

7. marec
Deň výskumu
rakoviny



SÚŤAŽ MLADÝCH ONKOLÓGOV 2024

ZBORNÍK PREDNÁŠOK

Nadácia Výskum Rakoviny

12. MAREC 2024

Názov: Súťaž mladých onkológov 2024. Zborník prednášok.

Zborník tvorí súbor recenzovaných rozšírených abstraktov ako aj abstraktov prác prezentovaných na Súťaži mladých onkológov 2024.

Zostavili: RNDr. Alena Gábelová, CSc., RNDr. Ján Sedlák, DrSc., doc. RNDr. Soňa Čierniková, PhD.

Vydavateľ: Nadácia Výskum Rakoviny
Karloveská 6C
841 04 Bratislava

www.nvr.sk

Bratislava, máj 2024

Recenzenti: doc. RNDr. Soňa Čierniková, PhD., RNDr. Margita Klobušická, CSc., RNDr. Ján Sedlák, DrSc.

Fotografie: Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.



Nadácia Výskum Rakoviny

Tento zborník je licencovaný na základe medzinárodnej licencie Creative Commons Attribution 4.0, ktorá povoľuje používanie, zdieľanie, adaptáciu, distribúciu a reprodukciu na akomkoľvek médiu alebo formáte, ak uvediete príslušné meno autora (autorov) a zdroja a poskytnete odkaz na licenciu Creative Commons. Ak chcete zobrazit' kópiu tejto licencie, navštívte stránku <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

ISBN 978-80-971621-5-3

Autori súťažných prác

ADAMCOVÁ-SELČANOVÁ SVETLANA, ADAMKOV MARIÁN, ALTANER ČESTMÍR, ANDRAŠINA IGOR, ANTAL IRYNA, BABÁL PAVEL, BAČIAK LADISLAV, BAJTOŠ MAREK, BALÁŽOVÁ LEA, BARČÁKOVÁ IVANA, BARILA RADOVAN, BEKE GÁBOR, BEĽA ADRIÁN, BIRÓ CSABA, BLAŠKO FILIP, BOHUŠ PETER, BRANÝ DUŠAN, BRTKO JÚLIUS, BRUDEROVÁ VLADIMÍRA, BUBLAKOVA ESTER, BUOCIKOVÁ VERONA, BURÍKOVÁ MONIKA, CIHOVÁ MARÍNA, CINGELOVA SILVIA, CSICSÁTKOVÁ NIKOLETA, CZAKÓ LADISLAV, ČIERNIKOVÁ SOŇA, ČUMOVÁ ANDREA, DANG NHAT, DRGOŇA ĽUBOŠ, DRNĎÁKOVÁ LAURA, DUBAYOVÁ KATARÍNA, DURDIK MATUS, DUŠENKA RÓBERT, DVORSKÁ DANA, MARINKOVIČOVÁ MÁRIA ELISABETH, EVIN DANIEL, FARSKÁ JÚLIA, FEDOROČKO PETER, FURKA SAMUEL, GÁLIKOVÁ DOMINIKA, GÁLIS BRANISLAV, GERČÁKOVÁ KATARÍNA, GOGOLA DANIEL, GOLIAŠ TEREZA, GONDÁŠ EDUARD, GULATI SACHIN, GURHAN HAKKI, GUŽIKOVÁ JAROSLAVA, GVOZDJAKOVÁ ANNA, HEDEROVA STANISLAVA, HOLÍČKOVÁ ANDREA, HORVÁTHOVÁ EVA, HORVÁTHOVÁ-KAJABOVÁ VIERA, HRASKO ANDREJ, HUDÁK ĽUBOŠ, HUDÁKOVÁ LUCIA, HÝBLOVÁ MICHAELA, CHOLUJOVÁ DANKA, CHOVANEC MICHAL, CHOVANEC MIROSLAV, IVOVIČ DANICA, JAKUBECHOVÁ JANA, JAKUBÍKOVÁ JANA, JANOŠIAKOVÁ NIKOLA, JANOUŠEK LADISLAV, JARČUŠKA PETER, JENDŽELOVSKÁ ZUZANA, JENDŽELOVSKÝ RASTISLAV, JUHÁSIKOVÁ LUCIA, JUREČEKOVÁ JANA, JURKOVIČOVÁ DANA, KABELÍKOVÁ PAVLÍNA, KAJO KAROL, KAĽAVSKÁ KATARÍNA, KAŤUCHOVÁ JANA, KHMARA IRYNA, KLIMENT JÁN, KLIMOVÁ DANIELA, KĽOC DOMINIK, KĽUČÁR ĽUBOŠ, KMEŤOVÁ SIVOŇOVÁ MONIKA, KNOŠKO BROŽOVÁ MARTINA, KOCIANOVÁ EVA, KOCIKOWSKA OLGA, KODADA DOMINIK, KOCHANOVA DOMINIKA, KOLENOVA ALEXANDRA, KOMÁROVÁ JANA, KONERACKÁ MARTINA, KRAJCOVICOVA VERONIKA, KRIVOŠÍKOVÁ LUCIA, KRUMPOLEC PATRIK, KUBATKA PETER, KUBOVČÍKOVÁ MARTINA, KUČEROVÁ LUCIA, KUCHÁRSKA JARMILA, KURDIOVÁ TÍMEA, LACKOVÁ LENKA, LAPINOVÁ JANA, LEŠKO PETER, LEŠKOVÁ KATARÍNA, LÍŠKOVÁ MONIKA, MACEJOVÁ DANA, MAJERNÍK MARTIN, MAKOVÁ MARIANNA, MAKOVICKÝ PETER, MARDIAK JOZEF, MAREKOVÁ MÁRIA, MASAROVICH JOZEF, MAŠLANKOVÁ JANA, MATÚŠKOVÁ MIROSLAVA, MAZURÁKOVÁ ALENA, MEČIAKOVÁ MARTINA, MEGO MICHAL, MIKLÍKOVÁ SVETLANA, MINÁRIK GABRIEL, MLADOSIEVIČOVÁ BEATA, MLČÁKOVÁ ANDREA, MRAVEC BORIS, MURÍN RADOVAN, NIKOLAIEVA NATALIJA, OBERTO VÁ JANA, OMASTA BOŽENA, ÓRÁSOVÁ EVELINE, ORSZÁGHOVÁ ZUZANA, PALACKA PATRIK, PETROVÁ IVANA, PETROVIČ OLIVER, PIATRIKOVÁ VIKTÓRIA, PLAVÁ JANA, RÁC MAREK, RAČAY PETER, REČKOVÁ MÁRIA, REJLEKOVÁ KATARÍNA, REPISKÁ VANDA, ROJIKOVÁ LUCIA, ROJÍKOVÁ LUCIA, ROŠKA JAN, ROŠKOVIČOVÁ VERONIKA, RYCHLY BORIS, SADLOŇOVÁ VLADIMÍRA, SAMEC MAREK, SEDLÁK JÁN, SCHMIDTOVÁ SILVIA, SKALICKA KATARINA, SKLADANÝ ĽOBOMÍR, SLOPOVSKÝ JÁN, SMOLKOVÁ BOŽENA, SOVIŠ MAREK, BARNES FRANK STEPHENSON, STUDENT SEBASTIAN, STUPÁK MAREK, SUROVIAKOVÁ KATARÍNA, SVETLOVSKÁ DANIELA, SYČOVÁ-MILÁ ZUZANA, ŠAFČÁK DOMINIK, ŠARIŠSKÝ MAREK, ŠEVČÍKOVÁ ANETA, ŠIMKO KRISTIÁN, ŠKEREŇOVÁ MÁRIA, ŠOFRANKO JAKUB, ŠTEFÁK ANDREJ, ŠTEVURKOVÁ VIOLA, ŠVECOVÁ MONIKA, TAKÁČOVÁ MARTINA, TIBENSKÝ MIROSLAV, TICHÝ BORIS, TOMÁŠKOVÁ JANA, TRNKOVÁ LENKA, TYČIAKOVÁ SILVIA, UDVORKOVÁ NATÁLIA, UKROPCOVÁ BARBARA, UKROPEC JOZEF, URBANOVÁ MÁRIA, URDZÍK PETER, VALLOVÁ MIROSLAVA, VALUŠKOVÁ ZUZANA, VEČURKOVSKÁ IVANA, VIDO VÁ IVANA, VILČKOVÁ MARTA, ZÁVIŠOVÁ VLASTA, ZBELLOVÁ LINDA, ŽELEZNÍKOVÁ TATIANA, ŽIGRAI MIROSLAV

OBSAH

Zoznam súťažiacich v jednotlivých kategóriách	viii
Zoznam členov hodnotiacich komisií	ix
Zoznam víťazov jednotlivých kategórií	xi

ROZŠÍRENÉ ABSTRAKTY SÚŤAŽNÝCH PRÁC

ANDREJ ŠTEFÁK, KATARÍNA LEŠKOVÁ

PROGNOSTICKÝ VÝZNAM EXPRESIE P53 PROTEÍNU V DIFÚZNYCH VEĽKOBUNKOVÝCH B-LYMFÓMOCH A VYSOKOAGRESÍVNYCH B-BUNKOVÝCH LYMFÓMOCH S DVOJITOU/TROJITOU PRESTAVBOU GÉNOV MYC, BCL2 A/ALEBO BCL6	2
---	--------------------------

ANETA ŠEVČÍKOVÁ, VIOLA ŠTEVURKOVÁ, NATALIJA NIKOLAIEVA, SILVIA SCHMIDTOVÁ, NATÁLIA UDVORKOVÁ, LUCIA ROJIKOVÁ, SILVIA TYČIAKOVÁ, KATARÍNA KALAVSKÁ, LUCIA KUČEROVÁ, MICHAL MEGO, SOŇA ČIERNIKOVÁ

ŠTÚDIUM ASOCIÁCIÍ MEDZI ČREVNÝM MIKROBIÓMOM A CHEMOREZISTENCIOU V XENOGRAFTOVOM MODELI TESTIKULÁRNYCH NÁDOROV Z GERMINATÍVNYCH BUNIEK ..	5
---	--------------------------

LENKA TRNKOVÁ, VERONA BUOCIKOVÁ, MONIKA BURÍKOVÁ, ANDREA ČUMOVÁ, JANA PLAVÁ, BORIS TICHÝ, SVETLANA MIKLÍKOVÁ, BOŽENA SMOLKOVÁ, MARÍNA CIHOVÁ

OBJASNENIE MECHANIZMOV REZISTENCIE NA CHEMOTERAPIU U POKROČILÉHO KARCINÓMU PRSNÍKA	10
---	---------------------------

MONIKA ŠVECOVÁ, KATARÍNA DUBAYOVÁ, PETER URDZÍK, MÁRIA MAREKOVÁ

FLUORESCENČNÁ METABOLOMIKA: NOVÝ PRÍSTUP K DIAGNOSTIKE ENDOMETRIÁLNEHO KARCINÓMU	15
---	---------------------------

JÁN SLOPOVSKÝ, JARMILA KUCHÁRSKA, JANA OBERTO VÁ, MICHAL MEGO, KATARÍNA KALAVSKÁ, SILVIA CINGELOVA, DANIELA SVETLOVSKÁ, ANNA GVOZDJAKOVÁ, SAMUEL FURKA, PATRIK PALACKA

REAKTÍVNE LÁTKY KYSELINY TIOBARBITUROVEJ V PLAZME PREDIKUJÚ PREŽÍVANIE NEPREDLIEČENÝCH PACIENTOV S METASTATICKÝM UROTELOVÝM KARCINÓMOM	20
---	---------------------------

LEA BALÁŽOVÁ, IGOR ANDRAŠINA, PETER JARČUŠKA, DOMINIK ŠAFČÁK, MICHAL MEGO, ĽOBOMÍR SKLADANÝ, SVETLANA ADAMCOVÁ-SELČANOVÁ, MIROSLAV ŽIGRAI, MAREK RÁC, RADOVAN BARILA

ÚLOHA SUBKLINICKÉHO ZÁPALU PRI NÁDOROCH PEČENE	26
---	---------------------------

IVANA BARČÁKOVÁ, ZUZANA JENDŽELOVSKÁ, RASTISLAV JENDŽELOVSKÝ, PETER FEDOROČKO

ŠTÚDIUM ÚČINKOV SKYRÍNU AKO PRÍRODNEJ LÁTKY S POTENCIÁLOM V PROTINÁDOROVEJ TERAPII	31
---	---------------------------

FILIP BLAŠKO, MIROSLAV TIBENSKÝ, LUCIA KRIVOŠÍKOVÁ, PAVEL BABÁL, BORIS MRAVEC

VÝZNAM NERVOVÝCH VLÁKIEN PRI NÁDOROVÝCH CHOROBÁCH	36
--	---------------------------

GABRIELA BLAŠKOVÁ, IVANA BARČÁKOVÁ, MARTIN MAJERNÍK, RASTISLAV JENDŽELOVSKÝ,
PETER FEDOROČKO

**PROTEÍNY RODINY ERM AKO NÁSTROJ REGULÁCIE EFLUXNEJ AKTIVITY ABC
TRANSPORTNÉHO PROTEÍNU BCRP 43**

JÚLIA FARSKÁ, IVANA VIDOVÁ, MAREK SOVIŠ, LADISLAV CZAKÓ, KRISTIÁN ŠIMKO, BRANISLAV
GÁLIS

**REKONŠTRUKČNÁ CHIRURGIA AKO FAKTOR OVPLYVŇUJÚCI PREŽÍVANIE PACIENTOV S SCC
HLAVY A KRKU 48**

KATARÍNA GERČÁKOVÁ, EVA HORVÁTHOVÁ, DANA MACEJOVÁ, JÚLIUS BRTKO, MIROSLAVA
MATÚŠKOVÁ

**VPLYV NOVÝCH ORGANOCÍNIČITÝCH ZLÚČENÍN NA VYBRANÉ BUNKOVÉ LÍNIE NÁDORU
PRSNEJ ŽLÁZY 53**

JAROSLAVA GUŽIKOVÁ, MONIKA LÍŠKOVÁ, ĽUBOŠ HUDÁK, PETER RAČAY

**VPLYV INHIBÍCIE E3 UBIKVITÍN LIGÁZY HRD1 NA PREŽÍVANIE A ODPOVEĎ BUNKOVÝCH LÍNIÍ
NÁDOROV MOZGU 58**

NIKOLA JANOŠTIAKOVÁ, DOMINIK KODADA, OLIVER PETROVIČ, MICHAELA HÝBLOVÁ, MÁRIA
REČKOVÁ, MICHAL MEGO, VANDA REPISKÁ, GABRIEL MINÁRIK

**DETEKCIA ZÁRODOČNÝCH PATOGÉNNÝCH VARIANTOV U SLOVENSKÝCH RÓMSKYCH
ONKOLOGICKÝCH PACIENTOV - PILOTNÁ ŠTÚDIA 63**

PAVLÍNA KABELÍKOVÁ, DANICA IVOVIČ, DANA JURKOVIČOVÁ

**MITOCHONDRIA IN TESTICULAR GERM CELL TUMORS: MORE THAN JUST A POWERHOUSE?
..... 69**

DOMINIK KL'OC, MAREK ŠARIŠSKÝ

**SLAMF3 RECEPTOR AKO POTENCIÁLNY TERAPEUTICKÝ CIEĽ U VYBRANÝCH
HEMATOLOGICKÝCH MALIGNÍT 74**

MARTINA KNOŠKO BROŽOVÁ, MÁRIA ŠKEREŇOVÁ, JANA JUREČEKOVÁ, JÁN KLIMENT, RÓBERT
DUŠENKA, DANIEL EVIN, MARTINA MEČIAKOVÁ, MARTA VILČKOVÁ, MONIKA KMEŤOVÁ
SIVOŇOVÁ

**INTERAKCIA MEDZI TP53 A CDKN1A POLYMORFIZMAMI A RIZIKOM VZNIKU KARCINÓMU
PROSTATY 79**

DOMINIK KODADA, NIKOLA JANOŠTIAKOVÁ, PATRIK KRUMPOLEC, MICHAELA HÝBLOVÁ,
VANDA REPISKÁ, GABRIEL MINÁRIK

TEKUTÁ BIOPSIA A JEJ POTENCIÁL V DIAGNOSTIKE KARCINÓMU ENDOMETRIA 84

JANA KOMÁROVÁ, MARTINA TAKÁČOVÁ, JOZEF UKROPEC, BARBARA UKROPCOVÁ, TIMEA
KURDIOVÁ

**MOLECULES DERIVED FROM EXERCISE-CONDITIONED HUMAN PLASMA AND MOLECULAR
MECHANISM OF THEIR TUMOR-SUPPRESSIVE EFFECTS ON COLORECTAL CANCER CELLS 90**

JANA LAPINOVÁ, TEREZA GOLIAŠ, MARTINA TAKÁČOVÁ

ADIPOCYTMI-PRODUKOVANÉ FAKTORY OVPLYVŇUJÚ EXPRESIU KARBONICKEJ ANHYDRÁZY IX V BUNKÁCH KARCINÓMU PRSNÍKA A HRUBÉHO ČREVA 95

MARTINA MEČIAKOVÁ, MONIKA KMEŤOVÁ SIVOŇOVÁ, JÁN KLIMENT, RÓBERT DUŠENKA, DANIEL EVIN, MARTINA KNOŠKO BROŽOVÁ, MARTA VILČKOVÁ, JANA JUREČEKOVÁ

ÚLOHA ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA SPRIAHNUTÉHO S G-PROTEÍNMI (GPER) PRI VZNIKU A PROGRESII KARCINÓMU PROSTATY 100

VIKTÓRIA PIATRIKOVÁ, EVA KOCIANOVÁ, BOŽENA OMASTA, JANA TOMÁŠKOVÁ, TEREZA GOLIAŠ

ANALÝZA ROZDIELOV METABOLIZMU MASTNÝCH KYSELÍN V TESTIKULÁRNYCH NÁDOROVÝCH BUNKÁCH SENZITÍVNYCH A REZISTENTNÝCH NA CISPLATINU 105

NATÁLIA UDVORKOVÁ LUCIA KUČEROVÁ, MICHAL MEGO

ZVRÁTENIE CHEMOREZISTENCIE NÁDOROV VZNIKAJÚCICH ZO ZÁRODOČNÝCH BUNIEK POMOCOU KOMBINOVANEJ TERAPIE ZAMERANEJ NA SUBPOPULÁCIU NÁDOROVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK 110

MÁRIA URBANOVÁ, VERONA BUOCIKOVÁ, MARÍNA CIHOVÁ, MONIKA BURÍKOVÁ, LUCIA JUHÁSIKOVÁ, LAURA DRNĎÁKOVÁ, VIERA HORVÁTHOVÁ-KAJABOVÁ, LUCIA ROJÍKOVÁ, MARIANNA MAKOVÁ, LADISLAV BAČIAK, DANIEL GOGOLA, JANA JAKUBECHOVÁ, BOŽENA SMOLKOVÁ

MODELOVANIE MIKROPROSTREDIA NÁDOROV PANKREASU PRE SPOĽAHLIVEJŠIE PREDKLINICKÉ TESTOVANIE LIEČIV..... 118

ZUZANA VALUŠKOVÁ, NIKOLETA CSICSÁTKOVÁ, KATARÍNA SUROVIAKOVÁ, MÁRIA ELISABETH MARINKOVIČOVÁ, LINDA ZBELLOVÁ, GÁBOR BEKE, ANDREA MLČÁKOVÁ, TATIANA ŽELEZNÍKOVÁ, ĽUBOŠ KL'UČÁR, JÁN SEDLÁK, ĽUBOŠ DRGOŇA, DANKA CHOLUJOVÁ, JANA JAKUBÍKOVÁ

PROFILOVANIE EXPRESIE IMUNITNÝCH KONTROLNÝCH BODOV V MYELÓMOVOM MIKROPROSTREDÍ 123

IVANA VEČURKOVSKÁ, JANA MAŠLANKOVÁ, MAREK STUPÁK, JANA KAŤUCHOVÁ, VERONIKA ROŠKOVIČOVÁ, PETER BOHUŠ

EXPRESIA VYBRANÝCH ČLENOV TGF- β /SMAD SIGNÁLNEJ DRÁHY V PROGRESII A PREŽÍVANÍ PACIENTOV S KOLOREKTÁLNYM KARCINÓMOM 127

MARTIN MAJERNÍK, LUCIA HUDÁKOVÁ, IRYNA ANTAL, MARTINA KUBOVČÍKOVÁ, IRYNA KHMARA, VLASTA ZÁVIŠOVÁ, MARTINA KONERACKÁ, RASTISLAV JENDŽELOVSKÝ, PETER FEDOROČKO

SÚ NANOČASTICE VHODNÝM RIEŠENÍM PRE APLIKÁCIU HYDROFÓBNÝCH FOTSENZIBILIZÁTOROV VO FOTODYNAMICKEJ TERAPII? 132

ABSTRAKTY SÚŤAŽNÝCH PRÁC

JOZEF MASAROVÍČ, SOŇA ČIERNIKOVÁ

ÚLOHA ČREVNÉHO MIKROBIÓMU V ÚČINNOSTI PROTINÁDOROVEJ TERAPIE A TOXICITE ASOCIOVANEJ S LIEČBOU [139](#)

ADRIÁN BELA, ALENA MAZURÁKOVÁ, LENKA LACKOVÁ, MAREK SAMEC, KAROL KAJO, DANA DVORSKÁ, DUŠAN BRANÝ, VLADIMÍRA SADLOŇOVÁ, MARIÁN ADAMKOV, PETER KUBATKA

SALVIA OFFICINALIS L. V CHEMOPREVENCIÍ EXPERIMENTÁLNEHO KARCINÓMU PRSNÍKA SAMÍC POTKANOV [141](#)

MATUS DURDIK, VERONIKA KRAJCOVICOVA, ANDREJ HRASKO, ESTER BUBLAKOVA, BORIS RYCHLY, DOMINIKA KOCHANOVA, STANISLAVA HEDEROVA, KATARINA SKALICKA, ALEXANDRA KOLENOVA

METHYLATION ARRAY IN THE DIAGNOSIS OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM TUMORS [142](#)

DANIELA KLIMOVÁ, ČESTMÍR ALTANER, VANDA REPISKÁ

MALÉ EXTRACELULÁRNE VEZIKULY ODVODENÉ ZO ZUBNÝCH MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK NAPLNENÉ GEMCITABÍNOM INHIBUJÚ RAST ĽUDSKÝCH PANKREATICKÝCH NÁDOROVÝCH BUNIEK *IN VITRO* [144](#)

MAREK BAJTOŠ, LADISLAV JANOUŠEK, OLGA KOCIKOWSKA, SEBASTIAN STUDENT, HAKKI GURHAN, NHAT DANG, FRANK STEPHENSON BARNES

ELECTROMAGNETISM AND CANCER CELLS [145](#)

EDUARD GONDÁŠ, JAKUB ŠOFRANKO, RADOVAN MURÍN

EXPRESIA MITOCHONDRIÁLNYCH KARBOXYLÁZ V NÁDOROVÝCH BUNKOYCH LÍNIACH MOZGU A V ĽUDSKÝCH MOZGOVÝCH NÁDOROV [146](#)

ANDREA HOLÍČKOVÁ, PATRIK PALACKA, JAN ROŠKA, PETER MAKOVICKÝ, MIROSLAVA VALLOVÁ, CSABA BIRÓ, EVELINE ÓRÁSOVÁ, JANA OBERTO VÁ, JOZEF MARDIAK, VLADIMÍRA BRUDEROVÁ, DANA JURKOVIČOVÁ, KAROL KAJO, MIROSLAV CHO VANEC

PROGNOSTICKÝ VÝZNAM EXPRESIE FAKTOROV NUKLEOTIDOVEJ EXCÍZNEJ OPRAVY A TRANSLÉZNEJ SYNTÉZY DNA U PACIENTOV SO SVALOVINU-INFILTRUJÚCIM KARCINÓMOM MOČOVÉHO MECHÚRA [147](#)

DANICA IVOVIČ, JAN ROŠKA, IVANA PETROVÁ, PAVLÍNA KABELÍKOVÁ, SACHIN GULATI, DANA JURKOVIČOVÁ

THE EFFECT OF HYPOXIA AND EPIGENETIC MODULATION ON THE MECHANISMS INVOLVED IN CHEMORESISTANCE OF TESTICULAR TUMORS [149](#)

ZUZANA ORSZÁGHOVÁ, DOMINIKA GÁLIKOVÁ, PETER LEŠKO, JANA OBERTO VÁ, KATARÍNA REJLEKOVÁ, ZUZANA SYČOVÁ-MILÁ, PATRIK PALACKA, KATARÍNA KAĽAVSKÁ, DANIELA SVĚTLOVSKÁ, BEATA MLADOSIEVIČOVÁ, JOZEF MARDIAK, MICHAL MEGO, MICHAL CHO VANEC
CHEMOTERAPIOU INDUKOVANÁ PERIFÉRNA NEUROPATIA (CIPN) AKO PREDIKTOR ZNÍŽENEJ KVALITY ŽIVOTA U PACIENTOV VYLIEČENÝCH Z GERMINATÍVNYCH NÁDOROV TESTIS 150

JAKUB ŠOFRANKO, EDUARD GONDÁŠ, RADOVAN MURÍN
METABOLISM OF EXTRACELLULAR PROTEINS BY BRAIN CANCER CELLS 151

Zoznam súťaži acich v jednotlivých kategóriách

Kategória Študent vysokej školy

Beľa A., Masarovič J., Štefák A.

