešení a mohou být jednoduše pozorovány mikroskopem. Svoje uplatnění nacházejí především v modelaci růstu solidních nádorů a studiu schopností metastazovat [64]. Nevýhodou sfér je neschopnost transportu látek a tak se díky hladovění a toxicitě nahromaděných metabolitů ve sférách větších než 1 mm tvoří centra s odumřelými buňkami [63].

Problém s transportem látek, přísunem kyslíku a živin v 3D kulturách v současnosti řeší bioreaktory. Tyto přístroje

jsou integrovány s výše uvedenými 3D modely a umožňují přesnou a reprodukovatelnou kontrolu podmínek požadovaných při kultivaci, jako je teplota, pH, střední průtok, hladina kyslíku, přívod živin nebo odstranění metabolitů [63].

Ačkoliv mají přístupy 3D kultivace stále ještě některé limity, oproti běžným 2D kultivacím v podmínkách *in vitro* jsou schopny poskytovat informace, které mnohem lépe reflektují specifika biologie solidních nádorů, a to navíc rychleji a levněji v porovnání se zvířecími modely.

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 2002; 12(4): 261–266.
3. Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York: Garland Science 2007.
4. Gillies RJ, Morse DL. *In vivo* magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annu Rev Biomed Eng* 2005; 7: 287–326.
5. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev* 2012; 26(9): 877–890. doi: 10.1101/gad.189365.112.
6. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930): 1029–1033.
7. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13(6): 472–482.
8. Hamanaka RB and Chandel NS. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp Med* 2012; 209(2): 211–215.
9. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 441–464. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
10. Meijer TW, Kaanders JH, Span PN et al. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clin Cancer Res* 2012; 18(20): 5585–5594. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0858.
11. Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res* 2011; 71(22): 6921–6925. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.
12. Cairns R, Papandreou I, Denko N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 2006; 4(2): 61–70.
13. Helmlinger G, Sckell A, Dellian M et al. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* 2002; 8(4): 1284–1291.
14. Volk T, Jähde E, Fortmeyer HP et al. pH in human tumor xenografts: effect of intravenous administration of glucose. *Br J Cancer* 1993; 68(3): 492–500.
15. Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med* 2010; 51(8): 1167–1170. doi: 10.2967/jnumed.109.068981.
16. Höckel M, Schlenger K, Knoop C et al. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991; 51(22): 6098–6102.
17. Rademakers SE, Span PN, Kaanders JH et al. Molecular aspects of tumour hypoxia. *Mol Oncol* 2008; 2(1): 41–53. doi: 10.1016/j.molonc.2008.03.006.