Kategória Študent vysokej školy - doktorand

Bajtoš M., Blaško F., Blašková G., Barčáková I., Gerčáková K., Gužíková J., Ivovič D., Kabelíková P., Kl'oc D., Komárová J., Lapinová J., Piatriková V., Ševčíková A., Šofranko J., Trnková L., Udvorčková N., Urbanová M., Balážová L., Farská J., Knoško Brožová M., Janoštiaková N., Kodada D., Mečiaková M., Országhová Z., Valuškova Z., Večurkovská I., Švecová M.

Mladý vedecký pracovník s ukončeným PhD. do 35 rokov

Gondáš E., Holíčková A., Klimová D., Slopovský J., Durdík M., Majerník M.

Členovia hodnotiacej komisie pre kategórie Študent vysokej školy a
Mladý vedecký pracovník s ukončeným PhD do 35 rokov

prof. MUDr. Stanislav Špánik, CSc. – predseda komisie
prezident Slovenskej onkologickej spoločnosti, I. Onkologická klinika LF UK a OÚSA,
Bratislava

doc. RNDr. Soňa Čierniková, PhD.
členka Správnej rady Nadácie Výskum Rakoviny

doc. MUDr. Katarína Rejleková, PhD.
vedecký sekretár Národného onkologického ústavu; II. Onkologická klinika LF UK a
NOÚ, Bratislava

Mgr. Andrea Bábelová, PhD.
vedecká pracovníčka a členka Vedeckej rady Biomedicínskeho centra SAV, v.v.i.,
Bratislava

Mgr. Lucia Messingerová, PhD.
vedecká pracovníčka Centra biovied SAV, v.v.i., Bratislava; výskumníčka STU
Bratislava

Mgr. Božena Smolková, PhD.
vedecká pracovníčka a členka Vedeckej rady Biomedicínskeho centra SAV, v.v.i.,
Bratislava

Členovia hodnotiacej komisie pre kategóriu Študent vysokej školy –
doktorand

prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc. – predseda komisie
predseda Odborovej komisie študijného programu onkológia, LF UK; prednosta
I. Onkologickej kliniky LF UK a OÚSA, Bratislava

Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.
členka Správnej rady Nadácie Výskum Rakoviny

MUDr. Mária Rečková, PhD.
riaditeľka Národného onkologického inštitútu, Bratislava

RNDr. Jana Jakubíková, PhD.
vedecká pracovníčka, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Bratislava

doc. RNDr. Zora Lasabová, PhD.
docentka, Univerzita Komenského Bratislava, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Martin

doc. RNDr. Rastislav Jendželovský, PhD.
docent, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta UPJŠ



Členovia hodnotiacich komisií SMO 2024

Vítazi jednotlivých kategórií

Kategória Študent vysokej školy

1. miesto: Andrej Štefák

Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

2. miesto: Jozef Masarovič

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice

3. miesto: Adrián Beľa

Jesseniova lekárska fakulta UK v Bratislave, Martin



Kategória Študent vysokej školy - doktorand

1. miesto: Mgr. Aneta Ševčíková

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

2. miesto: Mgr. Lenka Trnková

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

3. miesto: RNDr. Monika Švecová

Oddelenie lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice



Kategória Mladý výskumník do 35 rokov s ukončeným PhD. štúdiom

1. miesto: Mgr. Matúš Durdík, PhD.

Národný ústav detských chorôb, Lekárska fakulta UK, Bratislava
Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

2. miesto: MUDr. Ján Slopovský, PhD.

II. Onkologická klinika LF UK a NOÚ v Bratislave

3. miesto: Mgr. Daniela Klimová, PhD.

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a FNŠP, Bratislava



Vyhlasenie víťazov Súťaže mladých onkológov 2024 sa uskutočnilo v utorok 12. marca 2024 v priestoroch Vedeckého parku Univerzity Komenského v Bratislave.

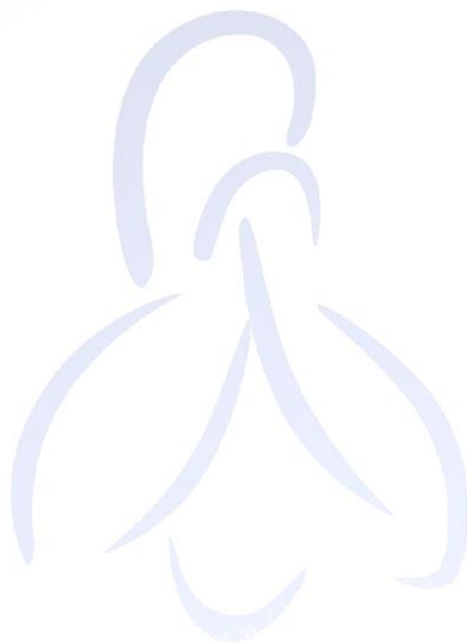
Podujatie SMO 2024 podporili

IMMUNOCORE
MEDISON



SOLEN
MEDICAL EDUCATION

ROZŠÍRENÉ ABSTRAKTY
SÚŤAŽNÝCH PRÁC



PROGNOSTICKÝ VÝZNAM EXPRESIE P53 PROTEÍNU V DIFÚZNYCH VEĽKOBUNKOVÝCH B-LYMFÓMOCH A VYSOKOAGRESÍVNYCH B-BUNKOVÝCH LYMFÓMOCH S DVOJITOU/TROJITOU PRESTAVBOU GÉNOV MYC, BCL2 A/ALEBO BCL6



Andrej Štefák, Katarína Lešková

Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

Úvod

Difúzny veľkobunkový B-lymfóm (DLBCL NOS) a „High grade“ B-bunkový lymfóm s dvojitou/trojitou prestavbou génov *MYC*, *BCL2* a/alebo *BCL6* (HGBL DH/TH) sa radia medzi relatívne časté hematologické malignity prítomné po celom svete. Je dnes známe, že ich biologické správanie je veľmi heterogénne a prognóza pacientov je preto ovplyvnená ďalšími, či už pomerne dobre známymi faktormi, ako napr. vek pacienta, infiltrácia kostnej drene a CNS, expresia proteínov c-myc, bcl2, bcl6, prestavba rovnomených génov *MYC*, *BCL2*, *BCL6* alebo stále skúmanými charakteristikami, kam patrí aj doteraz nejasný význam expresie p53 antigénu v týchto lymfómoch. V našej práci sme sa venovali práve analýze výskytu p53 proteínu a jeho vplyvu na prognózu pacientov s DLBCL a HGBL DH/TH ochorením na Slovensku.

Materiál a metódy

Spoločne bolo analyzovaných 101 vzoriek nádorov pacientov, ktorým bol diagnostikovaný DLBCL NOS a HGBL DH/TH v časovom rozmedzí rokov 2008-2020. Všetky súbory boli vytvárané retrospektívnou analýzou, výberom prípadov z registra vedeného v Konzultačnom centre pre bioptickú diagnostiku ochorení krvotvorby na Slovensku, ktorý v súčasnosti zahŕňa 2 samostatné pracoviská: Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM a Martinské bioptické centrum, s.r.o.

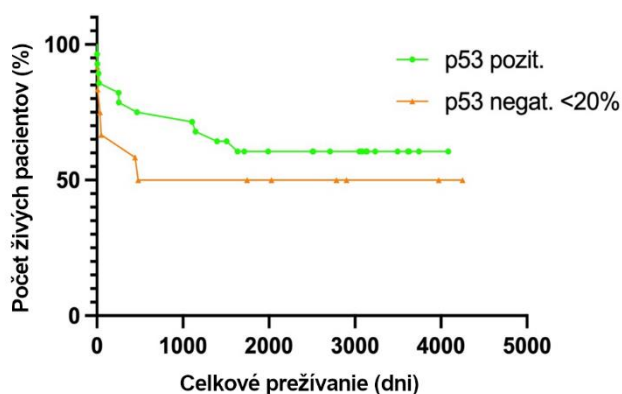
Všetky vzorky boli preskúvané na prítomnosť p53, za pomoci svetelného mikroskopu a roztriedené do skupín podľa percenta pozitívnych buniek. Ako „cut off“ hranica pozitivity/negativity vzorky bola stanovená primárne hranica 20% pozitívnych buniek v preparáte, ktorá bola následne doplnená o analýzy vplyvu iných hraničných limitov- 50% a 80%. Výsledky imunohistochemických vyšetrení p53 boli porovnávané s údajom o celkovom prežívaní (OS) pacientov, a to samostatne v skupine DLBCL NOS aj v skupine HGBL DH/TH pacientov.



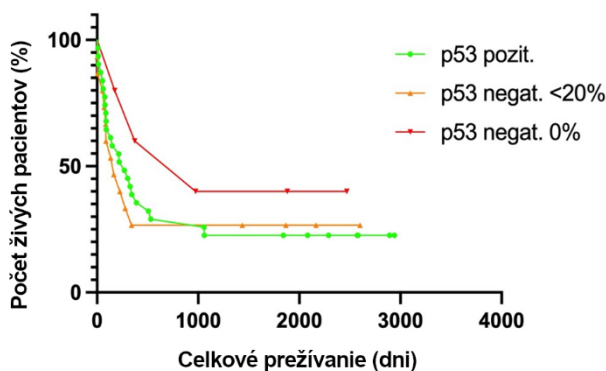
Prípady boli cenzúrované ku dňu 31.12.2023 a štatisticky spracované pomocou softvéru (Prism 10), pričom za štatisticky významný výsledok bola považovaná p-hodnota menšia ako 0,05 (Gehan-Breslow-Wilcoxon test).

Výsledky

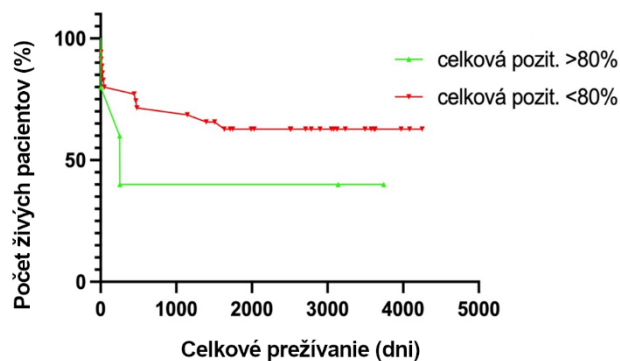
Zo 101 vyhodnotených prípadov spadalo do kategórie DLBCL NOS 44 vzoriek a do kategórie HGBL DH/TH 57 vzoriek. Pri stanovenom „cut off“ 20% bola hodnota p medzi porovnávanými p53 pozitívnymi a p53 negatívnymi DLBCL NOS prípadmi 0,3726, pri HGBL DH/TH bola táto hodnota 0,3070. Pri aplikácii „cut off“ limitu 50% sme nepozorovali významný rozdiel v prežívaní pacientov ani v kategórii DLBCL NOS ($p=0,7509$), ani v kategórii HGBL DH/TH ($p=0,6925$). Hranica 80% však poukázala celkovo na výrazne horšiu prognózu p53 pozitívnych DLBCL NOS oproti p53 negatívnym prípadom ($p=0,1977$), v skupine HGBL DH/TH sme ale tento fenomén nepozorovali ($p=0,9085$). Výsledky analýz sú znázornené pomocou kriviek prežívania na Grafoch 1-3.



Graf 1. Prežívanie p53+ a p53- pacientov s DLBCL (hranica pozitivity 20%)



Graf 2. Prežívanie p53+ a p53- pacientov s HGBL DH/TH (hranica pozitivity 20%)



Graf 3. Prežívanie p53+ a p53- pacientov s DLBCL (hranica pozitivity 80%)

Záver

Naše analýzy nepotvrdili štatisticky významný rozdiel v OS medzi skupinami p53 pozitívnych a p53 negatívnych pacientov pri porovnávaných „cut off“ hraniciach. V štúdiu od Moreno et al. [1] autori uvádzajú štatisticky nesignifikantnú tendenciu k horšiemu celkovému preživaniam u p53+ pacientov s DLBCL v podskupinách non-GCB, GCB a „double expressor“. V slovenskej populačnej vzorke sa ukázala najviac smerodajná hranica 80% a to predovšetkým pre pacientov s DLBCL NOS. Výsledky je potrebné ďalej podporiť väčším súborm prípadov, prípadne korelovať s výsledkami genetických analýz prestavby *TP53* génu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Moreno JCA, Bahmad HF, Aljamal AA, Delgado R, Salami A et al. Prognostic Significance of p53 and p63 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Single-Institution Experience. *Curr Oncol* 2023, 30, 1314–1331. <https://doi.org/10.3390/curroncol30020102>

ŠTÚDIUM ASOCIÁCIÍ MEDZI ČREVNÝM MIKROBIÓMOM A CHEMOREZISTENCIOU V XENOGRAFTOVOM MODELI TESTIKULÁRNYCH NÁDOROV Z GERMINATÍVNYCH BUNIEK



Aneta Ševčíková¹, Viola Števrková¹, Nataliia Nikolaieva¹, Silvia Schmidtová^{1,2}, Natália Udovrková¹, Lucia Rojиковá¹, Silvia Tyčiaková¹, Katarína Kal'avská², Lucia Kučerová², Michal Mego², Soňa Čierniková¹

¹Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Bratislava; ²II. Onkologická klinika a Jednotka translačného výskumu LF UK a NOÚ, Bratislava

Úvod

Testikulárne nádory patria k najčastejším solidným malignitám u mladých mužov. Zo všetkých prípadov, až 98 % tvoria testikulárne nádory zo zárodočných buniek (GCTs), ku ktorým radíme seminómy a neseminómové nádory. Zavedenie chemoterapie na báze cisplatiny prinieslo významný pokrok v liečbe GCTs a radíme ich k najviac chemosenzitívnym a kurabilným solidným malignitám s dlhodobým prežívaním pacientov. Napriek tomu, nízke percento pacientov vykazuje rezistenciu na chemoterapeutickú liečbu [1].

Črevný mikrobióm predstavuje komplexný ekosystém mikroorganizmov, ktorý interaguje s imunitným systémom hostiteľa a ovplyvňuje distálne orgány prostredníctvom produkcie metabolitov a signálnych molekúl. Výsledky z posledného obdobia odhalili, že mikrobióm hrá dôležitú úlohu pri spermatogenéze a správnej funkcii semenníkov. Prepojenie črevného mikrobiómu a semenníkov v rámci osi „mikrobióm-črevo-testis“ je v súčasnosti len minimálne preskúmané a táto oblasť predstavuje významnú vedeckú výzvu do budúcnosti [2]. Čoraz viac údajov z predklinických a klinických štúdií potvrdzuje participáciu mikrobiómu nielen v onkogenéze, ale aj v odpovedi na rôzne liečebné modalitty, najmä chemoterapiu a imunoterapiu [3]. V roku 2017 bol navrhnutý TIMER mechanizmus (translokácia, imunomodulácia, metabolizmus, enzymatická degradácia a znížená diverzita a ekologická variácia), popisujúci účinky vplyvu mikrobiómu na chemoterapiu [4]. Prítomnosť určitých baktérií v črevnom mikroprostredí môže zvýšiť účinnosť liečby, zatiaľ čo nepriaznivé zloženie je asociované so slabou odpoveďou [5, 6]. Preto identifikácia mikrobiálnych markerov a následná modulácia črevného mikrobiómu by mohla dopomôcť k zvýšeniu efektivity liečby a prekonaniu chemorezistencie u refraktérnych pacientov s nádormi testis. Zároveň, obnovenie intestinálnej rovnováhy prispieva k zníženiu toxicity vyvolanej podávaním chemoterapie.

Cieľom naše pilotnej štúdie bola analýza kompozície črevného mikrobiómu v myšacom xenograftovom modeli z GCTs bunkových línií, senzitivných vs.



rezistentných na cisplatinu a kontrolných jedincov, s následnou identifikáciou odlišností v ich mikrobióme.

Materiál a metódy

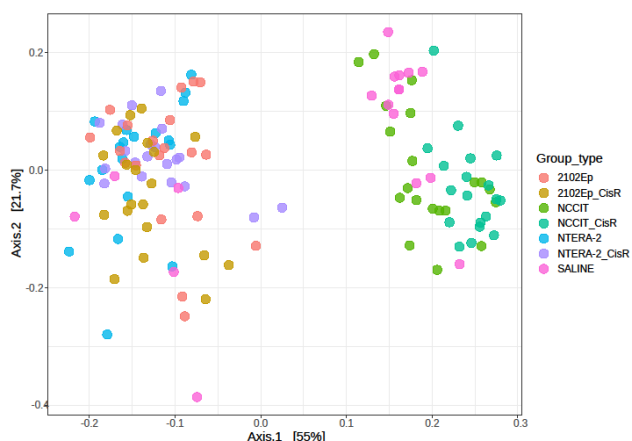
V rámci štúdie sme stanovovali zloženie črevného mikrobiómu v animálnom modeli myši, ktorým boli subkutánne injektované varianty troch typov nádorových bunkových línií odvodených od embryonálneho karcinómu, senzitívnych a rezistentných na cisplatinu (2102Ep, 2102Ep CisR, NCCIT, NCCIT CisR, NTERA-2 alebo NTERA-2 CisR) a kontrolným jedincom, ktorým bol aplikovaný fyziologický roztok. V každej skupine boli 4 samci NOD scid gamma myši vo veku 6-8 týždňov, chovaní v samostatných klietkach, aby sa eliminovali faktory ovplyvňujúce mikrobiálne zloženie. Všetkým jedincom bola odoberaná stolica v týždňových intervaloch po dobu jedného mesiaca, pričom vždy pred aplikáciou nádorovej bunkovej línie sme odobrali aj vzorku bazálneho mikrobiómu. V prvom kroku analýzy sme izolovali mikrobiálnu DNA zo stolice myši pomocou komerčne dostupného kitu Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research) a vyhodnotili kvantitu a kvalitu získanej DNA. Na templáte získanej DNA sme uskutočnili PCR amplifikáciu V4 hypervariabilnej oblasti 16S rRNA génu s použitím primerov s linkerovými sekvenciami CS1 a CS2. Vzniknuté amplikóny boli použité v druhej PCR, pri ktorej boli do vzoriek začlenené unikátne identifikátory tzv. „barcodes“. Výsledné amplikóny boli sekvenované na platforme Illumina MiniSeq, ktorá umožňuje paralelné sekvenovanie viacerých amplikónov na jednom sekvenátore. Analýza dát prebiehala pomocou platformy MicrobiomeAnalyst, vyvinutej s cieľom umožniť komplexné štatistiky, vizualizáciu a funkčnú interpretáciu výstupov mikrobiómovej štúdie.

Výsledky

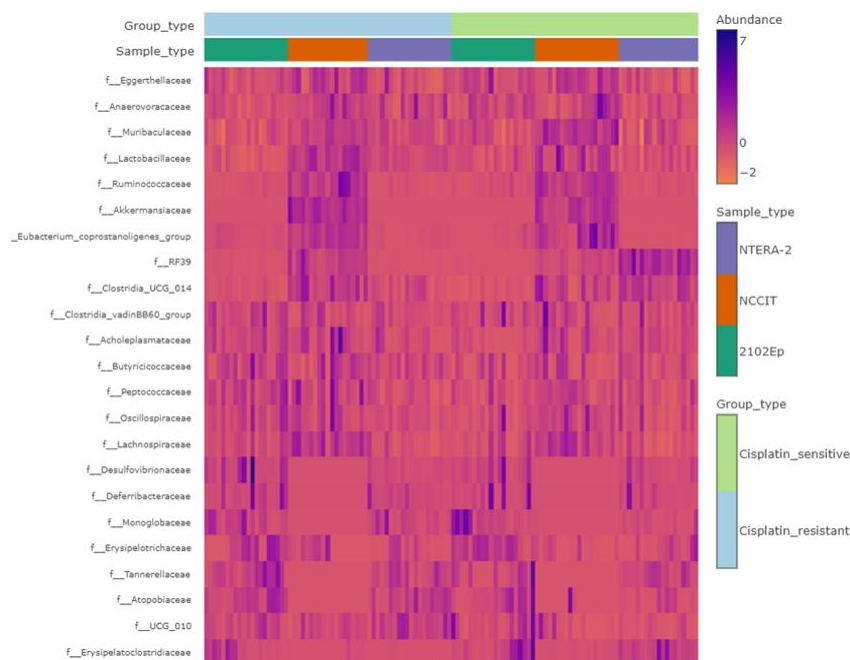
Získané výsledky poukázali na odlišnosti v črevnom mikrobióme zvierat v závislosti od podanej GCTs nádorovej línie. Analýzou črevného mikrobiómu sme odhalili rozdiely v relatívnom zastúpení bakteriálnych čľadí u xenograftov a kontrolných zvierat, ale tiež u senzitívnych vs. rezistentných variantov. Zistili sme, že zástupcovia *Akkermansiaceae* a *Erysipelotrichaceae* mali takmer 4-násobne vyššie zastúpenie u kontrolných zvierat, zatiaľ čo čľade *Bacteroidaceae* a *Tannerellaceae* sa ukázali ako signifikantne vyššie zastúpené u xenograftov. Zaujímavosťou bolo, že v mikrobióme kontrolných zvierat sme nezaznamenali prítomnosť čľade *Monoglobaceae*.

α -diverzita, určujúca mikrobiálnu rozmanitosť v rámci vzorky, bola stanovená Shannon indexom, ktorý popisuje bohatosť a rovnomernosť taxónov vo vzorkách. Jeho priemerné hodnoty vykazovali >2 , čo odzrkadľovalo vyššiu bakteriálnu diverzitu jednotlivých vzoriek. Štatisticky signifikantné rozdiely v α -diverzite sme však nezaznamenali. Na posúdenie β -diverzity, ktorá reprezentuje diverzitu medzi vzorkami, sme uskutočnili PCoA analýzu na základe Bray-Curtis indexu. Z výsledkov sme odhalili podobnú bakteriálnu diverzitu u kontrolných jedincov a myši, ktorým boli aplikované senzitívne a rezistentné varianty NCCIT nádorovej línie (Obrázok 1).

Bohatosť bakteriálnych čeľadí v každej vzorke sme stanovili pomocou teplotnej „heat“ mapy (Obrázok 2). Rozsah farebnej škály vyjadroval relatívne hodnoty zastúpenia taxónov v rámci variantov GCTs línií.



Obrázok 1. Stanovenie β -diverzity u xenograftov s podanými GCTs nádorovými líniami a kontrolných zvierat. PCoA analýza pomocou Bray-Curtis indexu odráža rôznorodosť medzi pozorovanými vzorkami. Vzďialenosť medzi bodmi charakterizuje mieru odlišnosti vzoriek.



Obrázok 2. Teplotná mapa zobrazujúca zastúpenie čeľadí u jednotlivých GCTs nádorových línií. V ľavej časti obrázka sú zaznamenané skupiny myši s podanými rezistentnými nádorovými líniami odvodenými od embryonálneho karcinómu, v poradí 2102Ep CisR, NCCIT CisR a NTERA-2 CisR. V pravej polovici sú znázornené ich senzitivne varianty

Z pozorovaných výsledkov vyplynulo vyššie zastúpenie *Rikenellaceae* a *Lachnospiraceae* UCG.001 u myší s rezistentnými nádormi, zatiaľ čo u myší so senzitívnymi nádormi boli detegované zvýšené hladiny čeľadí *Ruminococcaceae* a *Erysipelatoclostridiaceae*.

Diskusia a závery

V poslednom období sa do popredia onkologického výskumu dostáva štúdium úlohy črevného mikrobiómu. V roku 2022 boli polymorfné mikrobiómy osídľujúce tkanivá, orgány, slizničné povrchy a nádorové mikroprostredie začlenené do konceptu “Hallmarks of Cancer“, ktorý sumarizuje kľúčové spoločné charakteristiky nádorov [7]. Neustále pribúdajúce výsledky štúdií potvrdzujú dôležitú úlohu vybraných mikroorganizmov v iniciácii a progresii onkologických ochorení a tiež v odpovedi na protinádorovú liečbu. Doposiaľ však chýbajú štúdie zamerané na vplyv mikrobiómu pri testikulárnych nádoroch, ktorých liečba je založená predovšetkým na podávaní chemoterapie na báze cisplatiny.

V našej štúdií sme prvýkrát popísali vplyv GCTs na kompozíciu mikrobiómu v animálnom modeli. Získané výsledky poukázali na nižšie zastúpenie čeľade *Rikenellaceae*, konkrétne *Rikenellaceae*_RC9_gut_group u myší so senzitívnymi GCTs v porovnaní so vzorkami od jedincov s rezistentnými nádormi. V nedávnej *in vivo* analýze, Tian a kol., pozorovali dysbiózu črevného mikrobiómu u myší s osteosarkómom liečených cisplatinou. Aj u týchto zvierat došlo k zníženiu zástupcov čeľade *Rikenellaceae* [8]. Hoci doterajšie výskumy popisujúce vzťah medzi črevným mikrobiómom, testikulárnymi nádormi a účinnosťou chemoterapie absentujú, existujúce zistenia pri iných onkologických ochoreniach naznačujú, že nami identifikované mikroorganizmy môžu ovplyvňovať odpoveď na chemoterapiu. Väčšina dostupných výsledkov z *in vivo* a klinických štúdií sa doposiaľ zameriavala na ich úlohu pri odpovedi na imunoterapiu [9, 10].

Záverom môžeme zhrnúť, že naše pozorovania poukázali na vybrané bakteriálne taxóny, ktoré by mohli nájsť uplatnenie ako mikrobiálne biomarkery asociované s odpoveďou na chemoterapeutickú liečbu cisplatinou. Naše pozorovania tak môžu poslúžiť ako základ pre ďalší výskum komplexného vzťahu medzi mikrobiómom, testikulárnymi nádormi a ich liečbou. Nadväzujúce štúdie, zamerané na stratégie modulácie črevného mikrobiómu s cieľom obnoviť priaznivé mikrobiálne zloženie čreva, by mohli prispieť k zvýšeniu efektivity liečby u refraktérnych pacientov s testikulárnymi nádormi a zníženiu poliečebnej toxicity.

Pod'akovanie

Práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou VEGA, čísla projektov 2/0069/22 a 1/0071/24.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, McGlynn KA. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology* 2015; 3: 4–12. <https://doi.org/10.1111/andr.293>
- [2] Cai H, Cao X, Qin D, Liu Y, Liu Y et al. Gut microbiota supports male reproduction via nutrition, immunity, and signaling. *Front Microbiol* 2022; 13: 977574. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.977574>
- [3] Sevcikova A, Izoldova N, Stevurkova V, Kasperova B, Chovanec M et al. The Impact of the Microbiome on Resistance to Cancer Treatment with Chemotherapeutic Agents and Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 488. <https://doi.org/10.3390/ijms23010488>
- [4] Alexander JL, Wilson ID, Teare J, Marchesi JR, Nicholson JK, Kinross JM. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 356–365. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.20>
- [5] Ciernikova S, Sevcikova A, Mladosičevicova B, Mego M. Microbiome in Cancer Development and Treatment. *Microorganisms* 2023; 12: 24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010024>
- [6] Ciernikova S, Sevcikova A, Drgona L, Mego, M. Modulating the gut microbiota by probiotics, prebiotics, postbiotics, and fecal microbiota transplantation: An emerging trend in cancer patient care. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2023; 1878: 188990. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188990>
- [7] Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022; 12: 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- [8] Tian Z, Qiao X, Wang Z, Li X, Pan Y et al. Cisplatin and doxorubicin chemotherapy alters gut microbiota in a murine osteosarcoma model. *Aging* 2024; 16: 1336–1351. <https://doi.org/10.18632/aging.205428>
- [9] Ciernikova S, Sevcikova A, Kasperova B, Drgona L, Mego M. Targeting the Gut Microbiome in Cancer Treatment. In: Rezaei, N. (eds) *Handbook of Cancer and Immunology* In *Handbook of Cancer and Immunology*, Springer International Publishing, Cham. 2022; 1-32. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80962-1_263-1
- [10] Sevcikova A, Mego M, Ciernikova S. Vplyv črevného mikrobiómu na účinnosť imunoterapie u onkologických pacientov. *Onkológia* 2022; 17: 177-183.

OBJASNENIE MECHANIZMOV REZISTENCIE NA CHEMOTERAPIU U POKROČILÉHO KARCINÓMU PRSNÍKA



Lenka Trnková¹, Verona Buociková¹, Monika Buríková¹, Andrea Čumová¹, Jana Plavá¹, Boris Tichý², Svetlana Miklíková¹, Božena Smolková¹, Marína Cihová¹

¹Department of Molecular Oncology, Cancer Research Institute, Biomedical Research Center of the Slovak Academy

of Sciences, Bratislava, Slovakia

²CEITEC-Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Úvod

Rakovina prsníka je najčastejšie diagnostikovaným malígnym ochorením žien a druhou najčastejšou príčinou úmrtí žien na malígne ochorenia. V roku 2023 sa odhadovalo, že rakovina prsníka tvorí 31 % novodiagnostikovaných prípadov rakoviny žien s úmrtnosťou 15 % [1].

Manažment rakoviny prsníka závisí od niekoľkých charakteristík nádoru, akými sú štádium ochorenia, podtyp nádoru, status hormonálnych receptorov (HR), či molekulárne a genetické markery. Terapeutickým cieľom pri včasnom karcinóme prsníka je odstránenie nádoru a prevencia šírenia metastáz. To zabezpečujú lokálne prístupy pozostávajúce z chirurgickej resekcie s následnou pooperačnou rádioterapiou. Okrem toho môže byť využitá systémová neoadjuvantná liečba zabezpečujúca zmenšenie nádoru pred operáciou a adjuvantná liečba, ktorá má za cieľ znížiť riziko recidívy. Terapeutické ciele u pokročilého metastatického karcinómu prsníka zahŕňajú najmä predĺženie prežívania, zníženie toxicity liečby, zmiernenie symptómov a zvýšenie kvality života, čo sa dosahuje vhodne zvolenou systémovou liečbou. Metastatický karcinóm prsníka sa považuje za nevyliciteľné ochorenie, preto sa lokálne terapeutické prístupy využívajú najmä na paliatívne účely [2]. Súčasná systémová liečba rakoviny prsníka zahŕňa endokrinnú terapiu, cieľnú terapiu, chemoterapiu a imunoterapiu. Chemoterapia je často primárnou voľbou u pacientov s triple-negatívnym (TNBC) podtypom rakoviny prsníka, ktorý má kvôli absencii HR a receptoru pre ľudský epidermálny rastový faktor (HER2) len obmedzené možnosti liečby. Zároveň sa chemoterapia využíva aj u pacientov s pokročilým karcinómom prsníka [3].

Hlavným problémom súčasnej liečby je však vznik terapeutickej rezistencie, ktorá znižuje účinnosť terapie a spôsobuje recidívu ochorenia. Jedným z procesov, ktorý významne prispieva k rozvoju rezistencie je epigenetická deregulácia. Nové prístupy využívajúce epigenetické látky alebo kombinujúce epigenetickú a štandardnú terapiu sú preto predmetom predklinického a klinického výskumu [4, 5]. Predložená práca sa venuje pochopeniu mechanizmov rezistencie na chemoterapiu u karcinómu prsníka



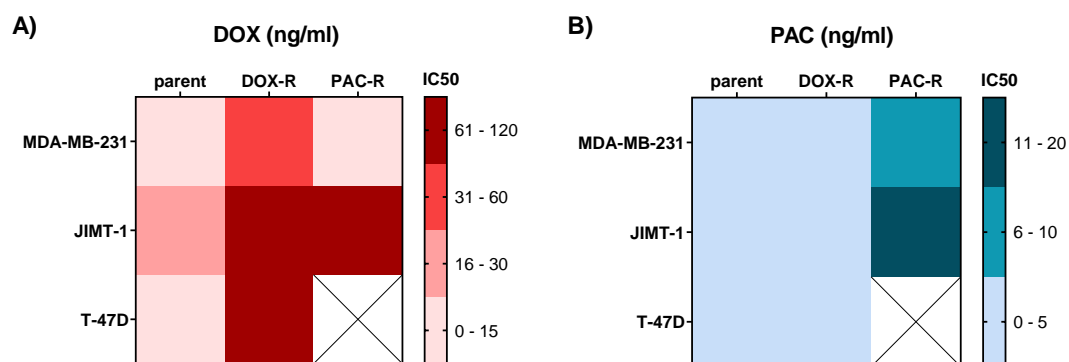
a využití epigenetickej terapie ako potencionalnej strategie na zefektivnenie standardnej terapie.

Materiál a metódy

Na experimenty boli využité bunkové línie troch rôznych podtypov karcinómu prsníka: MDA-MB-231 (TNBC), JIMT-1 (HER2-pozitívny karcinóm) a T-47D (HR-pozitívny karcinóm), z ktorých boli vytvorené línie rezistentné na chemoterapeutické liečivá doxorubicín (DOX) a paklitaxel (PAC). Rezistentné bunkové línie boli vytvorené dlhodobým vystavením senzitivnej (parentálnej) bunkovej línie postupne sa zvyšujúcim koncentráciám chemoterapeutického liečiva. Viabilita buniek po ovplyvnení liečivom DOX, PAC, epigenetickým liečivom decitabínom (DAC) alebo ich kombinácie bola meraná na základe prítomnosti ATP v metabolicky aktívnych bunkách pomocou luminiscencie. Na meranie bunkovej proliferácie bol využitý prístroj IncuCyte ZOOM. Na analýzu génovej expície parentálnych a rezistentných bunkových línií bola využitá RT2 Profiler PCR array detegujúca expresiu 84 génov zapojených do procesov chemoterapeutickej rezistencie. *In vivo* experimenty prebiehali s využitím imunodeficientného kmeňa SCID-beige myši v súlade s platnou legislatívou v autorizovanom zariadení na držanie a chov laboratórnych zvierat.. Pre *in vivo* kombinovanú liečbu boli myšiam ortotopicky injektované MDA-MB-231 parentálne a PAC-rezistentné bunky a myši boli následne štyri týždne liečené buď vehiklom, monoterapiou DAC alebo DOX a kombináciou DAC s DOX. Grafy uvádzané v práci boli vytvorené pomocou GraphPad Prism.

Výsledky a diskusia

Pri vytváraní bunkových línií boli využité postupne sa zvyšujúce koncentrácie chemoterapie DOX (1 – 31 ng/ml) a PAC (1 – 20 ng/ml). Vytvorené bunkové línie vykazovali zníženu senzitivitu na chemoterapeutické liečivá DOX a PAC, čo bolo pozorované na základe zvýšenej hodnoty IC₅₀ pre DOX a PAC u rezistentných nádorových buniek (Obr. 1).



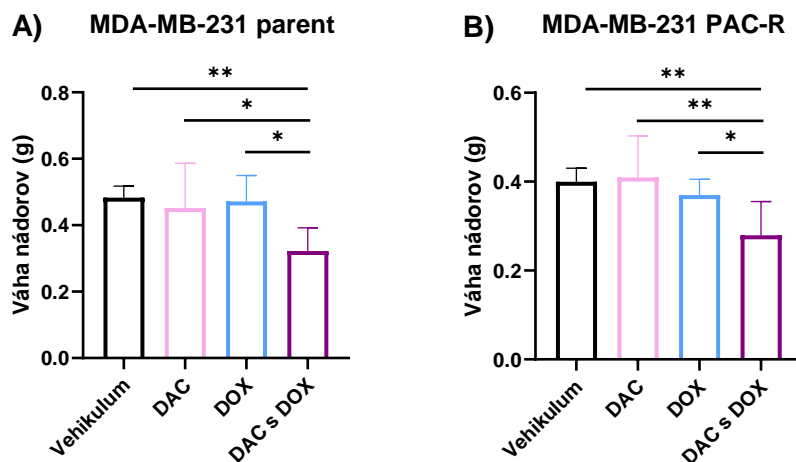
Obrázok 1. IC₅₀ hodnoty pre DOX (A) a PAC (B) u parentálnych (parent), DOX-rezistentných (DOX-R) a PAC-rezistentných (PAC-R) buniek karcinómu prsníka.

MDA-MB-231 PAC-rezistentné bunky vykazovali 4,7-násobné zvýšenie IC50 pre PAC a MDA-MB-231 DOX-rezistentné bunky vykazovali 5,3-násobné zvýšenie IC50 pre DOX v porovnaní s MDA-MB-231 parentálnymi bunkami. JIMT-1 PAC-rezistentné bunky vykazovali 6,3-násobne zvýšenú hodnotu IC50 pre PAC a JIMT-1 DOX-rezistentné bunky vykazovali 5,6-násobne zvýšenú hodnotu IC50 pre DOX v porovnaní s JIMT-1 parentálnou bunkovou líniou. T-47D DOX-rezistentné bunky vykazovali 7,8-násobne zvýšenú IC50 hodnotu pre DOX v porovnaní s T-47D parentálnou bunkovou líniou. Aj napriek násobne zvýšeným IC50 koncentráciám sa však u rezistentných nádorových buniek nepodarilo dosiahnuť hodnoty porovnateľné s plazmatickými koncentraciami pacientov, čo môže predstavovať limitáciu prezentovanej práce.

U rezistentných bunkových línií bola pozorovaná znížená proliferácia v porovnaní s ich parentálnou bunkovou líniou. Analýza génovej expresie preukázala u rezistentných nádorových buniek zmeny v expresii viacerých génov súvisiacich s chemoterapeutickou rezistenciou, vrátane génov pre ABC transportéry, génov NF κ B signálnej dráhy, génov súvisiacich s apoptózou, či génov súvisiacich s metabolizmom liečiv. Parentálne a rezistentné nádorové bunky MDA-MB-231 bunkovej línie boli následne využité pre testovanie efektivity epigenetickej liečby s využitím inhibítora DNA-metyltransferáz DAC. Pri liečbe DAC monoterapiou sa zistilo, že MDA-MB-231 PAC-rezistentné bunky vykazovali 61-násobne zvýšené hodnoty IC50 v porovnaní s parentálnou líniou. DAC je epigenetické liečivo, ktorého efekt na inhibíciu DNA metyltransferáz je výraznejší pri použití jeho nízkych koncentrácií, pričom vo vysokých koncentráciách pôsobí cytotoxicky [6].

Pre *in vitro* kombinovanú liečbu DAC s DOX a DAC s PAC boli preto využité zistené IC20 hodnoty pre DAC. Synergický účinok kombinácie DAC s DOX bol pozorovaný u MDA-MB-231 parentálnej a MDA-MB-231 DOX-rezistentnej bunkovej línie. Synergický účinok kombinácie DAC s PAC bol pozorovaný u MDA-MB-231 parentálnej a MDA-MB-231 PAC-rezistentnej bunkovej línie. Následne bola MDA-MB-231 parentálna a MDA-MB-231 PAC-rezistentná bunková línia využité pre testovanie kombinovanej liečby DAC s DOX v *in vivo* podmienkach. V oboch prípadoch boli u myši liečených kombináciou DAC s DOX pozorované nižšie váhy nádorov než u myši liečených vehikulom alebo DAC a DOX monoterapiou (Obr. 2). To potvrdzuje zvýšenú efektivitu kombinovanej liečby inhibítora DNA metyltransferáz DAC s chemoterapiou.

Synergické účinky kombinácie DAC s DOX boli prednedávnom pozorované aj u JIMT-1 bunkovej línie v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach [7]. Doterajšie výsledky z klinických skúšok však u karcinómu prsníka nepotvrdili zlepšenie efektivity liečby pri využití epigenetickej monoterapie alebo kombinácie epigenetických látok s inými terapeutickými prístupmi (chemoterapia, hormonálna terapia, rádioterapia). Výskum v tejto oblasti je preto naďalej dôležitý pre zlepšenie terapeutických prístupov a optimalizáciu stratégie využitia epigenetických látok na liečbu karcinómu prsníka



Obrázok 2. Monoterapia a kombinovaná liečba DAC s DOX u myši injikovaných MDA-MB-231 parentálnou (A) a PAC-rezistentnou (PAC-R) bunkovou líniou (B).

Záver

V tejto práci sme charakterizovali zmeny vo fenotype a génovej expresii bunkových línií karcinómu prsníka so získanou rezistenciou na chemoterapeutické liečivá DAC a PAC. Tieto zmeny môžu slúžiť ako potencionálne biomarkery chemoterapeutickej rezistencie alebo ciele pre ďalšiu terapiu. Ďalej sme preukázali zvýšenú účinnosť kombinovanej liečby DAC s chemoterapiou u TNBC parentálnej a PAC-rezistentnej bunkovej línie, pričom takáto kombinovaná liečba by mohla byť využitá pre senzibilizáciu nádorov voči chemoterapii. Ďalší výskum v tejto oblasti je však potrebný pre zefektívnenie terapie v klinickej praxi.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená projektami EraCoSysMed RESCUER, VEGA 2/0138/20 a VEGA 2/0067/22. Ďakujeme Genomics Core Facility CEITEC Masarykovej univerzity a Bioinformatics Core Facility CEITEC Masarykovej univerzity v rámci A4L_ACTIONS projektu podporeného z programu Európskej únie Horizont 2020 na základe grantovej zmluvy č. 964997.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023; 73: 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- [2] Swaminathan H, Saravanamurali K, Yadav SA. Extensive review on breast cancer its etiology, progression, prognostic markers, and treatment. *Med Oncol* 2023; 40: 238. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02111-9>

- [3] Chaurasia M, Singh R, Sur S, Flora SJS. A review of FDA approved drugs and their formulations for the treatment of breast cancer. *Front Pharmacol* 2023; 14: 1184472. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1184472>
- [4] Buocikova V, Rios-Mondragon I, Pilalis E, Chatziioannou A, Miklikova S et al. Epigenetics in Breast Cancer Therapy-New Strategies and Future Nanomedicine Perspectives, *Cancers (Basel)* 2023; 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12123622>
- [5] Trnkova L, Buocikova V, Mego M, Cumova A, Burikova M et al. Epigenetic deregulation in breast cancer microenvironment: Implications for tumor progression and therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother* 2024; 174: 116559. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116559>
- [6] Buocikova V, Tyciakova S, Pilalis E, Mastrokalou C, Urbanova M at al. Decitabine-induced DNA methylation-mediated transcriptomic reprogramming in human breast cancer cell lines; the impact of DCK overexpression. *Front Pharmacol* 2022; 13: 991751. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.991751>
- [7] Buocikova V, Longhin EM, Pilalis E, Mastrokalou C, Miklikova S et al. Decitabine potentiates efficacy of doxorubicin in a preclinical trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer models. *Biomed Pharmacother* 2022; 147: 112662. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112662>

FLUORESCENČNÁ METABOLOMIKA: NOVÝ PRÍSTUP K DIAGNOSTIKE ENDOMETRIÁLNEHO KARCINÓMU



Monika Švecová¹, Katarína Dubayová¹, Peter Urdzík²,
Mária Mareková¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v
Košiciach, Lekárska fakulta, Košice, Slovensko

²Gynekologicko-pôrodnická klinika, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika
v Košiciach, Lekárska fakulta a Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura,
Košice, Slovensko

Úvod

Endometriálny karcinóm (EC, Endometrial Carcinoma) je najčastejším nádorovým ochorením ženského reprodukčného traktu vo vyspelých krajinách. Hoci sa EC všeobecne považuje za ochorenie s dobrou prognózou, viac ako 20 % žien s EC na toto ochorenie zomiera, pričom sa predpokladá, že v priebehu niekoľkých nasledujúcich desaťročí sa výskyt signifikantne zvýši [1]. Hlavnou výzvou v boji proti tomuto ochoreniu je jeho včasná diagnostika, ktorá môže výrazne zvýšiť mieru prežitia pacientok. Súčasná diagnostické metódy sú síce efektívne v neskorších štádiách, ale nie sú vhodné na rutinný skrining alebo včasnú diagnostiku. Invazivita vyšetrenia, diskomfort pacientok, či finančné náklady výrazne obmedzujú ich využitie v bežnej prevencii [2].

Fluorescenčná spektroskopia, využívajúca autofluorescenciu biologických tekutín, predstavuje neinvazívnu alternatívu s potenciálom odhaliť včasné patologické zmeny. Táto technika využíva prirodzené fluorescenčné vlastnosti endogénnych fluorofórov, ktoré odrážajú metabolické zmeny spojené s kancerogenezou [3]. Výhodou fluorescenčnej analýzy je schopnosť simultánnej detekcie viacerých metabolitov v biologických tekutinách (krv, moč), čo poskytuje komplexný pohľad na metabolický profil analyzovaného biologického materiálu bez nutnosti invazívneho zásahu do organizmu [4]. Integrácia algoritmov umelej inteligencie (AI, Artificial Intelligence) a strojového učenia pri analýze fluorescenčných dát predstavuje sľubný prístup k automatizácii a štandardizácii tohto diagnostického procesu. Cieľom štúdie bolo preskúmať potenciál aplikácie fluorescenčnej analýzy pri včasnej detekcii EC implementáciou AI.

Materiál a metódy

Fluorescenčná analýza biologických tekutín (krvné sérum a moč) bola realizovaná u gynekologických pacientok s diagnostikovaným EC (n=70) a porovnaná



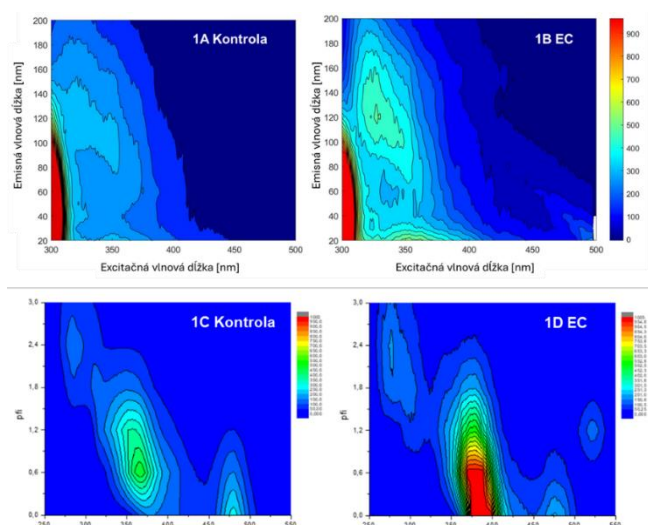
so skupinou zdravých dobrovoľníčok (n=47). Vzorky od pacientok s EC boli odobraté pred operačným zákrokom na Gynekologicko-pôrodnickej klinike UNLP v Košiciach. Kontrolnú skupinu tvorili zdravé dobrovoľníčky, ktoré absolvovali preventívnu gynekologickú prehliadku, mali negatívne nálezy pri USG vyšetrení panvy a subjektívne nepociťovali žiadne ťažkosti.

Synchrónne excitačné spektrá (SES, Synchronous excitation spectra) boli merané pomocou spektrofotometra Perkin Elmer LS 55 (USA) a analyzované softvérom WinLab. Vzorky moču boli analyzované podľa štandardizovaného postupu [5]. Krvné sérum bolo merané v rozmedzí 250-550 nm s postupne sa zvyšujúcim rozdielom vlnových dĺžok v intervale $\Delta\lambda = 30 - 200$ nm, z čoho bola následne vytvorená vrstevnicová mapa (CWM, Constant wavelength matrix). Na analýzu fluorescenčných dát boli implementované 4 algoritmy strojového učenia: logistická regresia (LR, Logistic Regression), rozhodovací strom (RF, Random Forest), metóda podporných vektorov (SVM, Support Vector Machines) a stochastický gradientný zostup (SGD, Stochastic Gradient Descent).

Štatistická analýza bola realizovaná prostredníctvom programu GraphPad Prism verzia 8.0.1, kým analýza strojového učenia prebehla s použitím programovacieho jazyka Python. Každý algoritmus bol natrénovaný na fluorescenčných dátach (70% tréning, 30% validácia), podľa štandardov IFCC (The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) [6]. Štúdia bola realizovaná so súhlasom etickej komisie UNLP v Košiciach aj s informovaným súhlasom všetkých pacientok.

Výsledky

Z nameraných fluorescenčných dát a ich vizualizácie vo forme vrstevnicových matric (CWM) krvného séra ako aj moču je na prvý pohľad vidieť rozdiely medzi kontrolnou skupinou a EC skupinou (Obr. 1).



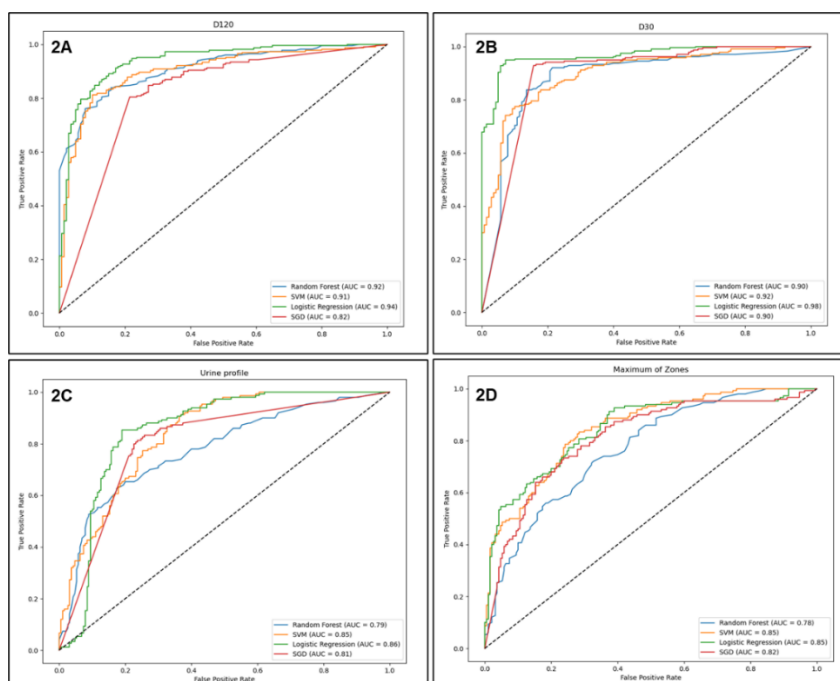
Obrázok 1. Fluorescenčné matrice (CWM). 1A Matrica krvného séra kontrolnej vzorky 1B Matrica krvného séra pacientky s EC 1C Matrica moču kontrolnej vzorky 1D Matrica moču s EC

Pre detailnú analýzu a vyhodnotenie rozdielov v krvnom sére medzi diagnostickými skupinami boli zvolené SES pri $\Delta\lambda = 120$ nm a $\Delta\lambda = 30$ nm. Na základe priebehu týchto spektier boli definované dva fluorescenčné pomery. Pomer R300/330 pri $\Delta\lambda = 120$ nm charakterizujúci pomer fluorescencie tryptofánu a jeho metabolitov k fluorescencii NADH, dosahoval vyššie hodnoty pri kontrolnej skupine. Podobne aj pomer R360/490, charakterizujúci fluorescenčný pomer NADH ku FAD, bol vyšší pri kontrolách ako pri vzorkách s EC. Oba fluorescenčné pomery štatisticky významne rozlíšili tieto skupiny (Mann-Whitneyho test, $p < 0,0001$). Na efektívne rozlíšenie spektrálnych charakteristík ako aj na určenie klinickej relevancie boli použité ROC krivky (Receiver operating characteristic) pre pomery R300/330 a R360/490. Plocha pod krivkou (AUC, Area under the curve) dosiahla hodnoty 88% pre R300/330 a 91% pre R360/490, čo dokazuje významnú separáciu medzi kontrolnými a EC vzorkami. Výsledky všetkých pomerových parametrov sú detailne zaznamenané v Tabuľke 1.