18. Zhu W, Dai M, Xu Y et al. Novel nitroheterocyclic hypoxic markers for solid tumor: synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(6): 3255–3260.
19. Plathow C, Weber WA. Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med* 2008; 49 (Suppl 2): 43S–63S. doi: 10.2967/jnumed.107.045930.
20. Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F et al. *In vivo* imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nat Med* 2013; 19(8): 1067–1072. doi: 10.1038/nm.3252.
21. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 271–275. doi: 10.1002/jcp.21690.
22. Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 2004; 381: 335–354.
23. Wykoff CC, Beasley N, Watson PH et al. Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol* 2001; 158(3): 1011–1019.
24. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11): 891–899.
25. Annibaldi A, Widmann C. Glucose metabolism in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13(4): 466–470. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833a5577.
26. Furuta E, Pai SK, Zhan R et al. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res* 2008; 68(4): 1003–1011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2489.
27. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ et al. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(18): 9493–9498.
28. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD et al. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(14): 6379–6383.
29. Glazer PM, Hegan DC, Lu Y et al. Hypoxia and DNA Repair. *Yale J Biol Med* 2013; 86(4): 443–451.
30. Vaupel P, Höckel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(8): 1221–1235.
31. Lemaire L, Howe FA, Rodrigues LM et al. Assessment of induced rat mammary tumour response to chemotherapy using the apparent diffusion coefficient of tissue water as determined by diffusion-weighted (1)H-NMR spectroscopy *in vivo*. *MAGMA* 1999; 8(1): 20–26.
32. Gray LH, Conger AD, Ebert M et al. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26(312): 638–648.
33. Teicher BA, Holden SA, Al-Achi A et al. Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations *in vivo* in the FSaIIc murine fibrosarcoma. *Cancer Res* 1990; 50(11): 3339–3344.
34. Saikumar P, Dong Z, Patel Y et al. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 1998; 17(26): 3401–3415.
35. Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J et al. Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001; 276(22): 18702–18709.
36. Cipolleschi MG, D'ippolito G, Bernabei PA et al. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E *in vitro*. *Exp Hematol* 1997; 25(11): 1187–1194.
37. Cipolleschi MG, Rovida E, Dello Sbarba P. The culture-repopulating ability assays and incubation in low oxygen: a simple way to test drugs on leukaemia stem or progenitor cells. *Curr Pharm Des* 2013; 19(30): 5374–5383.
38. Eliasson P, Jönsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* 2010; 222(1): 17–22. doi: 10.1002/jcp.21908.
39. Cipolleschi MG, Marzi I, Santini R et al. Hypoxia-resistant profile implies vulnerability of cancer stem cells to physiological agents, which suggests new therapeutic targets. *Cell Cycle* 2013; 13(2): 268–278. doi: 10.4161/cc.27031.
40. Anderson KM, Guinan P, Rubenstein M. Normoxic or hypoxic CD44/CD41 a(2) B(1) integrin-positive prostate PC3 cell side fractions and cancer stem cells. *Med Oncol* 2014; 31(1): 779. doi: 10.1007/s12032-013-0779-1.
41. Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B et al. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(7): 1207–1218.
42. Danhier F, Feron O, Preat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010; 148(2): 135–146. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.027.
43. Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol* 2013; 4: 354.
44. Cukierman E, Khan DR. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(5): 762–770. doi: 10.1016/j.bcp.2010.04.020.
45. Svastova E, Hulikova A, Rafajova M et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 2004; 577(3): 439–445.
46. Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS et al. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002; 16(4): 430–450.
47. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007; 109(9): 3812–3819.
48. Yuan J, Narayanan L, Rockwell S et al. Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer Res* 2000; 60(16): 4372–4376.
49. Morita T, Nagaki T, Fukuda I et al. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* 1992; 268(2): 297–305.
50. Morita T. Low pH leads to sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations, and its clastogenicity is S-dependent. *Mutat Res* 1995; 334(3): 301–308.
51. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M et al. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 2009; 69(11): 4918–4925. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4806.
52. Urasaki Y, Heath L, Xu CW. Coupling of glucose deprivation with impaired histone H2B monoubiquitination in tumors. *PLoS One* 2012; 7(5): e36775. doi: 10.1371/journal.pone.0036775.
53. Seyfried BT, Kiebish M, Marsh J et al. Targeting energy metabolism in brain cancer through calorie restriction and the ketogenic diet. *J Cancer Res Ther* 2009; 5 (Suppl 1): S7–S15. doi: 10.4103/0973-1482.55134.
54. Skinner R, Trujillo A, Ma X et al. Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 2009; 44(1): 212–216; discussion 216. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.10.042.
55. Jin S, DiPaola RS, Mathew R et al. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 3): 379–383.
56. Hwang JH, Kim JY, Cha MR et al. Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to pteridine A, a GRP78 down-regulator. *J Cell Physiol* 2008; 215(1): 243–250.
57. Shen J, Hughes C, Chao C et al. Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(10): 3278–3282.
58. Raffaghello L, Lee C, Safdie FM et al. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(24): 8215–8220. doi: 10.1073/pnas.0708100105.
59. Tomida A, Yun J, Tsuruo T. Glucose-regulated stresses induce resistance to camptothecin in human cancer cells. *Int J Cancer* 1996; 68(3): 391–396.
60. Desmaison A, Frongia C, Grenier K et al. Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids. *PLoS One* 2013; 8(12): e80447. doi: 10.1371/journal.pone.0080447.
61. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10): 839–845.
62. Horch RE, Boos AM, Quan Y et al. Cancer research by means of tissue engineering – is there a rationale? *J Cell Mol Med* 2013; 17(10): 1197–1206. doi: 10.1111/jcmm.12130.
63. Haycock JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol* 2011; 695: 1–15. doi: 10.1007/978-1-60761-984-0_1.
64. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 69–70C: 29–41. doi: 10.1016/j.addr.2014.03.001.