Tabuľka 1. Analýza krvného séra

Pomer	Kontroly Hodnota \pm STD	EC Hodnota \pm STD	ROC (AUC \pm STD)
R300/330	0,98 \pm 0,3	1,60 \pm 0,5	88 \pm 3
R360/490	6,42 \pm 1,3	3,77 \pm 1,3	91 \pm 3

Analýza modelov strojového učenia fluorescenčných dát (séra a moču) potvrdila rozdiely medzi skupinou EC a kontrolnou skupinou na základe citlivosti, špecifickosti a ďalších prediktívnych ukazovateľov (Obr. 2).



Obrázok 2. Modely strojového učenia. 1A Modely vychádzajúce z $\Delta\lambda = 120$ nm krvného séra 1B Modely vychádzajúce z $\Delta\lambda = 30$ nm krvného séra 1C Modely vychádzajúce z profilu moču 1D Modely vychádzajúce z fluorescenčných zón moču

Model logistickej regresie (LR) vykazoval najvyššiu citlivosť 94% a špecificitu 79% vo vzorkách séra, dosahujúc presnosť 88 % a AUC 94%. Tieto hodnoty sú ukazovateľom vysokého diagnostického potenciálu modelu LR pri identifikácii pacientok s EC. Metódy SVM a RF tiež preukázali spoľahlivý výkon, pričom algoritmus SVM vykazoval citlivosť 90% a RF špecificitu 74%. Pozitívna prediktívna hodnota (PPV) týchto modelov sa pohybovala v rozmedzí od 83% do 88%, čo znamená, že tieto modely majú dobrú schopnosť správne identifikovať prítomnosť ochorenia u pacientok, ktoré skutočne majú EC. Negatívna prediktívna hodnota (NPV), ktorá dosiahla najvyššiu hodnotu 89% pre LR, ukazuje vysokú pravdepodobnosť, že pacienti s negatívnym testovacím výsledkom skutočne nemajú ochorenie. Pri modeloch založených na analýze fluorescenčných spektier moču boli hodnoty AUC v rozmedzí od 78% do 86%, čo poukazuje na nižšiu, ale stále signifikantnú schopnosť týchto modelov rozlišovať medzi vzorkami pacientok s EC a kontrolnými vzorkami. Nižšie AUC hodnoty pri moči môžu byť dôsledkom nižšej koncentrácie biomarkerov ako aj väčšou variabilitou metabolitov ovplyvnených inými exogénnymi faktormi (strava, lieky).

Diskusia

Štúdia preukázala výrazné rozdiely v endogénnej fluorescencii vzoriek krvného séra a moču pacientok s EC v porovnaní so zdravými kontrolami. Tieto rozdiely sú spojené so zmeneným metabolizmom tryptofánu a redoxným stavom charakterizovaným pomerom NADH/FAD, čo naznačuje ich potenciálne využitie ako biomarkery pre skorú diagnostiku EC. Fluorescenčné pomery R300/330 a R360/490 štatisticky významne rozlíšili medzi skupinami. Vyššie hodnoty týchto pomerov u zdravých kontrol oproti pacientkam s EC, ako aj publikované údaje z podobných štúdií pri iných onkologických ochoreniach [7], poukazujú na ich robustnosť a diagnostický potenciál. Vysoká hodnota AUC pre tieto pomery potvrdzuje ich diagnostickú hodnotu. Modely ako LR a RF poskytli vynikajúce výsledky pri klasifikácii onkologických a kontrolných vzoriek, s vysokou citlivosťou a špecificitou. Vysoké hodnoty pozitívnych a negatívnych prediktívnych hodnôt (PPV a NPV) u týchto modelov podporujú ich použitie v klinickom prostredí. Na druhej strane, modely SVM a SGD, aj keď sú efektívne, vyžadujú ďalšiu optimalizáciu pre lepšie výsledky v klinickom prostredí. V porovnaní s tradičnou metabolomickou štúdiou, ktorá využívala hmotnostnú spektrometriu, naše výsledky získané strojovým učením fluorescenčných dát ukazujú lepší diagnostický výkon [8].

Záverom, štúdia potvrdila, že kombinácia 3D fluorescenčnej analýzy a pokročilých matematicko-štatistických metód môže poskytnúť nové, spoľahlivé a minimálne invazívne možnosti pre diagnostiku EC. Tento prístup má potenciál tak pre skorú detekciu ochorenia, ako aj pre lepší manažment a prognózu pacientov, čím sa môže zlepšiť kvalita ich života.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Singh N, Hirschowitz L, Zaino R, Alvarado-Cabrero I, Duggan MA et al. Pathologic Prognostic Factors in Endometrial Carcinoma (Other Than Tumor Type and

- Grade). *Int J Gynecol Pathol* 2019; 38: S93. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000524>
- [2] Njoku K, Sutton CJJ, Whetton AD, Crosbie EJ. Metabolomic Biomarkers for Detection, Prognosis and Identifying Recurrence in Endometrial Cancer. *Metabolites* 2020; 10: 314. <https://doi.org/10.3390/metabo10080314>
- [3] Birková A, Valko-Rokytovská M, Hubková B, Zábavníková M, Mareková M. Strong Dependence between Tryptophan-Related Fluorescence of Urine and Malignant Melanoma. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 1884. <https://doi.org/10.3390/ijms22041884>
- [4] Švecová M, Fiedlerová K, Mareková M, Dubayová K. Potential application of body fluids autofluorescence in the non-invasive diagnosis of endometrial cancer. *Klin Onkol* 2024; 37: 102–109. <https://doi.org/10.48095/ccko2024102>
- [5] Dubayová K, Birková A, Lešo M, Žilková J, Karabinoš A et al. Visualization of the composition of the urinary fluorescent metabolome. Why is it important to consider initial urine concentration? *Methods Appl Fluoresc* 2023; 11. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ace512>
- [6] Master SR, Badrick TC, Bietenbeck A, Haymond S. Machine Learning in Laboratory Medicine: Recommendations of the IFCC Working Group. *Clin Chem* 2023; 69: 690–698. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvad055>
- [7] Atif M, AlSalhi MS, Devanesan S, Masilamani V, Farhat K et al. A study for the detection of kidney cancer using fluorescence emission spectra and synchronous fluorescence excitation spectra of blood and urine. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018; 23:40–44. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.012>
- [8] Njoku K, Campbell AE, Geary B, MacKintosh ML, Derbyshire AE et al. Metabolomic Biomarkers for the Detection of Obesity-Driven Endometrial Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 718. <https://doi.org/10.3390/cancers13040718>

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0435/23.

REAKTÍVNE LÁTKY KYSELINY TIOBARBITUROVEJ V PLAZME PREDIKUJÚ PREŽÍVANIE NEPREDLIEČENÝCH PACIENTOV S METASTATICKÝM UROTELOVÝM KARCINÓMOM



Ján Slopovský^{1,2}, Jarmila Kuchárska³, Jana Obertová^{1,2}, Michal Mego^{1,2,4}, Katarína Kalavská^{1,4}, Silvia Cingelova², Daniela Svetlovská^{1,2}, Anna Gvozdjaková³, Samuel Furka⁵, Patrik Palacka^{1,2}

¹II. Onkologická klinika LF UK a NOÚ v Bratislave

²Národný onkologický ústav v Bratislave

³Farmakobiochemické laboratórium 3. Internej kliniky LFUK v Bratislave

⁴Jednotka translačného výskumu, LF UK v Bratislave

⁵Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave

Úvod

Zhubný nádor močového mechúra je najčastejším nádorovým ochorením močových ciest. Väčšina prípadov (90%) sú karcinómy z prechodných buniek [1]. Lipidy sú kľúčové zložky bunkových membrán, nevyhnutné pre stabilizáciu membrán a bunkovú signalizáciu. Produkcia reaktívnych aldehydov pri peroxidácii lipidov ako sú 4-hydroxy-2-nonenal, akroleín a najmä malondialdehyd (MDA), môže spôsobiť poškodenie buniek vytvorením väzieb DNA-DNA alebo DNA-proteín. Tieto väzby môžu viesť k chybám pri replikácii, mutáciám a genomickej nestabilite. MDA, slúži ako spoľahlivý indikátor peroxidácie lipidov v teste TBARS (reaktívne látky kyseliny tiobarbiturovej) [2]. Cieľom tejto prospektívnej štúdie bolo skúmať prognostický význam koncentrácií TBARS meraných pred začiatkom prvej línie chemoterapie u pacientov s MUC. Predpokladali sme, že zvýšené koncentrácie TBARS pred začatím systémovej liečby môžu reflektovať aktivitu choroby a slúžiť ako prognostický marker.

Metódy

Pacienti: táto štúdia bola schválená etickou komisiou Národného onkologického ústavu (NOÚ) v Bratislave a vykonaná v súlade s Helsinskou deklaráciou. Od mája 2010 do apríla 2014 bolo do tejto štúdie po podpísaní informovaného súhlasu prospektívne zaradených 72 pacientov s MUC. Patologické, klinické a rádiologické údaje zbierali lekári do elektronických dátových súborov a ich presnosť bola validovaná pre každého pacienta nezávislým skúšajúcim. Pred zaradením do štúdie museli mať pacienti vhodné renálne, hepatálne funkcie ako aj funkciu kostnej drene. Najčastejším typom



chemoterapie bola cisplatina (70 mg na m² deň 1) a gemcitabín (1000 mg na m² 1. a 8. deň, nový cyklus v deň 22) u 65 pacientov (90 %) a AUC 5 karboplatiny (deň 1) a gemcitabín (1000 mg na m² deň 1. a 8., nový cyklus na 22 deň) u 6 pacientov (8 %). Úpravy dávky boli vykonané podľa toxicity. Charakteristicky pacientov a nádoru sú sumarizované v Tabuľke č. 1.

Tabuľka č. 1: Charakteristiky pacientov a nádoru.

Parameter	počet (%)
Pacienti	72 (100%)
Vek	66 (39-84) #
Muži	57 (79)
Progresia	65 (90)
Úmrtie	64 (89)
Lokalizácia primárneho nádoru:	
močový mechúr	58 (80)
obličková panvička	9 (12,5)
Histologický podtyp:	
urotelový karcinóm	72 (100)
Chemoterapia:	
Gemcitabín/Cisplatina	65 (90)
Gemcitabín/Karboplatina	6 (8)
dávково-denzný MVAC	1 (2)
Výkonnostný stav:	
ECOG ≥ 2	11 (15)
Prítomnosť viscerálnych metastáz:	
pľúca	25 (35)
pečeň	18 (25)
Prežívanie bez progresie (mesiace)	5.42 (0.26-114.54) #
Celkové prežívanie (mesiace)	9.6 (0.26-114.54) #

#Medián (rozsah)

Izolácia plazmy: periférne vzorky krvi (12 ml) boli odobrané od všetkých účastníkov zaradených do tejto štúdie, použitím Vacutainer® EDTA odberových

skúmaviek na krv. Vzorky boli odobrané v deň 0 alebo 1 pred prvou dávkou chemoterapie a následne boli centrifugované, pričom získaná plazma bola zmrazená pri teplote -80°C . Skladované boli maximálne 28 dní. Vzorky plazmy boli ďalej spracované v Farmakobiochemickom laboratóriu kliniky internej kliniky LF UK v Bratislave.

Meranie TBARS: na hodnotenie peroxidácie lipidov sa použil test TBARS (testovacia súprava OxiSelect TBARS). TBARS boli stanovené z plazmy. Stručne, 100 μl plazmy sa zmiešalo s 1 ml 0,67% TBA, 1 ml 20% kyseliny trichlóroctovej a 1,5 ml 0,04% BHT v skúmavkách. Zmesi sa inkubovali vo vriacom vodnom kúpeli počas 20 minút. Po ochladení na izbovú teplotu sa reakčná zmes odstredila pri 4000 g počas 10 minút a absorbancia supernatantu sa merala pri 532 nm UV viditeľného spektra. Koncentrácie TBARS boli vypočítané využitím MDA ako referenčného štandardu [3].

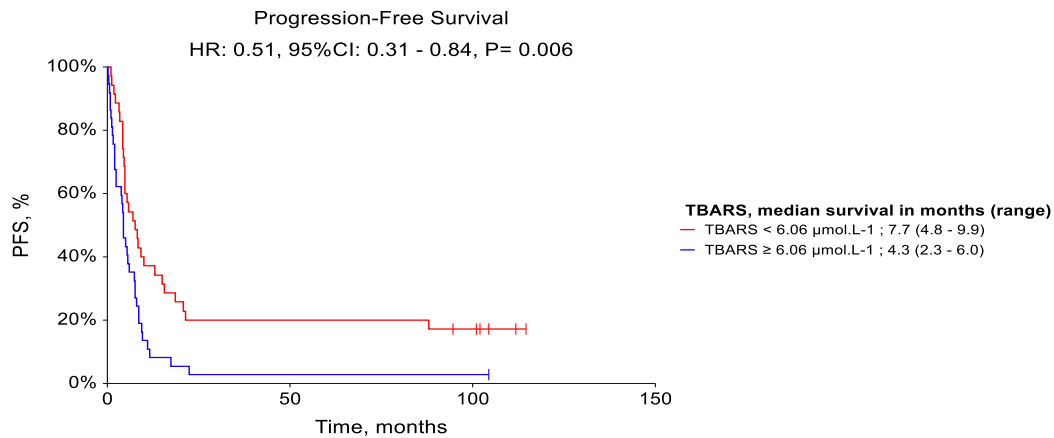
Štatistická analýza: na základe priemeru koncentrácií TBARS $6,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$ boli pacienti rozdelení do skupín s nízkymi $< 6,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($N=35$) a vysokými TBARS ($\geq 6,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $N=37$). Prežívanie bez progresie (PFS) a celkové prežívanie (OS) boli počítané od začiatku podávania chemoterapie do progresie alebo smrti a následne boli vypočítané 95% intervaly spoľahlivosti (CI) Kaplanovou-Meierovou metódou a porovnané log-rank testom. Na zhodnotenie nezávislej prognostickej hodnoty parametrov sa použila multivariačná Coxova analýza proporcionálnych rizík. Na štatistické vyhodnotenie bol použitý softvér NCSS 2019 [4].

Výsledky

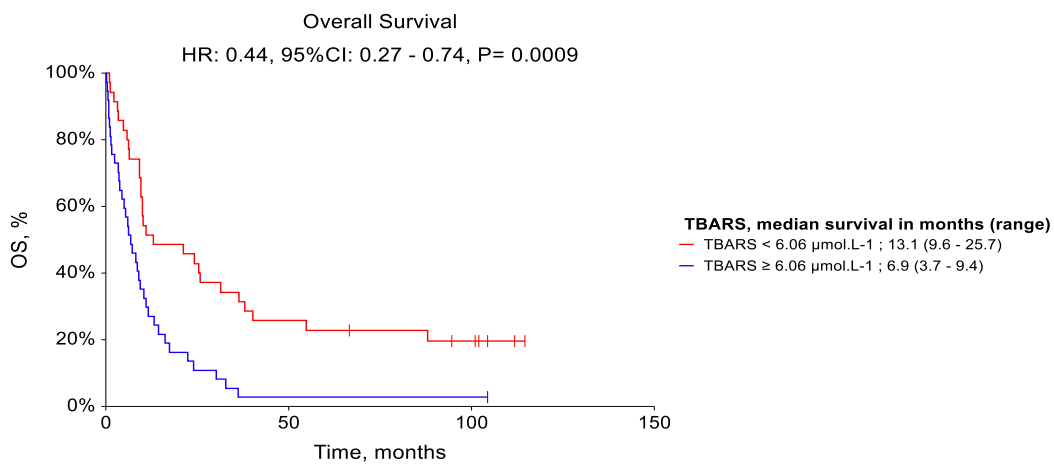
Asociácie medzi TBARS a charakteristikami pacientov/nádoru: pacienti, ktorí rozvinuli ťažkú neutropéniu (stupeň 4) po chemoterapii mali signifikantne nižšie hladiny TBARS v plazme pred začatím liečby ($4,70$ vs. $6,16 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $P= 0,02$). Pacienti s metastázami v pečeni mali signifikantne vyššie koncentrácie TBARS v porovnaní s pacientmi bez metastáz v pečeni ($6,60$ vs. $5,88 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $P= 0,03$). Ďalej sme tiež pozorovali asociáciu medzi vysokým TBARS a vysokým BMI ($7,07$ vs. $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $P=0,02$).

Prognostická hodnota TBARS na PFS a OS: priemerná dĺžka sledovania pacientov bola 9,6 mesiacov. Medián PFS bol 5,42 mesiaca a OS 9,6 mesiacov. Pacienti s koncentraciami TBARS $< 6,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$ mali signifikantne dlhšie PFS (7,7 mesiacov) v porovnaní so 4,3 mesiacmi u pacientov s koncentraciami TBARS nad $6,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (HR 0,51; 95 % CI 0,31-0,84; $P = 0,006$) (Obr. 1).

Štatisticky signifikantne dlhšie OS bolo pozorované u pacientov so zníženými koncentraciami TBARS (HR 0,44, 95 % CI 0,27-0,74; $P = 0,0009$). Konkrétne, medián OS u pacientov s nízkym TBARS bol 13,1 mesiacov oproti 6,9 mesiacov u pacientov s vysokým TBARS (Obr. 2).



Obrázok 1. Vplyv koncentrácií TBARS na prežítvanie bez progresie. Legenda HR: Hazard ratio, TBARS: reaktívne látky kyseliny tiobarbiturovej



Obrázok 2. Vplyv koncentrácií TBARS na celkové prežítvanie. Legenda HR: Hazard ratio, TBARS: reaktívne látky kyseliny tiobarbiturovej

Multivariačná analýza

TBARS a ECOG boli preukázané ako nezávislé prognostické faktory pre OS a PFS. Pre TBARS predstavovalo HR 1.70, (CI 1.00-2.90; 2.00, P=0.04) pre PFS a HR 2.00 (CI 1.16-3.46; P=0.01) pre OS. Pri ECOG bolo HR: 4.42, (CI 2.05-9.52; P=0.0001) pre PFS a HR: 5.78, (CI 2.42-13.84; P=0.0001) pre OS.

Diskusia

Oxidačný stres je spôsobený nerovnováhou medzi pro-oxidačnými a anti-oxidačnými systémami. Reaktívne kyslíkové formy (ROS) môžu narušiť bunkové membrány a spôsobiť peroxidáciu lipidov polynenasýtených mastných kyselín, čo vedie k tvorbe toxických molekúl, ako sú MDA, akorleín a 4-hydroxynonenal [5]. Mierne zvýšené úrovne oxidačného stresu môžu podporovať rast a šírenie nádorov, avšak výrazne zvýšené koncentrácie ROS dokážu usmrtiť nádorové bunky feroptózou [6]. Cisplatina, okrem tvorby krížových väzieb dokáže zvyšovať koncentrácie ROS a tým dopomáhať k usmrcovaniu nádorových buniek [7]. V tejto štúdií nepredliečení pacienti s MUC, ktorí mali vysoké koncentrácie TBARS mali kratšie PFS a OS. Tento výsledok naznačuje, že zvýšené koncentrácie TBARS odrážajú agresívnejšiu povahu ochorenia. Predchádzajúce výskumy potvrdili negatívny prognostický význam prítomnosti viscerálnych metastáz pečene a pľúc. Hoci táto štúdia pozorovala trend smerom k horšej prognóze pacientov s metastázami v pľúcach a pečeni, viscerálne metastázy neboli identifikované ako nezávislý prognostický faktor. Toto môže byť spôsobené malým počtom účastníkov štúdie. Pacienti s ťažkou neutropéniou po chemoterapii mali nižšie úrovne TBARS v plazme pred zahájením systémovej liečby, čo si vysvetľujeme zníženým počtom neutrofilov, ktoré patria medzi hlavných producentov oxidačného stresu. Ďalej sme zistili významnú súvislosť medzi úrovňami TBARS a metastázami pečene. Podľa našich informácií je toto prvá štúdia, ktorá spojila úrovne TBARS s metastázami v pečeni, čo zdôrazňuje ich prognostický význam. Metóda merania TBARS v plazme má však svoje limitácie, najmä kvôli nedostatku špecificity. Faktory ako zvýšený index telesnej hmotnosti (BMI) môžu výsledky skresliť [8]. Hoci sme v tejto práci zaznamenali asociáciu medzi vyšším BMI a zvýšenými úrovňami TBARS multivariačná analýza nepotvrdila efekt BMI na prognostickú hodnotu TBARS.

Záver

Na základe dát získaných v tejto štúdií, nepredliečení pacienti s MUC so zvýšenými koncentraciami TBARS mali signifikantne kratšie PFS aj OS. Stanovenie koncentrácií TBARS pred zahájením prvo-línjovej liečby môže dopomôcť k lepšej prognostickej stratifikácii pacientov s MUC. Ďalej, do úvahy prichádza aj možnosť terapeutického ovplyvnenia oxidačného stresu u pacientov s MUC a tým zlepšeniu účinnosti/zníženiu toxicity liečby na báze platiny.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0614/12 a občianskym združením OncoReSearch. Ďakujeme tiež Mészárosovej K, Duratnej M, Pekovej Z, Šetkovej A za technickú podporu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanneet M, Soerjomataramal I et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- [2] Patel R, Rinker L, Peng J, Chilian WM. Reactive Oxygen Species: The Good and the Bad. In: *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*. InTech 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71547>
- [3] Janero DR, Burghardt B. Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation: Influence of peroxidation conditions. *Lipids* 1989; 24: 125-131. <https://doi.org/10.1007/BF02535249>
- [4] NCSS 2019 Statistical Software. 2019.
- [5] Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* 2012; 137289. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
- [6] Chen Z, Wang W, Abdul Razak SR, Han T, Ahmad NH, Li X. Ferroptosis as a potential target for cancer therapy. *Cell Death Dis* 2023; 14: 460. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05930-w>
- [7] Yu W, Chen Y, Dubrulle J, Stossi F, Putluri V et al. Cisplatin generates oxidative stress which is accompanied by rapid shifts in central carbon metabolism OPEN. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22640-y>
- [8] Aguilar J, De Leon D, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J Vis Exp* 2020; 159: <https://doi.org/10.3791/61122>

ÚLOHA SUBKLINICKÉHO ZÁPALU PRI NÁDOROCH PEČENE



Lea Balážová^{1,3}, Igor Andrašina^{1,3}, Peter Jarčuška^{2,3}, Dominik Šafčák^{1,3}, Michal Mego⁴, Ľobomír Skladaný⁵, Svetlana Adamcová-Selčanová⁵, Miroslav Žigrai⁶, Marek Rác⁷, Radovan Barila⁸

¹Klinika rádioterapie a klinickej onkológie, Východoslovenský onkologický ústav, a.s. Košice, ²II. Interná klinika, Univerzitná nemocnica

L. Pasteura Košice, Košice

³Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

⁴II. Onkologická klinika, Lekárska fakulta Univerzity J.A. Komenského Bratislava a Národný onkologický ústav Bratislava

⁵II. Interná klinika SZU- HEGITO, Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta, Banská Bystrica

⁶I. Interná klinika, Univerzitná nemocnica Bratislava, Bratislava

⁷Interná klinika, Fakultná nemocnica Nitra, Nitra

⁸Onkologický klaster, Nemocnica Penta Hospitals Michalovce, Michalovce

Úvod

Hepatocelulárny karcinóm je nádorové ochorenie so vzrastajúcou incidenciou. Podľa údajov z GLOBOCAN 2020 predstavujú nádory pečene 6. najčastejšie diagnostikované nádorové ochorenie a 3. najčastejšiu príčinu úmrtia na nádorové ochorenie u oboch pohlaví [1]. Hepatocelulárny karcinóm predstavuje 75-85% všetkých diagnostikovaných nádorov pečene. Etiológia HCC súvisí s chronickým ochorením pečene, ktoré vzniká najmä na podklade infekcie hepatitídy B a C (HBV, HCV), chronického užívania alkoholu (ALD) alebo nealkoholovej choroby pečene (NAFLD) [2]. Subklinický zápal zohráva kľúčovú úlohu v patogenéze tohto ochorenia. Kým v 35% prípadov, definovaných ako tzv. „imunitný podtyp“ je HCC priamym dôsledkom chronického zápalového procesu, v prípade tzv. „proliferatívneho podtypu“ predstavuje významnú úlohu v progresii nádorového ochorenia. Kľúčovým mechanizmom je zmena pomeru imunitných buniek v nádorovom mikroprostredí za tzv. „vyhasnutý fenotyp“, charakterizovaný vyšším počtom imunosupresívnych buniek (MSDC, T_{reg}, M2 makrofágov) a poklesom efektorových buniek imunitnej odpovede (CD8+ cytotoxických lymfocytov). Tieto zmeny v nádorovom mikroprostredí sa odrzkadľujú aj v zápalových indexoch z periférnej krvi: NLR (neutrophil to lymphocyte ratio), PLR (platelet to lymphocyte ratio) a SII (systemic immune-inflammation index) [3].

Materiál a metódy

Realizovali sme multicentrickú (8 špecializovaných centier: Banská Bystrica, Bratislava (2), Košice (2), Michalovce, Nitra, a Poprad), retrospektívnu analýzu na Slovensku u pacientov s hepatocelulárnym karcinómom diagnostikovaných v rokoch

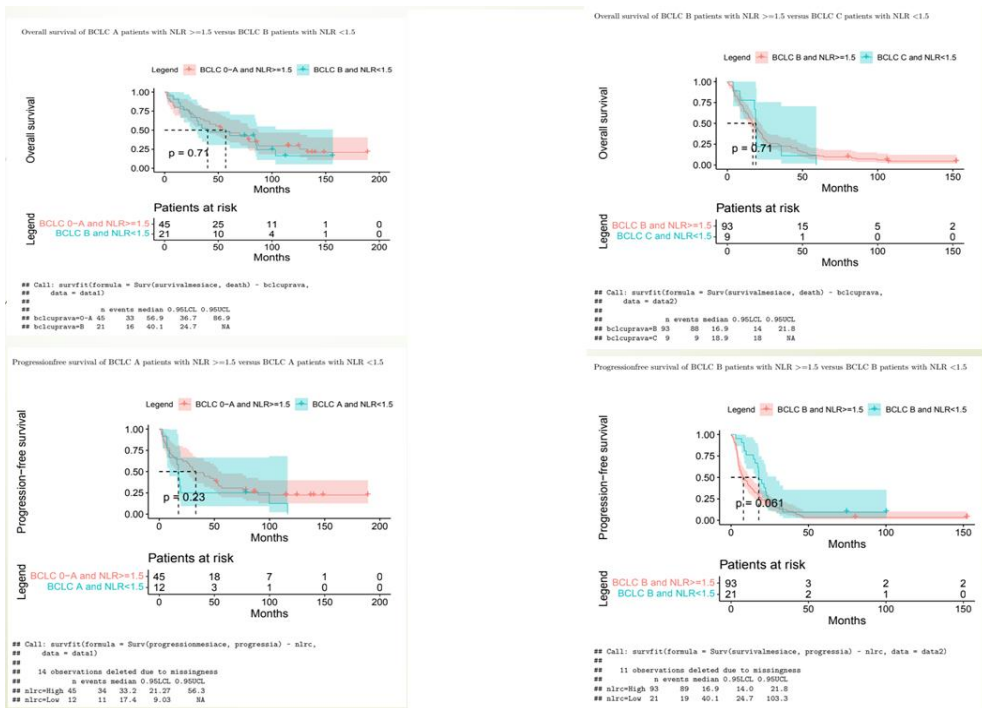


Autorské práva © 2024 Autori

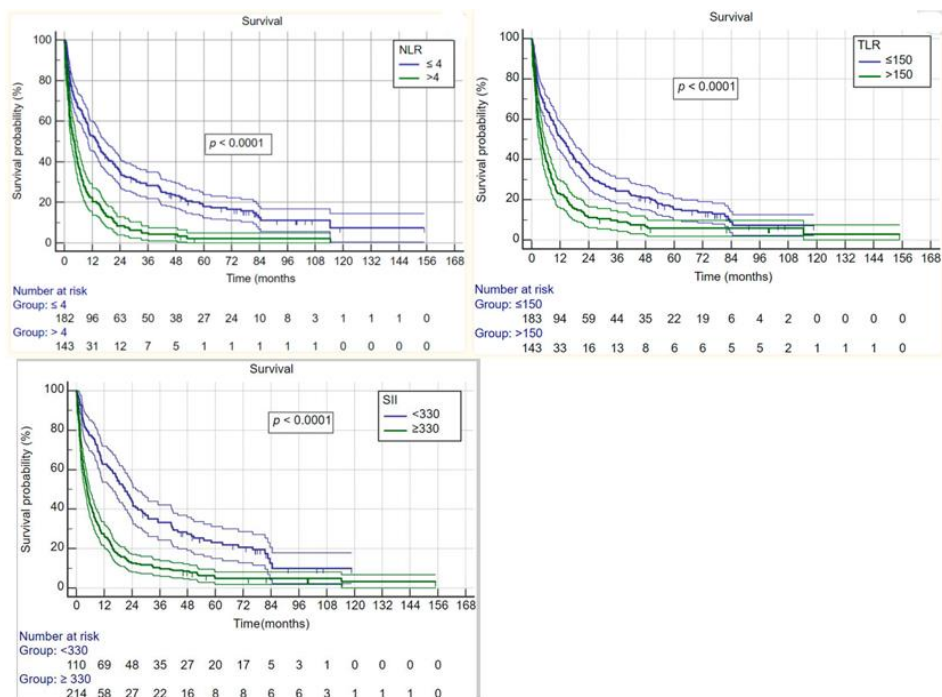
2010-2016. Inklúznym kritériom bola diagnostika HCC podľa EASL-EORTC odporúčaní (HCC potvrdený histopatologickým vyšetrením alebo magnetickou rezonanciou [4]. Exklúzne kritéria boli nasledovné: nejednoznačná histológia, zmiešaná histológia s cholangiocelulárnym karcinómom. Celkový počet subjektov spĺňajúcich inklúzne kritéria bol 483. Zozbierané dáta obsahovali základné krvné testy realizované v čase diagnostiky (krvný obraz a diferenciál, základná biochémia a hemokoagulačné parametre), etiológiu ochorenia pečene, charakteristiky tumoru, metabolickú funkciu pečene, výkonnosť stavu pacienta, komorbiditu, liečebný manažment a jeho efekt. Cirhóza pečene bola diagnostikovaná histopatologicky alebo kombináciou zobrazovacích metód (ultrasonografia, CT, magnetická rezonancia) a laboratórnych parametrov. Na hodnotenie odhadovanej závažnosti cirhózy pečene sme použili Child–Pugh skóre. Výkonnosť stavu pacienta bol hodnotený podľa Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) škály. Na určenie prítomnosti vzdialenej diseminácie ochorenia sme dohľadali výsledok celotelového CT vyšetrenia (hrduník, brucho a malá panva). Na určenie prognózy sme využili Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging system. Podľa zozbieraných laboratórnych parametrov sme vypočítali pomer neutrofilov a lymfocytov (NLR), pomer trombocytov a lymfocytov (PLR), pomer sérovej aspartát aminotransferázy a trombocytov (serum aspartate aminotransferase to platelet ratio index - APRI) a albumin–bilirubin grade (ALBI). Populácia bola stratifikovaná podľa etiológie, pohlavia, veku a BCLC klasifikácie. V štatistickej analýze sú dáta prezentované ako absolútne hodnoty, frekvencie, mediány a interkvartilové rozsahy (IQR). Na porovnanie odlišností kontinuálnych premenných sme využili T-test alebo Mann–Whitney test. K základnému porovnaniu kategorických premenných nám poslužil Pearsonov chi-kvadrát test, Fischerov exaktný test a log-rank test. Grafické zobrazenie prežívania je vyjadrené na Kaplan-Meierových krivkách. Upravené pomery prežívania (HR) boli vytvorené pomocou Coxovej regresnej analýzy. Na znázornenie vzťahu špecificity a senzitivity sme použili ROC analýzu.

Výsledky

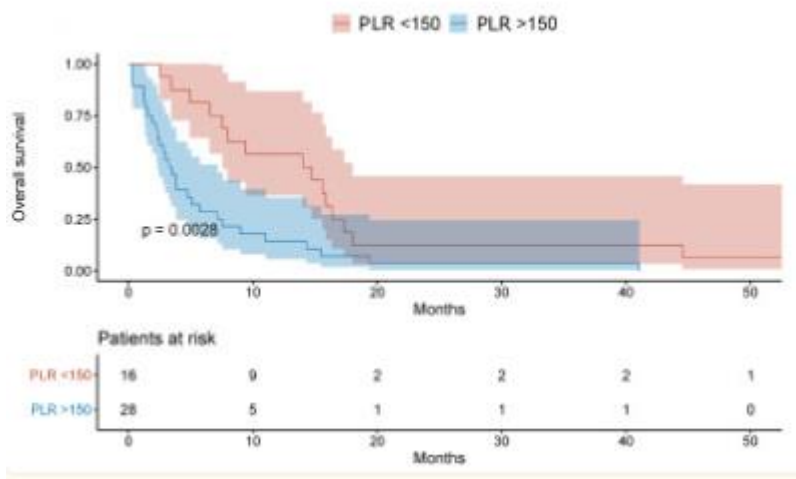
V retrospektívnej analýze 8 centier u pacientov diagnostikovaných v rokoch 2010-2016 vyplynulo, že NLR je efektívnym prognostickým faktorom celkového prežívania u pacientov s HCC vo všetkých štádiách BCLC, pričom NLR index je najsenzitívnejší a najšpecifickejší pri porovnaní cestou ROC analýzy (Obr.1). Pri sledovaní jednotlivých podskupín je možné konštatovať, že u pacientov s HCC na podklade alkoholovej choroby pečene predstavujú NLR >4, PLR >150 a SII \geq 300 významne prognostické faktory celkového prežívania (všetky $p < 0,0001$) (Obr. 2). Pri analýze pacientov s HCC na podklade NAFLD bol PLR >150 efektívnym prognostickým faktorom celkového prežívania ($p=0,0028$) (Obr. 3). Pri hodnotení geriatrickej populácie pacientov s HCC (vek >75 rokov) predstavoval NLR index jediný signifikantný prognostický faktor 3-ročného prežívania pri použití multivariantnej analýzy (OR =5,32, 95% CI: 1,43–28,85).



Obrázok 1. Prežívania pacientov s NLR < 1,5 vs NLR >= 1,5 v rôznych štádiách podľa BCLC- porovnanie cestou ROC analýzy.



Obrázok 2. Kaplan-Meierové krivky prežívania celej kohorty s ALD rozdelené podľa indexov NLR, TLR, SII.



Obrázok 3. Celkové prežívanie pacientov s NAFLD asociovaným HCC stratifikovaných podľa PLR indexu (cut off 150).

Diskusia

Chronický zápal hrá kľúčovú úlohu pri vzniku HCC, jeho progresii a metastázovaní [3]. Nádorové mikroprostredie HCC sa javí byť prevažne imunosupresívne, t.j. cytotoxické lymfocyty v nádorovom mikroprostredí sú inhibované. Na druhej strane, prostredníctvom portálnej vény dochádza ku konštantnému influxu zápalových molekúl (a neutrofilov), ktoré sa zúčastňujú na modulácii aktivity efektorových lymfocytov, čím značne prispievajú k progresii chronického ochorenia pečene a HCC [5]. Progresiu HCC podporujú niekoľkými mechanizmami ako napr.: supresia imunitnej protinádorovej odpovede (inhibičný efekt na T lymfocyty), priama podpora rastu nádorových buniek a podpora remodelácie extracelulárnej matrix [3, 6]. Zo súčasných poznatkov vyplýva, že zvýšený počet cirkulujúcich neutrofilov a najmä vysoká hodnota NLR indexu predstavujú marker zlej prognózy u HCC [7]. Napríklad analýza zo Spojeného kráľovstva z roku 2018, ktorá pozostávala z dvoch kohort pacientov s HCC (celkový počet pacientov 1168) skúmajúca nezávislú prognostickú hodnotu cirkulujúcich zápalových buniek, ukázala, že $NLR \geq 3,15$ bol asociovaný s horšou prognózou (hazard ratio (HR) 0,71; 0,62–0,81; $p < 0,001$) [8]. Rovnako metaanalýza 15 štúdií (celkový počet pacientov 3094) ukázala, že vysoké hodnoty NLR (cut-off hodnoty $NLR > 3$; $NLR > 4$; $NLR > 5$) boli asociované so zlým celkovým prežívaním a prežívaním bez choroby u pacientov s HCC po transplantácii (HR = 3,42, 95% CI: 2,41–4,85, $p = 0,0001$; HR = 5,90, 95% CI: 3,99–8,70; $p = 0,0001$), po resekcii (HR = 3,33, 95% CI: 2,23–4,98, $p = 0,0001$; HR = 2,10, 95% CI: 2,06–2,14), po rádiorekvenčnej ablácii (HR = 1,28, 95% CI: 1,10–1,48; $p = 0,0001$), TACE (HR = 2,52, 95% CI: 1,64–3,86; $p = 0,0001$) a kombinovanej liečbe (HR = 1,85, 95% CI: 1,40–2,44; $p = 0,0001$) [9]. Analýza nášho súboru pacientov potvrdzuje teóriu, že zvýšené hodnoty NLR indexu sú asociované s horšou prognózou pacientov s HCC nezávisle na BCLC a to najmä u pacientov s ALD

(NLR cut-off >4; p < 0,0001) a v geriatrickej populácii (OR = 5,32, 95% CI: 1,43–28,85). Pre jednoznačné potvrdenie tohto tvrdenia sú potrebné ďalšie dáta a to najmä z prospektívnych štúdií, ktoré nám umožnia zaradenie nového prognostického faktora pre HCC v klinickej praxi.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Runggay H, Ferlay J, De Martel C, Georges D, Ibrahim A et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype. *Eur J Cancer* 2022; 161: 108-118. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.11.023>
- [3] Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T., Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol* 2018; 19: 222–232. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0044-z>.
- [4] EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 56: 908-943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
- [5] Geh D, Leslie J, Rumney R, Reeves HL, Bird TG et al. Neutrophils as potential therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2022; 19:257-273. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00568-5>
- [6] Kuang DM, Zhao Q, Wu Y, Peng C, Wang J et al. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2011; 54: 948-955. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.041>
- [7] Hu XG, Mao W, Park YK, Xu WG, Kim BW et al. Blood Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Tumor Recurrence in Patients with Hepatocellular Carcinoma within Milan Criteria after Hepatectomy. *Yonsei Med J* 2016; 57: 1115-1123. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.5.1115>
- [8] Margetts J, Ogle LF, Chan SL, Chan AWH, Chan KCA et al. Neutrophils: driving progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma? *Br J Cancer* 2018; 118: 248-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.386>
- [9] Xiao WK, Chen D, Li SQ, Fu SJ, Peng BG et al. Prognostic significance of neutrophil-lymphocyte ratio in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2014; 14: 117. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-117>

ŠTÚDIUM ÚČINKOV SKYRÍNU AKO PRÍRODNEJ LÁTKY S POTENCIÁLOM V PROTINÁDOROVEJ TERAPII

Ivana Barčáková, Zuzana Jendželovská, Rastislav Jendželovský, Peter Fedoročko

Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice

Úvod

Skyrín (SKR) je prírodný bisantrachinón s málo známou biologickou aktivitou. Príbúdajú však dôkazy o jeho protinádorových účinkoch, medzi ktoré patrí aj nedávna práca nášho pracoviska, v ktorej SKR vykazoval určité antiproliferačné a cytotoxické pôsobenie v bunkách ľudského kolorektálneho karcinómu HCT 116 a HT-29. Pri následnej proteomickej analýze bolo zistené, že v bunkách HCT 116 SKR indukoval expresiu receptora smrti 5 (DR5) [1], známeho aktivátora apoptózy nádorových buniek [2]. Napriek tomu však nie je jasné, akým spôsobom SKR ovplyvňuje nádorové bunky na molekulárno-biologickej úrovni.

Cieľom našej práce bolo teda získať nové poznatky o mechanizme účinku samotného SKR v nádorových bunkách a zhodnotiť jeho potenciál v protinádorovej terapii, či už vo forme monoterapie alebo v kombinácii s vybranými chemoterapeutikami.

Materiál a metódy

Reagencie. Skyrín (HPLC grade), Ko143 (inhibitor transportného proteínu BCRP), cisplatina (CDDP), 5-fluorouracil (5-FU), mitoxantrón (MTX), doxorubicín (DOX).

Bunkové línie. V experimentoch boli použité bunkové línie ľudského kolorektálneho karcinómu HT-29, HCT 116 a od nej odvodená bunková línia HCT 116 p53^{-/-}. Ďalej bola použitá ľudská leukemická bunková línia HL-60 a od nej odvodená bunková línia cBCRP. Tiež boli využité bunky ľudskej fibroblastovej línie CCD-18Co odvodenej od zdravého tkaniva hrubého čreva. Bunky HCT 116 a HCT 116 p53^{-/-} boli kultivované v kompletnom médiu McCoy's obohatenom o 10 % FBS, bunky HT-29, HL-60 a cBCRP boli kultivované v kompletnom médiu RPMI 1640 s prídavkom 15 % alebo 20 % FBS a bunky CCD-18Co boli kultivované v kompletnom médiu MEM obohatenom o 10 % FBS v inkubátore pri teplote 37°C, vlhkosti 95 % a 5 % CO₂ v atmosfére. Všetky kultivačné médiá obsahovali komerčnú zmes antibiotík a antimykotík a gentamicín (50 µg/ml).

Western blot. Bunky boli inkubované so SKR (10 µM) alebo DMSO (s koncentráciou zodpovedajúcou DMSO v skupinách ovplyvnených SKR). Bunky boli



zozbierané po 1, 6 a 24 h s využitím lyzačného roztoku obohateného o komerčnú zmes inhibítorov proteáz a fosfatáz. Po 40 µg proteínov z každej vzorky bolo separovaných pomocou 10 % alebo 15 % SDS-PAGE gélu a prenesených na PVDF membrány. Po vyblokovaní boli membrány inkubované s príslušnou primárnou protilátkou cez noc pri 4°C a následne k nim boli pridané príslušné sekundárne protilátky konjugované s chrenovou peroxidázou. Imunodetekcia reaktivity protilátok bola uskutočnená pomocou komerčného chemiluminiscenčného kitu na RTG film. Denzitometria detegovaných proteínov bola vyhodnotená pomocou programu ImageJ, pričom relatívna hladina proteínov bola normalizovaná k relatívnej hladine β-aktínu príslušnej experimentálnej skupiny.

Test metabolickej aktivity buniek (MTT test). Bunky HT-29 boli vystavené pôsobeniu Ko143 (1, 20 alebo 50 µM) po dobu 30 min a následne k nim bol pridaný SKR (10 µM). V ďalších experimentoch boli bunky HCT 116, HCT 116 p53^{-/-}, HT-29 a CCD-18Co predinkubované so SKR (10 µM) po dobu 24 h a následne k nim boli pridané chemoterapeutiká (10 µM CDDP; 10 µM 5-FU; 0,1 µM MTX; 0,05 µM DOX). Kombinovaný účinok bol analyzovaný v dvoch časových intervaloch (24 h a 48 h) pridaním MTT (0,5 mg/ml), ktoré je živými, resp. metabolicky aktívnymi bunkami metabolizované na kryštály formazánu. Metabolizácia MTT bola zastavená po 4 h pridaním 10 % SDS a absorbancia formazánu bola odmeraná nasledujúci deň pri vlnovej dĺžke $\lambda = 584$ nm.

Intracelulárna akumulácia SKR. Bunky boli predinkubované s Ko143 (20 µM) 30 min a následne k nim bol pridaný SKR (10 µM). Po 24 h boli bunky premyté v PBS a resuspendované v HBSS. Intenzita fluorescence SKR bola detegovaná prietokovým cytometrom BD FACSAria II SORP v kanáli PE-Cy7 (750LP – 780/60). Intracelulárny obsah SKR bol vyjadrený ako pomer relatívnej fluorescence (RF) buniek ovplyvnených kombinovaným zásahom (Ko143 + SKR) vynásobenej RF neovplyvnených buniek voči násobku RF samotného Ko143 a SKR.

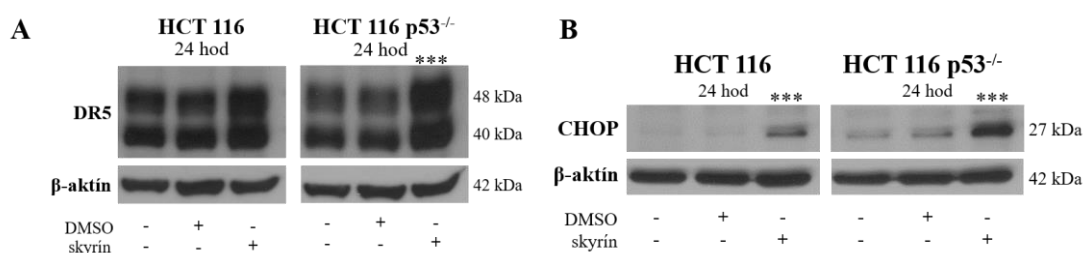
Analýza tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Bunky boli po 24 h a 48 h inkubácii so SKR (10 µM) premyté v PBS, resuspendované v HBSS a následne k nim bol pridaný DHR-123 (0,1 µM). Po 15 min inkubácii pri 37°C a 5 % CO₂ bola fluorescencia detegovaná prostredníctvom prietokového cytometra v kanáli FITC (505 nm LP DM, 525/50 BP) po excitácii modrým laserom (488 nm). Ako pozitívna kontrola boli využité bunky ovplyvnené peroxidom vodíka (0,05 %).

Štatistická analýza. Štatistická významnosť bola stanovená pomocou analýzy variancie (ANOVA) doplnenej o Tukey post-test. Všetky experimenty boli realizované v minimálne troch nezávislých opakovaniach.

Výsledky a diskusia

S cieľom objasniť mechanizmy účinku SKR sme v prvom rade upriamili našu pozornosť na nádorový supresorový proteín p53, pretože v našich predošlých experimentoch bolo pôsobenie SKR (indukcia apoptózy a DR5) výraznejšie v bunkách s normálnym p53 (wt p53) [1]. Zamerali sme sa na identifikáciu transkripčného faktora (TF) zodpovedného za indukciu DR5 sprostredkovanú SKR, a to analýzou vplyvu SKR na hladinu DR5 a jeho troch známych transkripčných aktivátorov (p53, Sp1 a CHOP)

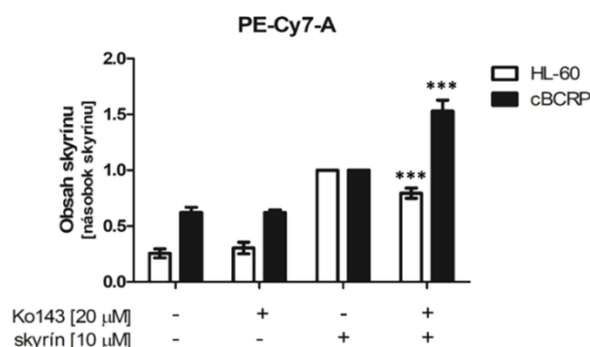
v bunkových líniiach s rôznym p53 statusom. V bunkách HT-29 s nefunkčným p53 nedošlo k žiadnym zmenám v hladinách proteínov. Zistili sme však, že k určitému nárastu hladiny DR5 došlo v oboch bunkových líniiach HCT 116, no prekvapivo, štatisticky významný bol len v bunkách bez p53 (Obr. 1A). Navyše v bunkách s wt p53 nedošlo k zmenám v hladine jeho celkovej ani fosforylovanej formy. Z týchto výsledkov vyplýva, že p53 nie je zodpovedný za SKR indukovanú expresiu DR5. Na druhej strane sme v jednom prípade detegovali nárast hladiny Sp1 a v oboch spomenutých bunkových líniiach aj zvýšenie expresie CHOP (Obr. 1B), pričom práve CHOP sa v tomto prípade javí byť hlavným regulátorom expresie DR5. Tento predpoklad podporujú aj výsledky jednej práce, v ktorej emodín, látka štruktúrne podobná SKR, indukoval DR5 prostredníctvom tohto TF [3]. Zapojenie CHOP, prípadne Sp1, do indukcie DR5 SKR bude potrebné potvrdiť ďalšími experimentami.



Obrázok 1. Vplyv skyrínu na mieru expresie receptora DR5 (A) a jeho transkripčného faktora CHOP (B) v bunkách HCT 116 a HCT 116 p53^{-/-}. Reprezentatívne obrázky z minimálne troch nezávislých experimentov. Štatistická signifikancia je vyjadrená ako $p < 0,001$.

Alternatívnym vysvetlením odlišného pôsobenia SKR v bunkách HCT 116 a HT-29 môže byť rozdielna miera expresie transportného proteínu BCRP. V bunkách HT-29, ktoré sa vyznačujú vysokou mierou bazálnej expresie BCRP, by tento proteín mohol byť zodpovedný za „eflux“ SKR von z buniek, čím by došlo k potlačeniu jeho účinku. Tento predpoklad je založený aj na štruktúrnej podobnosti SKR a hypericínu, známeho substrátu BCRP [4].

V prvom rade sme analyzovali možnosť modulácie celkovej hladiny BCRP SKR, avšak žiadne zmeny sme nezaznamenali. Následne sme teda študovali aktivitu BCRP s využitím jeho špecifického inhibítora Ko143. Na MTT testoch sa ukázalo, že inhibítor skutočne zvyšoval citlivosť buniek HT-29 voči pôsobeniu SKR, ale pri analýze intracelulárnej akumulácie SKR sme vplyv inhibítora nezaznamenali. To by mohlo byť vysvetlené vysokou mierou autofluorescencie samotného inhibítora, ktorá skreslila výsledok. S cieľom maximálne zredukovať tento efekt inhibítora sme teda využili iný experimentálny model, konkrétne leukemické bunky HL-60 s prirodzene nízkou hladinou BCRP a od nich odvodenú bunkovú líniu cBCRP, ktorá nadmerne exprimuje tento transportér. V bunkách cBCRP došlo vplyvom inhibítora BCRP k značnému nárastu intracelulárnej hladiny SKR, zatiaľ čo schopnosť akumulovať SKR bunkami HL-60 nebola inhibítorom ovplyvnená (Obr. 2). Na základe týchto výsledkov teda môžeme SKR zaradiť medzi nové potenciálne substráty BCRP.



Obrázok 2. Vplyv inhibítora BCRP Ko143 na mieru intracelulárnej akumulácie skyrínu v bunkách HL-60 a cBCRP. Údaje sú prezentované ako priemer \pm SD z minimálne troch nezávislých opakovaní. Štatistická signifikancia je vyjadrená ako $p < 0,001$.

Ako jeden z možných mechanizmov účinku SKR sa uvádza tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS) [5], ktorá je okrem iného spájaná aj s indukciou expície CHOP [3]. Stanovenie intracelulárnej hladiny ROS vo všetkých troch kolorektálnych bunkových líniiach však odhalilo značnú antioxidačnú aktivitu SKR, ktorá by mohla mať význam najmä v chemoprevenii nádorových ochorení.

Uvedené výsledky nás napokon viedli k úvahe, či by SKR mohol vykazovať pozitívny alebo negatívny vplyv na účinnosť konvenčných protinádorových liečiv. Študovali sme teda efekt kombinovaného zásahu SKR so štyrmi vybranými chemoterapeutikami (CDDP, 5-FU, MTX, DOX) v nádorových, ale aj v zdravých ľudských bunkách. Zistili sme, že SKR mal odlišný vplyv na účinnosť chemoterapeutík v závislosti od použitého liečiva, typu nádorových buniek aj ich p53 statusu. Za najvýznamnejší výsledok môžeme považovať zvýšenie účinnosti 5-FU v bunkách HCT 116, pričom SKR vykazoval určitý pozitívny efekt aj v prípade buniek HT-29 (CDDP, 5-FU, DOX). Zaznamenali sme však aj opačný účinok SKR. Účinnosť CDDP potlačil v oboch bunkových líniiach HCT 116, pričom v bunkách bez p53 negatívne vplýval aj na efektivitu MTX a DOX. Veľmi zaujímavé však bolo, že SKR dokázal veľmi efektívne chrániť zdravé bunky pred toxickým účinkom všetkých použitých chemoterapeutík. Tieto výsledky však bude potrebné potvrdiť analýzami zameranými na detekciu bunkovej smrti či proliferačnú aktivitu buniek. Naše výsledky poukazujú na to, že SKR by mohol patriť medzi relatívne bezpečné látky s protinádorovým potenciálom. V kombinovanej terapii by mohol zvyšovať citlivosť nádorových buniek voči niektorým typom liečiv a súčasne zabrániť nešpecifickej toxicite liečiva voči zdravým bunkám.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0003/23.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Babinčák M, Jendželovský R, Košuth J, Majerník M, Vargová J et al. Death Receptor 5 (TNFRSF10B) Is Upregulated and TRAIL Resistance Is Reversed in Hypoxia and Normoxia in Colorectal Cancer Cell Lines after Treatment with Skyrin, the Active Metabolite of *Hypericum* spp. *Cancers* 2021; 13: 1646. <https://doi.org/10.3390/cancers13071646>
- [2] Kretz AL, Trauzold A, Hillenbrand A, Knippschild U, Henne-Bruns D et al. TRAILblazing Strategies for Cancer Treatment. *Cancers* 2019; 11: 456. <https://doi.org/10.3390/cancers11040456>
- [3] Subramaniam A, Loo SY, Rajendran P, Manu AK, Perumal E et al. An anthraquinone derivative, emodin sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL induced apoptosis through the induction of death receptors and downregulation of cell survival proteins. *Apoptosis* 2013; 18: 1175-1187. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0851-5>
- [4] Jendželovský R, Jendželovská Z, Kuchárová B, Fedoročko P. Breast cancer resistance protein is the enemy of hypericin accumulation and toxicity of hypericin-mediated photodynamic therapy. *Biomed Pharmacother.* 2019; 109: 2173-2181. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.084>
- [5] Koul M, Meena S, Kumar A, Sharma PR, Singamaneni V et al. Secondary Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium pinophilum* Induce ROS-Mediated Apoptosis through Mitochondrial Pathway in Pancreatic Cancer Cells *Planta Med* 2016; 82: 344-355. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558308>

VÝZNAM NERVOVÝCH VLÁKIEN PRI NÁDOROVÝCH CHOROBÁCH



Filip Blaško^{1,2}, Miroslav Tibenský³, Lucia Krivošíková⁴,
Pavel Babál⁴, Boris Mravec^{1,2}

¹Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

²Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i.

³Inštitút pre klinický a translačný výskum, Biomedicínske centrum, SAV, v.v.i.

⁴Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Nervový systém môže ovplyvňovať progresiu nádorov pomocou sympatikových, parasympatikových a senzitivných nervov inervujúcich nádory [1]. Z nervových zakončení v nádoroch sú uvoľňované neurotransmitery, ktoré po väzbe na receptory nádorových buniek, aktivujú signálne dráhy podporujúce rast nádoru [2]. Na význam nervových vlákien pri nádoroch poukazujú aj zistenia, že nádorové bunky môžu produkovať a vylučovať neurotrofné faktory (napr. nervový rastový faktor – NGF, mozgový neurotrofný faktor – BDNF) a molekuly navigujúce axóny, následkom čoho je stimulované vrastanie nervových vlákien do nádorov – neoaxogenéza [3]. V súvislosti s nádorovou inerváciou je za významný diagnostický a prognostický faktor považovaná hustota inervácie nádorového tkaniva, ktorej vyššia hodnota je spájaná s horšou prognózou onkologických pacientov [1, 2]. Tento predpoklad podporujú zistenia, že prístupy redukujúce vplyv nervov na nádory (napr. denervácia, podávanie antagonistov receptorov, podávanie lokálnych anestetík či protilátok proti neurotrofným faktorom) vedú k spomaleniu rastu nádorov.

Preto sme sledovali: a) vplyv topickej aplikácie lokálneho anestetika Pliaglis (7% lidokaín, 7% tetrakaín) na rast experimentálneho melanómu; b) génovú expresiu β -adrenergických receptorov (B-AR), NGF a BDNF v myšiacích nádoroch prsníka a kolorekta; c) hustotu, fenotyp inervácie a proliferačnú aktivitu nervov v ľudskom nádore prostaty.

Materiál a metódy

Vplyv podávania lokálneho anestetika Pliaglis na rast experimentálneho melanómu. Použili sme 56 samcov myši C57/BL/6J (Charles River, Nemecko), ktorým bola intradermálne podaná B16F0 melanómová línia v množstve 3×10^5 buniek v 30 μ l PBS. Lokálne anestetikum Pliaglis, obsahujúce 7% lidokaín a 7% tetrakaín (Crescita Therapeutics, Kanada), bolo podávané 2x denne priamo na povrch melanómov



u neliečených myší (myší bez liečby, myší s nádormi potieranými vehikulom) a myší súčasne liečených RMP1-14 (Rat IgG2a) anti-PD-1 protilátkou (BioXCell, USA) (podanou intraperitoneálne 8., 11. a 14. deň experimentu v množstve 250 µg/injekciu). Experiment prebiehal 18 dní, podávanie terapeutík začalo 8. deň a bol ukončený usmrtením zvierat dekapitáciou. Následne sa odobrali a zvážili melanómy pomocou elektronických váh a vyhodnotili rozdiely v hmotnosti melanómov.

Génová expresia B-AR (β_1 - β_3), NGF a BDNF v myšiacich nádoroch prsníka a kolorekta. Použili sme subkutánne indukované nádory prsníka (4T1 mamárna línia v množstve 2×10^4) a kolorekta (HT-29 kolorektálna línia v množstve $2,5 \times 10^5$) u samíc myší kmeňa BALB/c (Charles River, Nemecko). Zo vzoriek nádorov a kontrolných tkanív (prsna žľaza, hrubé črevo) bola vyizolovaná RNA pomocou TRI Reagentu RT (Molecular Research Center, Inc., USA) podľa protokolu výrobcu. Celková RNA (1000 ng) bola následne reverzne transkribovaná do cDNA pomocou oligo (dT)18 primeru a *RevertAid H minus First Strand cDNA synthesis* kitu (Thermo Fisher Scientific, USA) podľa protokolu výrobcu. Génové expresie boli stanovené pomocou *Real-Time* PCR na 96-jamkovej platničke v termocykléri *QuantStudio™ 5* (Applied Biosystems, USA) s reakčným objemom 25 µl. Referenčným génom bol gén pre GAPDH a pomerné zmeny v expresii sa hodnotili Livakovou metódou $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

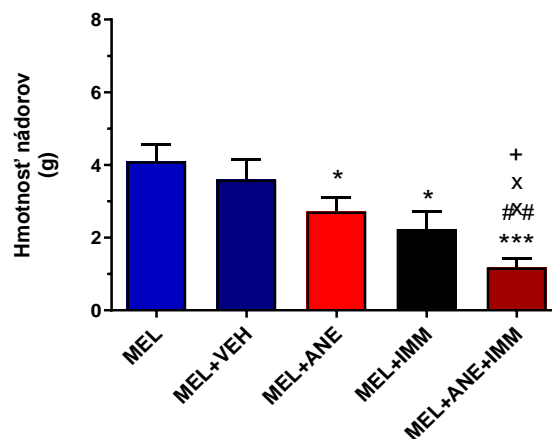
Hustota inervácie, fenotyp nervových vlákien a proliferačná aktivita nervov. Použili sme ľudské tkanivá prostaty – CON (n=36), benígne hyperplázie prostaty – BH (n=28) a nádory prostaty – PCa (n=44) z Ústavu patologickej anatómie LF UK. Tkanivá sa fixovali v 10% formalíne (Merck, Nemecko) a zaliali do parafínu. Z parafínových bločkov sa pripravili rezy s hrúbkou 4 µm. Pre imunohistochemie boli rezy tkanív zbavené parafínu, a následne boli antigénové epitopy demaskované v 10 mmol/l citrátového pufru (pH 6) pri teplote 96°C po dobu 30 min v Dako PT-Link (Dako, Dánsko). *Hustota nervov* sa hodnotila histomorfometrickým meraním nervovej plochy (S100 expresie) v 4 mikroskopických poliach každej vzorky pri zväčšení 10x pomocou programu ImageJ 2.14.0. Pomocou H&E DAB vektora sa vyseletovala červená farba a vypočítala celková nervová plocha (%) podielom červenej farby (S100 expresie) a celkovej plochy obrázka vynásobená 100. *Fenotyp nervových vlákien* bol určený pomocou kombinácie primárnych protilátok proti neuronálnym markerom – PGP9.5 (1:500; Abcam, Spojené kráľovstvo), S100 (1:800), a proti špecifickým markerom nervov – TH (1:1000; Merck, Nemecko) pre detekciu sympatikových nervov, VACHT (1:1000; Synaptic Systems, Nemecko) pre detekciu parasympatikových nervov, a tiež SP (1:1000; Abcam, Nemecko) alebo CGRP (1:1000; Abcam, Nemecko) pre detekciu senzitivných nervov. Prítomnosť konkrétneho typu nervov bola stanovená na základe prekryvu *anti-rabbit* (červená) a *anti-mouse* (zelená) fluorescenčných protilátok (prekryvu všeobecného so špecifickým markerom inervácie), ktoré sa prejavilo žltohnedým zafarbením. *Proliferačná aktivita* sa hodnotila na základe spočítania PCNA pozitívnych jadier (hnedá farba) v S100 ofarbených nervových vláknach (červená farba) na ploche 1 cm².

Štatistická analýza. Výsledky sa hodnotili v programe GraphPad Prism 8.0.1. Rozdiely v hmotnosti melanómov a génovej expresii boli hodnotené pomocou nepárového t-testu s Welchovou korekciou. Rozdiely v denzite inervácie boli hodnotené

pomocou jednofaktorovej ANOVA s Tukey *post hoc* testom. Vzťah medzi hustotou inervácie a Gleasonovým skóre bol hodnotený pomocou jednoduchej lineárnej regresie a Pearsonovej korelácie. Zmeny sa považovali za štatisticky významné, keď $P < 0,05$. Hodnoty v grafoch – priemer \pm SEM.

Výsledky a diskusia

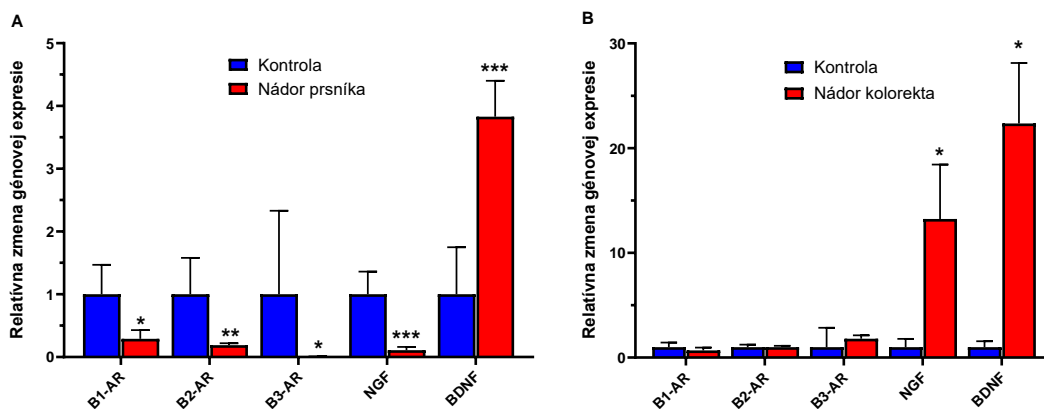
Aplikácia lokálneho anestetika Pliaglis priamo na povrch melanómu viedla k signifikantnej inhibícii jeho rastu, čo sa prejavilo nižšou hmotnosťou nádorov v porovnaní so zvieratami s neliečenými melanómami a melanómami potieranými vehikulom gélom. Tento účinok bol ešte výraznejší u zvierat, ktorým bola súčasne intraperitoneálne podávaná aj anti-PD-1 protilátka (Obr. 1). Naše výsledky naznačujú, že podávanie lokálnych anestetík, a teda prerušenie prenosu signálov z periférnych nervov na tkanivo melanómu môže byť využité pri liečbe melanómu, avšak dôležitú úlohu pri aplikácii takejto terapie zohráva pravdepodobne koncentrácia použitých látok a obdobie kedy sa terapeutické látky začnú podávať [4]. Preto bude potrebný ďalší výskum pred aplikáciou týchto prístupov do klinickej praxe.



Obrázok 1. Zmeny v hmotnosti melanómov vplyvom podávania lokálneho anestetika Pliaglis. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM. MEL – melanómy bez liečby ($n=6$), MEL+VEH – melanómy potierané vehikulom – 4% metylcelulózou ($n=12$), MEL+ANE – melanómy potierané lokálnym anestetikom Pliaglis ($n=14$), MEL+IMM – melanómy liečené imunoterapiou – anti-PD-1 protilátkou ($n=8$), MEL+ANE+IMM – melanómy potierané lokálnym anestetikom Pliaglis, a súčasne liečené imunoterapiou ($n=16$). Signifikantné zmeny medzi MEL a ostatnými skupinami: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Signifikantné zmeny medzi MEL+VEH a ostatnými skupinami: ## $p < 0.01$. Signifikantné zmeny medzi MEL+ANE a ostatnými skupinami: ** $p < 0.01$. Signifikantné zmeny medzi MEL+IMM and MEL+ANE+IMM: + $p < 0.05$.

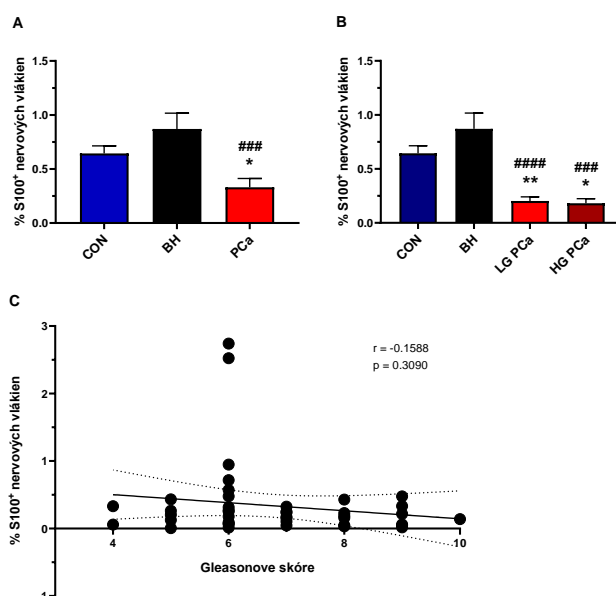
Preukázali sme signifikantne nižšiu génovú expresiu všetkých typov B-AR v myšacích nádoroch prsníka ($n=8$) v porovnaní so zdravým tkanivom prsnej žľazy ($n=6$). Tieto výsledky sa odlišujú od prác iných autorov, ktorí naopak zaznamenali

zvýšenú expresiu B-AR. Napríklad [5] preukázali u myší vystavených chronickému stresu zvýšenú expresiu β 2-AR v nádoroch prsníka, čo bolo spojené s tvorbou metastáz. Predpokladáme, že dôvodom nízkej úrovne génovej expisie B-AR mohla byť *downregulácia* vyvolaná vysokými koncentraciami neurotransmiterov v tkanive nádoru a použitie iného experimentálneho modelu nádoru. Okrem toho, sme zaznamenali nižšiu génovú expresiu NGF a vyššiu expresiu BDNF v tkanivách nádorov oproti zdravým tkanivám (Obr. 2A). Na rozdiel od toho, [6] preukázali zvýšenú génovú expresiu NGF vo vzorkách nádorov prsníka, pričom podávanie anti-NGF protilátky viedlo k spomaleniu rastu nádoru a inhibícii tvorby metastáz. V súvislosti s BDNF [7] zistili, že môže podporovať prežívanie mamárnych nádorových buniek. V myšacom nádore kolorekta (n=5) sme nezaznamenali signifikantný rozdiel v génovej expresii B-AR oproti zdravej sliznici hrubého čreva (n=5). V súvislosti s nádorom kolorekta [8] preukázali, že génová expresia B2-AR sa zvyšuje so zvyšujúcim sa histopatologickým stupňom nádoru a súvisí s tvorbou metastáz. Úloha sympatikových nervov pri nádore kolorekta nie je úplne jednoznačná, nakoľko len limitované množstvo prác popisuje vplyv týchto nervov, ktorý nemusí byť vždy stimulačný. V prípade NGF a BDNF sme zaznamenali vyššiu génovú expresiu v tkanive nádoru oproti kontrole (Obr. 2B). Tieto výsledky sú v súlade s prácami iných autorov. Napríklad [9] preukázali súvislosť medzi zvýšenou expresiou NGF a tvorbou metastáz pri nádore kolorekta. V súvislosti s BDNF [10] preukázali jeho stimulačný vplyv na proliferáciu a migráciu nádorových buniek kolorekta. Hoci nami získané výsledky sa sčasti odlišovali od výsledkov iných autorov, naše zistenia naznačujú, že β -adrenergická signalizácia a neurotrofné faktory NGF a BDNF zohrávajú významnú úlohu pri progresii nádorov prsníka a kolorekta. Avšak pre jednoznačné vyhodnotenie vplyvu uvedených faktorov bude potrebný ďalší výskum.



Obrázok 2. Génová expresia β ₁-, β ₂-, β ₃-adrenergických receptorov – B1-AR, B2-AR, B3-AR, nervového rastového faktora – NGF a mozgového neurotrofného faktora – BDNF v myšacích subkutánne indukovaných nádoroch prsníka (n=8) a tkanivách zdravých prsných žliaz (n=6) (A) a nádoroch kolorekta (n=5) a zdravých tkanivách sliznice hrubého čreva (n=5) (B). Hodnoty sú vyjadrené ako relatívna pomerná zmena oproti kontrole a graficky vyjadrené ako priemer ± SEM.

Vo vzorkách PCa sme preukázali signifikantne menšie množstvo nervov (S100 expresie) v porovnaní s CON a BH. Rovnaké výsledky sme zaznamenali aj po rozdelení vzoriek nádorov prostaty podľa Gleasonovho skóre na nádory nízkeho a vysokého stupňa, pričom sa ukázalo, že najmenej nervových vlákien bolo vo vzorkách nádorov prostaty vysokého stupňa (Obr. 3A-B). Okrem toho, sme preukázali prítomnosť množstva periférne lokalizovaných sympatikových nervov (TH⁺), malé množstvo centrálne i periférne lokalizovaných parasympatikových nervov (VACHT⁺) a približne 10% senzitivných nervových vlákien v rámci väčších nervov (CGRP⁺) vo vzorkách CON a BH. V PCa sme zaznamenali výrazne menšie množstvo všetkých typov nervových vlákien, najmä v nádoroch vysokého stupňa. Hoci nebol zaznamenaný signifikantný vzťah medzi hustotou inervácie a Gleasonovým skóre, určitý trend poklesu množstva nervových vlákien so zvyšujúcim sa Gleasonovým skóre PCa sme zaznamenali (Obr. 3C). Nízka hustota inervácie vo vzorkách nádorov prostaty bola pravdepodobne dôsledkom nízkej proliferlačnej aktivity (PCNA expresie) v intratumorálnych nervoch. Podobne aj iní autori preukázali, že množstvo PGP9.5⁺ a TH⁺ nervových vlákien je signifikantne menšie v PCa v porovnaní s BH [2].



Obrázok 3. Densita inervácie v zdravom tkanive prostaty, benígnej hyperplázii a nádore prostaty (A, B) a vzťah medzi množstvom nervových vlákien a prognostickým Gleasonovým skóre. CON – zdravé tkanivo prostaty (n=36); BH – benígna hyperplázia prostaty (n=28); PCa – nádor prostaty (n=44); LG PCa – nádor prostaty nízkeho stupňa (n=25); HG PCa – nádor prostaty vysokého stupňa (n=13). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM. Štatistická významnosť medzi vzorkami CON a PCa, CON a LG PCa, CON a HG PCa: *p<0.05, **p<0.01. Štatistická významnosť medzi vzorkami BH a PCa, BH and LG PCa, BH and HG PCa: ###p<0.001, ####p<0.0001.

Naopak, v práci [1] preukázali vysokú hustotu TH⁺ sympatikových nervových vlákien v PCa, ktorá bola spojená s tvorbou metastáz a progresiou nádoru. Všeobecným predpokladom pri PCa je, že nervové vlákna zohrávajú významnú úlohu najmä v jeho

počiatočných štádiách. Hoci sú nami získané výsledky v súlade s údajmi z viacerých experimentálnych a klinických štúdií, sú dostupné aj práce popisujúce vysokú denzitu inervácie ako negatívny prognostický faktor pri PCa. Tieto skutočnosti poukazujú na mimoriadnu komplexnosť neurálneho vplyvu na procesy spojené so vznikom a progresiou nádoru prostaty a vyzdvihujú potrebu ďalšieho výskumu.

Záver

Naše výsledky ukázali, že aplikácia lokálneho anestetika Pliaglis spomaľuje rast melanómu a posilňuje účinok anti-PD-1 terapie, β -adrenergická signalizácia a neurotrofné faktory (NGF, BDNF) zohrávajú významnú úlohu pri progresii nádorov prsníka i kolorekta, a tiež že v ľudskom nádore prostaty je prítomná nízka hustota sympatikovej, parasympatikovej a senzitivnej inervácie. Tieto výsledky poukazujú na význam neuro-nádorových interakcií pri progresii nádorov a na potenciál aplikácie poznatkov o vplyve nervového systému na nádorové tkanivá do protinádorovej liečby.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantmi APVV-17-0090, VEGA 1/0684/21 a UK/394/2023.

Zoznam použitej literatúry

- [1] DWIVEDI S, BAUTISTA M, SHRESTHA S, ELHASASNA H, CHAPHEKAR T et al. Sympathetic signaling facilitates progression of neuroendocrine prostate cancer. *Cell Death Discov* 2021; 7: 364. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00752-1>
- [2] SIGORSKI D, GULCZYNSKI J, SEJDA A, ROGOWSKI W, IZYCKA-SWIEZIEWSKA E. Investigation of Neural Microenvironment in Prostate Cancer in Context of Neural Density, Perineural Invasion, and Neuroendocrine Profile of Tumors. *Front Oncol* 2021; 11: 710899. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.710899>
- [3] PUNDAVELA J, ROSELLI S, FAULKNER S, ATTIA J, SCOTT RJ et al. Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. *Mol Oncol* 2015; 9: 1626-1635. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.05.001>
- [4] CHEN J, JIAO Z, WANG A, ZHONG W. Lidocaine inhibits melanoma cell proliferation by regulating ERK phosphorylation. *J Cell Biochem* 2019;120: 6402-6408. <https://doi.org/10.1002/jcb.27927>
- [5] SLOAN EK, PRICEMAN SJ, COX BF, YU S, PIMENTEL MA et al. The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 7042-7052. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0522>
- [6] ADRIAENSSENS E, VANHECKE E, SAULE P, MOUGEL A, PAGE A et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 346-351. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-07-1183>

- [7] VANHECKE E, ADRIAENSSENS E, VERBEKE S, MEIGNAN S, GERMAIN E et al. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 1741-1752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1890>
- [8] CIUREA RN, ROGOVEANU I, PIRICI D, TARTEA GC, STREBA CT et al. B2 adrenergic receptors and morphological changes of the enteric nervous system in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 1250-1261. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i7.1250>.
- [9] LEI Y, HE X, HUANG H, HE Y, LAN J et al. Nerve growth factor orchestrates NGAL and matrix metalloproteinases activity to promote colorectal cancer metastasis. *Clin Transl Oncol* 2022; 24: 34-47. <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02666-x>
- [10] HUANG SM, LIN C, LIN HY, CHIU CM, FANG CW et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates cell motility in human colon cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22: 455-464. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0007>

PROTEÍNY RODINY ERM AKO NÁSTROJ REGULÁCIE EFLUXNEJ AKTIVITY ABC TRANSPORTNÉHO PROTEÍNU BCRP



Gabriela Blašková, Ivana Barčáková, Martin Majerník,
Rastislav Jendželovský, Peter Fedoročko

*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta,
Ústav biologických a ekologických vied, Košice, Slovenská republika*

Úvod

Jedným z najzásadnejších problémov ovplyvňujúcich účinnosť chemoterapeutickej liečby je nadobudnutie rezistentného fenotypu nádorových buniek. K mnohopočetnej liekovej rezistencii (MDR) výrazne prispievajú zmeny regulácie ABC transportných proteínov, ktorých úloha spočíva v prenose liečiv, ako aj živín a metabolitov. Pochopením dôležitosti fyziologickej funkcie týchto proteínov nielen v zdravých, ale taktiež v nádorových bunkách, sa prvotná snaha o ich úplnú inhibíciu transformovala na súčasný vedecký cieľ zaoberajúci sa alternatívnou cestou regulácie funkčnosti proteínov. K rozvoju skúmania prispieva aj charakteristická črta transportérov v podobe prekrývajúcej sa špecificity voči prenášaným substrátom a nežiaducich účinkov doposiaľ vyvinutých inhibítorov [1]. V dôsledku toho sa v súčasnosti veľká pozornosť začala orientovať smerom k proteínom rodiny ERM, kam patrí ezrín (EZR), radixín (RDX) a moezín (MSN), ktoré ovplyvňujú membránovú lokalizáciu a z nej vyplývajúcu funkčnosť ABC transportných proteínov [2]. Výhodou týchto molekúl v porovnaní so samotnými transportérmi je, že sú tkanivovo špecifickejšie, čo zvyšuje potenciál ich využitia pri liečbe konkrétnych typov nádorových ochorení. Okrem toho je tiež známa ich interakcia s adhezívnymi molekulami [3], vďaka čomu proteíny ERM predstavujú potenciálny cieľ aplikovateľný v liečbe metastatických nádorov so súčasným potlačením MDR.

Cieľom predkladanej práce bolo preskúmať, vplyv utíšenia expresie proteínov rodiny ERM s siRNA na celkovú expresiu ABC transportných proteínov MDR1, BCRP, MRP1 a MRP2 v doposiaľ nepreštudovaných nádorových bunkových líniiach. Vychádzajúc z výsledkov proteínovej expresie BCRP, bola predmetom práce taktiež analýza vplyvu experimentálneho zásahu na jeho efluxnú aktivitu a expresiu zodpovedajúceho génu *ABCG2*. Ďalším cieľom bolo overiť predpoklad o existencii interakcie medzi proteínom BCRP a E-kadherínom (CDH1) s účasťou proteínov rodiny ERM. Uvedenú hypotézu sme sformulovali na základe pozorovania tvorby bunkových

zhlukov pri práci so suspenznými líniami, ktoré sa vyznačujú zvýšenou expresiou BCRP.

Materiál a metódy

Kultivácia buniek. V experimentoch boli použité ľudské nádorové bunkové línie adenokarcinómu pľúc (A549; ATCC), adenokarcinómu hrubého čreva (HT-29; ATCC) a bunkové línie ľudského myelómu (RPMI-8226, RPMI-8226/MR20; poskytla J. Jakubíková, ÚEO, BMC SAV, v.v.i.). Kultivácia buniek prebiehala v kompletnom médiu RPMI 1640 s prídavkom 10 % fetálneho hovädzieho séra (FBS) a komerčnej zmesi antimykotík a antibiotík. Kultivácia buniek podrobených transfekcii bola uskutočnená v kompletnom médiu RPMI 1640 obohatenom o 10 % FBS bez prídania antibiotík. Bunky boli kultivované v inkubátore s 5 % CO₂ atmosférou, vlhkosťou 95 % a teplotou 37°C.

Transfekcia bunkových línií s siRNA a pridávanie hypericínu. Bunky boli nasadené do 6-jamkových platní (132 500 buniek/jamku) 24 hod. pred transfekciou s siRNA. Pre utíšenie exprese proteínov ERM bola použitá siRNA s koncentráciou 25 nM vo forme kombinácie štyroch oligonukleotidov cielených voči EZR, RDX a MSN (Dharmacon Inc.). Ako negatívna kontrola bola využitá „non-targeting“ siRNA. Koncentrácia siRNA pri transfekcii suspenzných bunkových línií bola v druhom pokuse zvýšená na úroveň 75 nM. Bunky boli transfekované transfekčným činidlom DharmaFECT1 (Dharmacon) podľa pokynov výrobcu. Po 48 hod. od transfekcie bol k bunkám pridaný hypericín (HYP; Sigma-Aldrich) v 100 nM koncentrácii. Inkubácia buniek s HYP prebiehala 16 hod.

Western blot analýza. Bunkové línie boli zozbierané škrabaním na ľade, premyté v chladenom PBS a lyzované prídanim chladeného lyzačného roztoku obohateného o inhibítory proteáz a fosfatáz. Proteíny boli kvantifikované prostredníctvom Lowryho metódy a vzorky nariadené na rovnaké koncentrácie. Proteíny (30 µg/vzorka) boli separované metódou SDS-PAGE prostredníctvom 10 % SDS-polyakrylamidového gélu a prenesené na PVDF membránu (Bio-Rad). Blokované membrány boli inkubované cez noc pri 4°C s primárnymi protilátkami. Po premytí boli k membránam pridané sekundárne protilátky konjugované s HRP. Detekcia exprese proteínov bola zabezpečená prídanim chemiluminiscenčného substrátu (Pierce ECL, Thermo Scientific) a vizualizáciou na RTG film (Agfa). Denzitometria proteínov bola vyhodnotená v programe ImageJ, pričom relatívna hladina analyzovaných proteínov bola normalizovaná k proteínu β-aktín.

RT-qPCR analýza. Celková RNA bola z buniek izolovaná pomocou TRI Reagentu™ a reverznou transkripciou prepísaná do cDNA. Analýza exprese génu *ABCG2* bola uskutočnená kvantitatívnou RT-PCR s využitím kitu Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-ROX (Institute of Applied Biotechnologies, a.s.). Špecifická detegovaných produktov bola overená analýzou topenia a separáciou produktov v 2 % agarózovom géli farbenom EtBr (Sigma-Aldrich). Expresia génu *ABCG2* bola vypočítaná pomocou kalibračnej krivky a normalizovaná k expresii referenčného génu *GAPDH*.

Intracelulárny obsah HYP. Bunky boli zozbierané trypsínom, premyté v PBS, resuspendované v HBSS a uložené do ľadu. Analýza intenzity fluorescencie HYP bola

uskutočnená prietokovým cytometrom BD FACSAria II SORP. Bunky boli excitované argónovým laserom s vlnovou dĺžkou 488 nm. Emisia svetla bola zachytená v kanáli PE-Texas Red (DM600LP-610/20). Výsledky boli vyhodnotené v programe FlowJo. Obsah HYP v bunkách bol vypočítaný na základe pomeru relatívnej fluorescence buniek (RFU) ovplyvnených kombinovaným zásahom vynásobeným RFU neovplyvnenej kontroly, voči RFU siRNA vynásobenej RFU HYP.

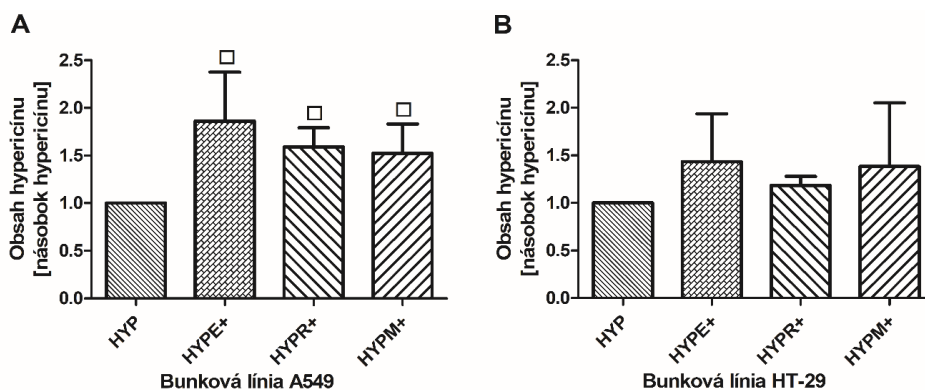
Štatistická analýza. Miera štatistickej významnosti bola vyrátaná prostredníctvom analýzy variancie (ANOVA) doplnenej Tukey post-testom. Hladina štatistickej významnosti bola zvolená nasledovne: $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

Výsledky proteínovej expresie ukázali, že hoci transfekcia adherentných buniek HT-29 a A549 s 25 nM koncentráciou siRNA bola účinná, jej vplyv na celkové hladiny proteínov CDH1, MDR1, BCRP, MRP1 a MRP2 nebol preukázaný. Účinok siRNA v bunkách HT-29 a A549 sa nepreukázal ani na zmenách v expresii génu *ABCG2*. Zaujímavým výsledkom však je, že účinkom samotného HYP došlo v bunkách A549 k poklesu v celkových hladinách fosforylovaných proteínov EZR, RDX a MSN a súčasnému nárastu celkovej hladiny proteínu BCRP. Zvýšená hladina expresie BCRP je síce v súlade s účinkom HYP, ktorý spôsobuje zvýšenú expresiu transportéra v bunkách A549 [4], ale zároveň naznačuje, že do regulácie BCRP môžu okrem proteínov ERM zasahovať aj iné regulačné mechanizmy. Tie by mohli v prípade vyradenia proteínov ERM posilňovať efluxnú aktivitu proteínu BCRP s cieľom zabezpečenia ochrany buniek voči prítomnosti xenobiotík.

Transfekcia suspenzných buniek RPMI-8226 a RPMI-8226/MR20 s 25 nM, ako aj 75 nM koncentráciou siRNA nebola dostatočne účinnou pre štatisticky významný pokles expresie proteínov rodiny ERM. Potvrdili sme, že uvedené bunkové línie sú ťažko transfekovateľné a optimalizácia ich transfekcie ostáva cieľom pre budúce experimenty. V prípade uvedených experimentálnych modelov sme na základe toho nepreukázali vplyv transfekcie na reguláciu CDH1, MDR1, BCRP, MRP1 a MRP2. Rovnako nevieme povedať či za tvorbu pozorovaných bunkových zhlukov zodpovedá interakcia medzi proteínmi BCRP a CDH1 s účasťou regulácie sprostredkovanej proteínovou rodinou ERM.

Keďže účinok transfekcie bol analyzovaný na úrovni celkových bunkových lyzátov a nie v membránovej frakcii proteínov, výsledky relatívnych hladín proteínovej expresie nehovoria nič o vplyve experimentálneho zásahu na expresiu proteínov výlučne v rámci bunkovej membrány. Stanovenie efluxnej aktivity BCRP však odzrkadľuje celkovú funkčnosť proteínu na úrovni celej bunky, a preto predstavuje dôležitý dôkaz existencie prepojenia medzi proteínmi rodiny ERM a BCRP. Pre tento účel bola meraná vnútrobunková hladina fluorescenčného HYP, ktorý je substrátom BCRP [4, 5]. Zistili sme, že po utíšení expresie EZR, RDX aj MSN v bunkách A549 došlo k štatisticky významnému nárastu obsahu HYP (Obr. 1A). Na základe tohto výsledku konštatujeme, že efluxná aktivita proteínu BCRP je v bunkách A549 regulovaná všetkými tromi členmi proteínovej rodiny ERM. V bunkách HT-29 štatisticky významné zmeny intracelulárneho obsahu HYP po utíšení proteínov ERM pozorované neboli (Obr. 1B).



Obrázok 1. Obsah HYP v bunkách A549 a HT-29 ovplyvnených účinkom transfekcie s 25 nM siRNA. Obsah HYP bol analyzovaný 16 hod. po pridaní k transfekovaným bunkám. Výsledky sú vyjadrené ako násobky skupiny ovplyvnenej HYP. Experimentálne skupiny ovplyvnené kombinovaným zásahom (HYPE+, HYPR+, HYPM+) boli štatisticky porovnané so skupinami ovplyvnenými samotným HYP (\square $p < 0,05$).

Vzhľadom k tomu, že sa účinok siRNA nepreukázal na celkových hladinách expresie proteínov CDH1, BCRP, MDR1, MRP1, MRP2 ani na génovej expresii ABCG2 predpokladáme, že proteíny ERM regulujú výlučne membránovú lokalizáciu ABC transportného proteínu, čomu nasvedčuje zvýšená akumulácia HYP v bunkách A549. Tieto výsledky súhlasia s viacerými predošlými prácami, ktoré využili odlišné bunkové línie. Viacerí autori zistili, že po utíšení expresie proteínov ERM nedochádza k poklesu v celkových hladinách proteínu BCRP, ale iba k redukcii membránových hladín zapríčinených presunom proteínu do cytoplazmy. To sa odzrkadľuje na redukcii transportnej aktivity, ktorú dokazuje zvýšená intracelulárna hladina použitého substrátu [2, 6]. Zmeny v expresii proteínov ovplyvnených účinkom siRNA bude preto potrebné overiť detekciou výlučne v rámci membránovej frakcie.

Výsledky získané z celkových bunkových lyzátov poskytujú rozšírenie vedeckých poznatkov o expresii proteínov rodiny ERM a ich vplyve na ABC transportné proteíny a CDH1 v doposiaľ nepreštudovaných bunkových modeloch. Práca súčasne preukazuje, že modulácia expresie proteínov ERM môže pri niektorých nádoroch predstavovať tkanivovo špecifické riešenie problému s MDR zapríčinenou zvýšenou aktivitou ABC transportných proteínov.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0003/23.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ogihara T, Mizoi K, Kamioka H, Yano K. Physiological Roles of ERM Proteins and Transcriptional Regulators in Supporting Membrane Expression of Efflux Transporters as Factors of Drug Resistance in Cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 3352. <https://doi.org/10.3390/cancers12113352>
- [2] Yano K, Okabe C, Fujii K, Kato Y, Ogihara T. Regulation of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein by ezrin, radixin and moesin in lung, intestinal and renal cancer cell lines. *J Pharm Pharmacol* 2020; 72: 575-582. doi:10.1111/jphp.13225
- [3] Ponuwei GA. A glimpse of the ERM proteins. *J Biomed Sci* 2016; 23: 35. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0246-3>
- [4] Vargová J, Mikeš J, Jendželovský R, Mikešová L, Kuchárová B et al. Hypericin affects cancer side populations via competitive inhibition of BCRP. *Biomed Pharmacother* 2018; 99: 511-522 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.074>
- [5] Jendželovský R, Jendželovská Z, Kuchárová B, Fedoročko P. Breast cancer resistance protein is the enemy of hypericin accumulation and toxicity of hypericin-mediated photodynamic therapy. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 2173-2181. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.084>
- [6] Hoshi Y, Uchida Y, Kuroda T, Tachikawa M, Couraud PO et al. Distinct roles of ezrin, radixin and moesin in maintaining the plasma membrane localizations and functions of human blood-brain barrier transporters. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020; 40: 1533-1545. <https://doi.org/10.1177/0271678X19868880>

REKONŠTRUKČNÁ CHIRURGIA AKO FAKTOR OVPLYVNÚJÚCI PREŽÍVANIE PACIENTOV S SCC HLAVY A KRKU



Júlia Farská, Ivana Vidová, Marek Soviš, Ladislav Czakó,
Kristián Šimko, Branislav Gális

Klinika ústnej, čelústnej a tvárovej chirurgie UNB a LF UK Ružinov

Úvod

Orálny skvamocelulárny karcinóm (OSCC) predstavuje celosvetovo narastajúcu problematiku pre zdravie našej populácie. Skvamocelulárny karcinóm je najčastejšou malignitou v dutine ústnej a celkovo ho radíme medzi 10 najčastejších karcinómov. Navyše, podiel lokoregionálnej recidívy sa medziročne pohybuje medzi 3-7%, čo je neporovnateľne vyššie, oproti ostatným malignitám. Pre úspešný manažment pacientov s OSCC je kľúčovým faktorom potreba včasnej detekcie nádorového ochorenia a individuálny liečebný plán.

Za optimálny spôsob terapie u pacientov s OSCC považujeme chirurgickú modalitu. Napriek pozoruhodnému pokroku v liečebných modalitách sa 5-ročná miera prežívania za posledných niekoľko desaťročí výrazne nezlepšila. Jedným z dôležitých aspektov chirurgickej liečby nádorov hlavy a krku je snaha o ich kompletnú (R0) resekciu. Jej výraznou limitáciou je najmä veľkosť tumoru a jeho lokalizácia. Práve v tomto smere nastala za posledné roky výrazná zmena, a to so zvyšujúcou mierou využívania rekonštrukčnej chirurgie po iniciálnej resekcii tumoru. Využívanie možnosti voľných mikrovaskulárnych tkanivových lalokov nám dovoľujú radikálnejšiu resekalititu tumorov, a to aj u pacientov s lokálne pokročilým nádorovým ochorením. Súčasne majú za cieľ priniesť lepšiu funkčnú a estetickú rehabilitáciu pacientov. So zdokonaleným chirurgickej techniky, s väčším počtom operácií a technologickými pokrokmi miera úspešnosti lalokových transferov celosvetovo presahuje 95 % [1].

Materiál a metódy

Zatiaľ čo existuje viacero štúdií, ktoré potvrdzujú vynikajúce funkčné výsledky pri chirurgických výkonoch s využitím voľných tkanivových transferov pre OSCC, máme k dispozícii obmedzené údaje týkajúce sa prežívania týchto pacientov. Naša štúdia bola navrhnutá tak, aby zobrazila skutočný panoramatický pohľad na operáciu voľných lalokov pre OSCC realizovaných na našom pracovisku. Z analýzy prežívania boli vylúčené maligne diagnózy slinných žliaz a extraorálne karcinómy, rovnako boli vylúčené duplexné malignity alebo recidívy ochorenia. Retrospektívne sme analyzovali zdravotné záznamy pacientov, ktorý podstúpili chirurgickú terapiu pre onkologické



ochorenie na Klinike maxilofaciálnej chirurgie v rokoch 2017-2019. Do decembra 2019 sa hodnotil typ intervencie, štádium ochorenia, počet úmrtí a miera prežívania (1-ročné, 3-ročné a 5-ročné prežívanie). K zobrazeniu kriviek miery prežívania bola použitá Kaplan-Meier metóda. Významné variácie medzi skupinami boli analyzované Log-Rank testom.

Výsledky

Analýza 1-ročného prežívania bola vykonaná u 339 pacientov (248 podstúpilo konvenčnú resekciu, 91 mikrovaskulárnu rekonštrukciu). Podľa AJCC klasifikácie (the American Joint Committee on Cancer) štádium I predstavovalo 38 pacientov, v štádiu II 54 pacientov, v štádiu III 59 a v štádiu IV 188 pacientov. Celková miera prežívania bola 75,5%. Prežívanie v štádiu I v skupine pacientov s konvenčnou resekciou (prvá skupina) bol 86,5 %, v skupine s rekonštrukciou (druhá skupina) 100%. Prežívanie v štádiu II v prvej skupine bol 89,1 % v druhej skupine opäť 100%. V štádiu III bolo celkové prežívanie v prvej skupine 85 %, v druhej skupine 100 %. V štádiu IV bola miera prežívania v prvej skupine 55,2%, v druhej skupine 82,5%.

3-ročná analýza prežívania bola vykonaná pre 223 pacientov, štádium I 29 pacientov, štádium II 33 pacientov, štádium III 43, štádium IV 116 pacientov. 42 podstúpilo mikrovaskulárnu rekonštrukciu, 181 konvenčnú resekciu) Celková miera prežívania 55,2%. Prežívanie v štádiu I v skupine pacientov s konvenčnou resekciou bol 71,4 %, v skupine s rekonštrukciou 100%. Prežívanie v štádiu II v prvej skupine bol 71,9% v druhej skupine opäť 100%. V štádiu III bolo celkové prežívanie v prvej skupine 58,8%, v druhej skupine 88,9%. V štádiu IV bola miera prežívania v prvej skupine 33,3%, v druhej skupine 65,5%.

Analýza 5-ročného prežívania bola vykonaná u 122 pacientov, v štádiu I 19, v štádiu II 18 pacientov, v štádiu III 24 a štádiu IV 64 pacientov. 12 postúpilo mikrovaskulárnu rekonštrukciu, 110 konvenčnú resekciu. Prežívanie v štádiu I v skupine pacientov s konvenčnou resekciou bol 50 %, v skupine s rekonštrukciou 100%. Prežívanie v štádiu II v prvej skupine bol 82,4 % v druhej skupine opäť 100%. V štádiu III bolo celkové prežívanie v prvej skupine 56,5%, v druhej skupine bola realizovaná iba jedna rekonštrukčná operácia s úmrtím pacienta v priebehu piatich rokov, teda miera prežívania je 0%. V štádiu IV bola miera prežívania v prvej skupine 26,9%, v druhej skupine 33,3 %. Celková miera prežívania bola 45,1%.

Celkovo v tomto časovom úseku podstúpilo mikrovaskulárnu rekonštrukciu 145 pacientov.

Tabuľka 1. Závislosť stagingu ochorenia a prežívania pacientov riešených mikrovaskulárnou rekonštrukciou. (N of Events= počet úmrtí v skupine, Censored= prežívajúci pacienti po 3-ročnom sledovaní)

Case Processing Summar

stage	Microvascular reconstruction	Total N	N of Events	Censored	
				N	Percent
stage 1	no reconstruction	28	8	20	71,4%
	microvascular reconstruction	1	0	1	100,0%
	Overall	29	8	21	72,4%
stage 2	no reconstruction	32	9	23	71,9%
	microvascular reconstruction	3	0	3	100,0%
	Overall	35	9	26	74,3%
stage 3	no reconstruction	34	14	20	58,8%
	microvascular reconstruction	9	1	8	88,9%
	Overall	43	15	28	65,1%
stage 4	no reconstruction	87	58	29	33,3%
	microvascular reconstruction	29	10	19	65,5%
	Overall	116	68	48	41,4%
Overall	Overall	223	100	123	55,2%

Tabuľka 2. Celkové porovnanie prežívania medzi skupinou liečenou konvenčnou metódou a skupinou liečenou mikrovaskulárnou metódou vyšlo ako štatisticky významné (p-value < 0.001). Medián prežívania bol 3 roky.

Overall Comparisons^a

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	12,900	1	,000

Po stratifikácii podľa štádia ochorenia bol významný každý interval prežívania 1, 3 a 5 rokov medzi pacientmi, ktorí podstúpili mikrochirurgickú rekonštrukciu aj bez operácie voľným lalokom. Signifikantne lepšie výsledky boli 3-ročného prežívania, kde

porovnanie prežívania medzi skupinou liečenou konvenčnou metódou a skupinou liečenou mikrovaskulárnou metódou vyšlo ako štatisticky významné (p -value <0.001). Naše výsledky podporujú superiórne postavenie mikrovaskulárnej chirurgie v liečbe pacientov s OSCC. Väčšina operovaných pacientov má však lokálne pokročilé štádium nádorového procesu (52% štádium IV), ktoré si vyžaduje multimodálny prístup.

Diskusia

Mikrochirurgická operácia si vyžaduje odborné znalosti, je náročná na čas a zdroje a ako celok je značne finančne nákladná [2]. Tieto faktory predstavujú určité obavy zo širšieho využívania tejto techniky. Mücke a kol. uvádzajú, že niektorí autori zastávajú názor, že rekonštrukcia voľným lalokom by mala byť vyhradená vybraným pacientom, ktorí majú lepšiu prognózu [3]. Pacienti postihnutí lokálnymi nádormi v pokročilom štádiu majú horšiu prognózu, ale na druhej strane pomerne často sú to pacienti, ktorí vyžadujú adekvátnu rekonštrukciu po rozsiahlej ablácii nádorového procesu [4]. Podľa našej štúdie prežívania pacientov z tejto chirurgickej techniky jednoznačne profitujú aj pacienti s pokročilým štádiom nádorového ochorenia (štádium III a IV).

Napriek nedostatku štúdií plne porovnateľných s našou realizovanou, existujú niektoré publikované údaje týkajúce sa prežívania pacientov po operáciách s voľným lalokom pre OSCC [5]. Lidman a Niklasson sledovali 79 pacientov, väčšina bola v štádiu I (42 %) s primárnym intraorálnym SCC, ktorí podstúpili rekonštrukčnú operáciu voľným lalokom; zistili celkové 5-ročné prežívanie súvisiace s nádorom 58 % [6].

Spomínaný Mücke a spol. vo svojej štúdií zhodnotili svoje skúsenosti s 274 pacientmi s SCC ústnej dutiny operovanými s voľnými lalokmi, pričom ich porovnávali so 499 pacientmi liečených bez rekonštrukcie. 5-ročné celkové prežívanie bolo 66,2 % v podskupine s rekonštrukciou voľným lalokom a 58,8 % v podskupine bez rekonštrukcie. Porovnávací analýza ukázala lepšie prežívanie v skupine s voľným lalokom. Lepšie prežívanie bolo obmedzené na pacientov v štádiu T3-4 (žiadny rozdiel pre T1-2).

Záver

Miera prežívania je porovnateľná s tými, ktoré uvádzajú rôzni autori na celom svete. Najdôležitejším aspektom sa zdá byť možnosť radikálnej resektability tumorov s následným potenciálom komplexnej trojrozsomernej rekonštrukcie defektov. Mikrochirurgia poskytuje možnosť resektcie aj predtým inoperabilných tumorov s dubióznou prognózou. Na spresnenie analýzy prežívania pacientov je ale nutný ďalší výskum, ktorý by pomohol optimalizovať chirurgické indikácie a porovnať výsledky s výsledkami získanými z iných terapií.

Ďalšou otázkou ostáva zhodnotenie kvality života (QoL) pacientov po rekonštrukčnom výkone, čomu by sme sa chceli venovať v ďalšom výskume. Treba si uvedomiť, že aj pri tomto type operačného postupu je nutné individuálne posúdiť risk vs. benefit pre pacienta s prihliadnutím na jeho bezpečnú a čo najrýchlejšiu rekonvalescenciu a minimalizáciu morbiditu.

Zoznam použitej literatúry

- [1] NOVAKOVIC D, PATEL RS, GOLDSTEIN PD, GULLANE PJ. Salvage of failed free flaps used in head and neck reconstruction. *Head Neck Oncol* 2009; 1: 33. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-1-33>
- [2] WOLF KD, HÖLZLE F. *Raising of Microvascular Flaps: A Systematic Approach*. Verlag Berlin and Heidelberg: Springer, 2005. ISBN 3-540- 21849-1.
- [3] MÜCKE T, WOLFF KD, WAGENPFEIL S, MITCHELL DA, HÖLZLE F. Immediate microsurgical reconstruction after tumor ablation predicts survival among patients with head and neck carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 287–295. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0758-0>
- [4] SALAMA AR. Chapter 3 - Flap Classification and Principles of Flap Design for Head and Neck Reconstruction. pp11-18. In: Shahrokh C. BAGHERI, R. Bryan BELL a Husain Ali KHAN, ed. *Current Therapy In Oral and Maxillofacial Surgery*. Saint Louis: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4160-2527-6. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-2527-6.00003-7>
- [5] THOMSON P (Ed). *Oral Precancer: Diagnosis and Management of Potentially Malignant Disorders*. Hardcover: Wiley-Blackwell, 2012. ISBN: 978-1-444-33574-3
- [6] LIDMAN D, NIKLASSON M. Survival and function in patients with tumors of the head and neck operated on and reconstructed with free flaps. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2008; 42: 77–85. <https://doi.org/10.1080/02844310701850538>

VPLYV NOVÝCH ORGANOCÍNIČITÝCH ZLÚČENÍN NA VYBRANÉ BUNKOVÉ LÍNIE NÁDORU PRSNEJ ŽĽAZY



Katarína Gerčáková¹, Eva Horváthová¹, Dana Macejová²,
Július Brtko², Miroslava Matúšková¹

¹Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i.,
Bratislava

²Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum SAV,
v.v.i., Bratislava

Úvod

Nádorové ochorenie prsníka je najčastejšie diagnostikovaným nádorovým ochorením na svete. Úspešnosť liečby je do značnej miery závislá od typu nádoru. Organkovové zlúčeniny ako cisplatina a oxaliplatiná sú v liečbe nádorov prsníka používané už celé desaťročia. Ich použitie je však limitované toxicitou. Z tohto dôvodu je potrebné hľadať nové účinné látky. Organkovové neplatínové zlúčeniny ukázali sľubný protinádorový účinok. U tri-organocíničitých zlúčenín bola pozorovaná indukcia apoptózy na rôznych nádorových bunkových líniiach [1]. V našej práci sme sledovali cytotoxický účinok troch tri-organocíničitých zlúčenín: tributylcín trichloroacetát (Cl₃CO), tributylcín trifluórmetán sulfonát (F₃SO₃) a N, N-dimetylditiokarbamát trifenylocín (Ph₃S₂) na paneli nádorových buniek prsníka a porovnali sme ich s účinkom konvenčne používaného liečiva - cisplatinou.

Materiál a Metodika

Bunkové línie. Použili sme panel bunkových línii odvođených od karcinómu prsníka (MDA-MB-231, JIMT-1, T47D, 4T1) a nenádorovú bunkovú líniu MCF10A. Bunkové línie boli komerčne zakúpené (ATCC® z angl. *American Type Culture Collection*). MDA-MB-231 a JIMT-1 boli kultivované v DMEM s vysokým obsahom glukózy (4,5 g/l) (PAN Biotech, Nemecko) doplnenom o 10 % fetálneho hovädzieho séra (FHS; PAN Biotech, Nemecko), 10 µg/ml gentamicínu. Bunky 4T1 a T47D sme kultivovali v RPMI s vysokým obsahom glukózy (4,5 g/l) (PAN Biotech, Nemecko) doplnenom s 10 % FHS, 10 µg/ml gentamicínu (Sandoz, Nemecko). MCF10A sa udržiavali v médiu DMEM/F12 s vysokým obsahom glukózy (4,5 g/l) (PAN Biotech, Nemecko) doplnenom 5 % FHS, 10 µg/ml gentamicínu, 20 ng/ml EGF (Milteney Biotech, USA), 100 ng/ml choleratoxínu (Sigma-Aldrich, USA), 0,5 µl/ml hydrokortizónu (Sigma-Aldrich, USA), 10 µl/ml inzulínu (Sigma-Aldrich, USA). Všetky línie sme kultivovali pri 37 °C vo vlhkej atmosfére a 5 % CO₂.

Stanovenie relatívnej viability. Na 96-jankovú platňu sme vysiali 1,1 x 10³ MDA-MB-231, 3 x 10³ JIMT-1, 3 x 10³ T47D, 0,8 x 10³ 4T1, 0,8 x 10³ MCF10A. Nasledujúci deň sme pridali testované látky v koncentrácii 0,0625-1 µM



alebo cisplatinou v rozmedzí 0,8-105 μM . Viabilitu sme stanovili 2 a 5 dní po pridaní látok. Luminiscencia bola stanovená na prístroji- GloMax Discover pomocou CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation). Na výpočet polovičnej (IC_{50}) a 20% (IC_{20}) inhibičnej koncentrácie sme použili programy Calcsyn (version 1.1, Biosoft) a GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Ecanything1.cfm>).

Detekcia aktivácie kaspáz 3/7. Na detekciu indukcie apoptózy sme použili luminiscenčný test Caspase-Glo® 3/7 Assay System (Promega, USA). Bunkové línie boli založené na 96-jamkovú platničku s bielymi stenami a po 24 hodinách sme pridali testované zlúčeniny a cisplatinu v koncentrácii IC_{50} . Po 24 sme test vyhodnotili. Meranie luminiscencie sa uskutočnilo medzi 0,5 -4 hodinou po pridaní substrátu pomocou protokolu Caspase-Glo na zariadení GloMax Discover.

Stanovenie bunkového cyklu. Na kvantifikovanie buniek v rôznych štádiách bunkového cyklu, sme bunky založili na 12-jamkovú platničku (75×10^3 buniek/jamku). Po 24 hodinách sme bunky ovplyvnili zlúčeninami v koncentrácii IC_{50} počas 48 hodín. Bunky sme premyli studeným PBS a inkubovali 25 minút pri 37°C v PBS s 0,05 % Tritonom x-100 a 100 $\mu\text{g/ml}$ ribonukleázou A (Sigma Aldrich, USA). Vzorky sme inkubovali počas 1 minúty na ľade a následne pridali propídium jodid (40 $\mu\text{g/ml}$). Vzorky sa analyzovali pomocou prietokového cytometra BD FACSCanto™ II vybaveného programom FacsDiva.

Stanovenie miery poškodenia DNA pomocou kométového testu. Na detekciu poškodení DNA sme uskutočnili konvenčný alkalický kométový test a reverzný alkalický kométový test. 24 hodín po založení buniek na 24-jamkové platne (100 000 buniek) sme pridali zlúčeniny alebo cisplatinu v koncentráciách IC_{50} a IC_{20} na 48 hodín. Pre konvenčný kométový test sme použili 1×10^5 buniek, ktoré sme premyli PBS a vložili do 0,75 % LMP agarózy rozprestretej v tenkých vrstvách na mikroskopické sklíčko. Bunky sme potom lyzovali 1 hodinu pri 4°C v roztoku chloridu sodného (2,5 M), Na_2EDTA (0,1 M), Tris-HCl (10 mM) a Triton x-100 (1 %), inkubovali 40 minút v elektroforetickom roztoku na odvíjanie (300 mM NaOH, 1 mM Na_2EDTA). Elektroforéza prebiehala 30 minút elektroforézu (25 V/300mA). Následne sme sklíčka neutralizovali, vysušili, zafarbili etídium bromidom (5 $\mu\text{g/ml}$) a prikryli kryciami sklíčkami. Vzorky sme vyhodnocovali fluorescenčným mikroskopom Carl Zeiss AxioImager.Z2 s použitím počítačovej analýzy obrazu Metafer 5 (MetaSystems GmbH, Nemecko). Na detekciu krížových väzieb sme bunky na platničkách inkubovali 30 minút s 900 μM styrénoxidom, následne lyzovali a ošetrili postupom ako v konvenčnom alkalickom kométovom teste opísanom vyššie. Štatistickú významnosť sme hodnotili Studentovým *t*-testom.

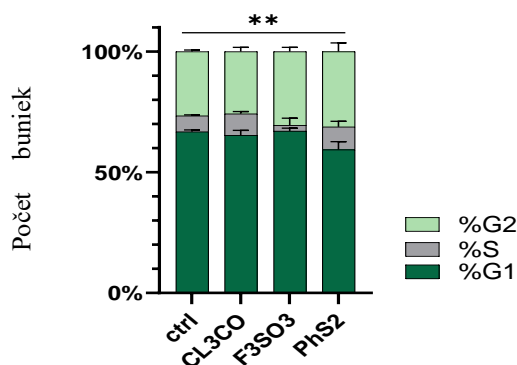
Diskusia a výsledky

Výsledky našej štúdie ukázali variabilnú citlivosť nádorových bunkových línií na triorganocínité zlúčeniny. Rozdiely v citlivosti boli pozorované pri krátkodobom (48-hodinovom) a dlhodobom (120-hodinovom) pôsobení testovaných látok. Účinnosť zlúčenín triorganocínu prekonala účinnosť cisplatinu, široko používaného chemoterapeutika, s nižšími hodnotami IC_{50} , najmä pri 120-hodinovom režime, ktoré

koreluje s predchádzajúcimi štúdiami na báze organocínu [2]. Testované bunkové línie vykazovali IC_{50} pre organocínité zlúčeniny v rozsahu 0,07-0,27 μM , zatiaľ čo cisplatina potrebuje vyššie koncentrácie v rozsahu 0,6-4,7 μM . Hodnoty IC_{50} pri 48-hodinovom ovplyvnení boli vyššie ako pri 120-hodinovom ovplyvňovaní. Pre triorganocínité zlúčeniny boli v rozsahu 0,09-0,33 μM a cisplatinu 2,4-52,3 μM .

Bunkovú smrť možno klasifikovať do niekoľkých rôznych foriem, ktorými sú nekróza, autofágia, apoptóza a entóza. V tejto štúdii sme sa však zamerali na mechanizmus bunkovej smrti – apoptózu a to testom aktivácie kaspáz. Zatiaľ čo cisplatina indukovala aktiváciu kaspáz vo všetkých bunkových líniách, triorganocínové zlúčeniny vykazali mierne zvýšenie v aktivácii kaspáz avšak bez významnejšieho účinku v porovnaní s kontrolnými podmienkami v testovaných bunkových líniách. Tieto zistenia, sú rozpore so štúdiou, v ktorej boli aplikované organocínité zlúčeniny [3], u ktorých boli zaznamenané významné zvýšenie aktivity u nádorových bunkových línií. Rozdiel mohol byť zapríčinený indukciou odlišnej formy bunkovej smrti študovanými triorganocínitými látkami.

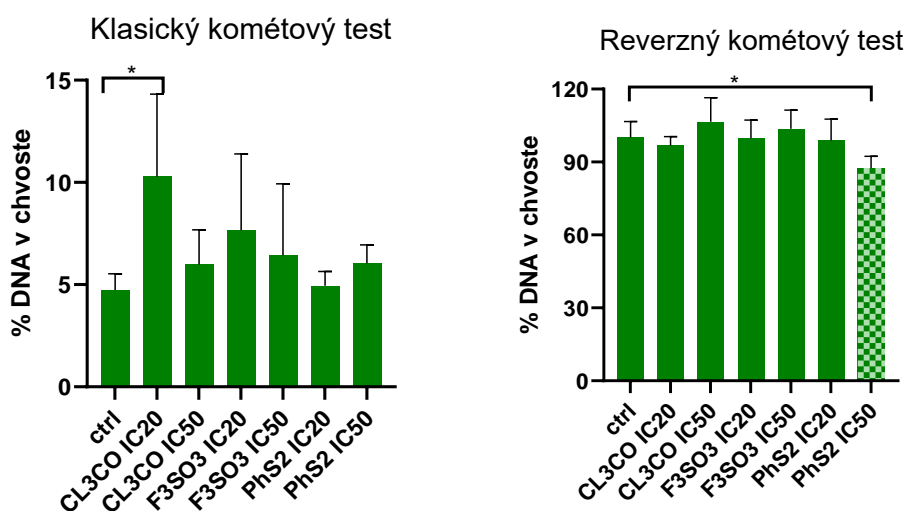
Zistili sme, že skúmané látky majú vplyv na bunkový cyklus. Konkrétne zlúčenina PhS2 indukovala zvýšenie zastúpenia buniek v G2 fáze u viacerých bunkových línií, pričom najvýraznejšie účinky boli pozorované v bunkách JIMT-1 a MCF10A (Obr. 1). Zlúčeniny Cl3CO a FSO3 významne bunkový cyklus neovplyvnili. Vplyv zlúčenín organocínu na zastavenie bunkového cyklu v závislosti od koncentrácie látky [4]. Zlúčeniny organocínu preukázali efekt na rôzne fázy cyklu pri koncentrácií IC_{50} [5]. Avšak ani tu sa neprejavil účinok všetkých testovaných látok.



Obrázok 1. Stanovenie bunkového cyklu po ovplyvnení testovanými látkami u bunkovej línie MCF10.

Hodnotenie poškodenia DNA pomocou konvenčného kométového testu odhalilo zaujímavé výsledky týkajúce sa genotoxických účinkov zlúčenín triorganocínu. Zatiaľ čo nárast poškodenia DNA bolo pozorovaný v bunkách JIMT-1 kultivovaných so zlúčeninami F3SO3 a PhS2 v koncentrácii IC_{50} , v línií MCF10A sme zaznamenali nárast poškodenia v oboch koncentráciách u zlúčeniny PhS2 a u ďalších dvoch zlúčenín v koncentrácií IC_{50} . Naopak, u buniek 4T1 sme nepozorovali významné genotoxické účinky pri IC_{50} ani IC_{20} . V línií MDA-MB-231 sme sledovali zvýšenie poškodenia

u koncentrácie IC₂₀ u zlúčenín Cl₃CO a F₃SO₃ a u látky PhS₂ pri koncentrácií IC₅₀ (Obr. 2). Tieto výsledky vyššieho poškodenia nižšou koncentráciou môžu byť spôsobené rozdielnym mechanizmom opráv poškodenia DNA alebo aj rozdielnym stupňom citlivosti bunkovej línie na poškodenie DNA [6]. Analýzou krížových väzieb DNA sme odhalili významné zvýšenie krížových väzieb v bunkách JIMT-1 kultivovaných v IC₅₀ všetkých triorganocínových zlúčenín ako aj v bunkách MCF10As PhS₂ v oboch koncentráciách. Avšak, u línií MDA-MB-231 a 4T1 sme nezaznamenali zvýšenie pomeru krížových väzieb. Stupeň poškodenia DNA je závislý od koncentrácie použitých látok, ako bolo ukázané na líniah MDA-MB-231 a MCF7 [7].



Obrázok 2. Stanovenie miery poškodenia DNA u línie MDA-MB-231.

Záver

Ukázali sme, že organocínité zlúčeniny majú cytotoxický efekt na nádorové bunky už pri nízkych dávkach, pričom najúčinnjšou zlúčeninou bola PhS₂. Táto zlúčenina indukovala zastavenie bunkového cyklu v G₂ fáze. Naše výsledky naznačujú, že organocínité zlúčeniny majú sľubný potenciál na vývoj nových látok s protinádorovým účinkom. V ďalších experimentoch sa zameriame na štúdium mechanizmu ich účinku.

Pod'akovanie

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja – grant APVV-20-0314, a Nadáciou Výskum rakoviny.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Fickova M, Macho L, Brtko J. A comparison of the effects of tributyltin chloride and triphenyltin chloride on cell proliferation, proapoptotic p53, Bax, and antiapoptotic Bcl-2 protein levels in human breast cancer MCF-7 cell line. *Toxicol In Vitro* 2015; 29: 727-731. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.007>
- [2] Arjmand F, Parveen S, Tabassum S, Pettinari C. Organo-tin antitumor compounds: Their present status in drug development and future perspectives. *Inorg Chimica Acta* 2014; 423: 26-37. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2014.07.066>
- [3] Stridh H, Cotgreave I, Müller M, Orrenius S, Gigliotti D. Organotin-induced caspase activation and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 791-798. <https://doi.org/10.1021/tx000156c>
- [4] Attanzio A, D'Agostino S, Busà R, Frazzitta A, Rubino S et al. Cytotoxic Activity of Organotin(IV) Derivatives with Triazolopyrimidine Containing Exocyclic Oxygen Atoms. *Molecules* 2020; 25: 859. <https://doi.org/10.3390/molecules25040859>
- [5] Rasli NR, Hamid A, Awang N, Kamaludin NF. Series of Organotin(IV) Compounds with Different Dithiocarbamate Ligands Induced Cytotoxicity, Apoptosis and Cell Cycle Arrest on Jurkat E6.1, T Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Molecules*. 2023; 28: 3376. <https://doi.org/10.3390/molecules28083376>
- [6] Khanna A. DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse? *Cancer Res* 2015; 75: 2133-2138. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3247>
- [7] Hunakova L, Horvathova E, Majerova K, Bobal P, Otevrel J et al. Genotoxic Effects of Tributyltin and Triphenyltin Isothiocyanates, Cognate RXR Ligands: Comparison in Human Breast Carcinoma MCF 7 and MDA-MB-231 Cells. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 1198. <https://doi.org/10.3390/ijms20051198>

VPLYV INHIBÍCIE E3 UBIKVITÍN LIGÁZY HRD1 NA PREŽÍVANIE A ODPOVEĎ BUNKOVÝCH LÍNIÍ NÁDOROV MOZGU



Jaroslava Gužiková, Monika Líšková, Ľuboš Hudák,
Peter Račay

Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Endoplazmatické retikulum (ER) je dôležitá organela prítomná vo všetkých eukaryotických bunkách okrem erytrocytov. Vykonáva množstvo základných bunkových funkcií - syntézu a transport proteínov, glykozyláciu a skladanie proteínov, syntézu lipidov a steroidov, ukládanie vápnika [1]. Jedna tretina všetkých proteínov prechádza cez ER a následne sa dostávajú do ich finálnej intracelulárnej alebo extracelulárnej polohy. Po translokácii proteínov do lumenu ER sú polypeptidy aktívne poskladané a modifikované pomocou šaperónov, glykolyzačných enzýmov a oxido-reduktáz. Časť proteínov sa poskladá nesprávne. Nesprávne poskladané proteíny sú z lumenu ER presúvané do cytosolu a označené ubikvitínom [1]. E3 ubikvitín ligáza synoviolín (SYVN1), ktorá sa označuje aj ako HRD1 (*HMG-CoA reductase degradation protein 1*), spolu s jej kofaktorom SEL1L (*suppressor/enhancer of lin-12-like protein 1*) katalyzuje pridávanie ubikvitínu na proteíny pri prechode cez membránu ER. Tieto proteíny sú potom degradované v 26S proteazóme [2]. Tento proces sa nazýva degradácia proteínov asociovaná s ER (ERAD, *endoplasmic reticulum-associated degradation*), pričom komplex SEL1L – HRD1 predstavuje najkonzervovanejší mechanizmus ERAD u cicavcov [3]. Stres ER je spôsobený akumuláciou nesprávne zložených proteínov v ER alebo vzniká ako odpoveď na rôzne podmienky (hypoxia, oxidačný stres, nedostatok rastových signálov, nedostatok glukózy a laktátová acidóza). Eukaryotické bunky reagujú na stres ER prostredníctvom dynamickej signalizačnej siete - odpovede nezbalených bielkovín (UPR – *Unfolded Protein Response*) [4]. UPR riadi obnovenie homeostázy zastavením translácie a zvýšením expresie ER-špecifických šaperónov. UPR je riadená pomocou aktivácie troch hlavných receptorov (senzorov) v membráne ER. Tieto receptory sú : inozitol-vyžadujúci enzým 1 – IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*); PKR-podobná ER kináza – PERK (*PKR-like ER kinase*) a ATF6 (*activating transcription factor 6*) [5].

V nádorových bunkách je v dôsledku zvýšenej proliferácie zvýšená syntéza bielkovín, čím dochádza k preťaženiu ER. Predpokladá sa aktivácia najmä osi IRE1-XBP1. IRE1 sa vyskytuje v bunke v dvoch izoformách – IRE1 α a IRE1 β . Patrí medzi transmembránové proteíny a jeho cytoplazmatická doména má dve odlišné molekulárne



aktivity: kinázovú a ribonukleázovú. Pri strese ER IRE1 α dimerizuje a jeho trans-autofosforylácia vyvoláva konformačnú zmenu, ktorá vedie k aktivácii ribonukleázovej aktivity. Prvým substrátom pre IRE1 α RNázu je mRNA X-box viažuceho proteínu 1 (XBP1 - *X-box binding protein-1*), ktorá je procesovaná spoločne s t-RNA ligázou RTCB, čo vedie k alternatívnemu zostrihu mRNA. Výsledný otvorený čítací rámec je posunutý a vedie k prekladu stabilného a aktívneho transkripčného faktora XBP1s [6].

Cieľom projektu bolo štúdium vplyvu inhibície enzymovej aktivity HRD1 na prežívanie a molekulovú odozvu bunkových línií nádorov mozgu.

Materiál a metódy

V našej štúdií sme použili tri rôzne bunkové línie SH-SY5Y, T98G a U87. Tieto ľudské bunkové línie sme kultivovali v kultivačnom médiu (15% FBS a 10% FBS) na základe špecifických podmienok (37 °C a 5% CO₂). Použili sme chemický inhibítor LS-102, ktorý selektívne inhibuje enzymatickú aktivitu HRD1.

MTT test. Na sledovanie kvantitatívnych zmien v prežívaní a proliferácii buniek sme použili metódu MTT testu, ktorý využíva schopnosť živých metabolizujúcich buniek enzymatickou reakciou redukovať 3-(4,5-dimetyltiazol-2,5-difeny) tetrazolium bromid (MTT) na nerozpustný formazán. Kontrolné a ošetrované bunky pomocou LS-102 boli inkubované 24h, 48h a 72h. Po kultivácii sme k bunkám pridali roztok MTT a následne po 4h pridali SDS. Po 24h sme merali absorbanciu pri 540 nm a namerané hodnoty štatisticky vyhodnotili.

Práca s proteínmi. Ovplyvnené a kontrolné neovplyvnené bunky sme izolovali centrifugáciou a lyzovali lyzačným roztokom. Lyzáty sme inkubovali pri 4°C a centrifugovali pri 16 000 g a 4°C počas 25 min. Koncentráciu proteínov sme stanovili pomocou DC™ Protein Assay. Následne sme vzorky prežrážali s acetónom. Túto zmes sme inkubovali pri -25°C cez noc a centrifugovali pri 13 000 g a 4°C počas 10 min. Pelet sme opláchli acetónom a centrifugovali. Po vysušení sme pelety rozsuspendovali v roztoku SBF a proteíny denaturovali ohriatím na 96°C 4 min a schladili na ľade.

Western blot. Proteínový štandard a vzorky sme nanášali na 10% polyakrylamidový gél a separovali pri konštantnom prúde. Proteíny sme preniesli na nitrocelulózu membránu pomocou Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, DE). Membránu sme inkubovali cez noc pri 4°C v roztoku primárnej protilátky HRD1 (1:1000) a následne β -aktínu (1:1000). Po premytí sme membránu inkubovali v roztoku Clarity™ Western ECL. Signály zodpovedajúce sledovaným proteínom sme detegovali na prístroji Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, DE).

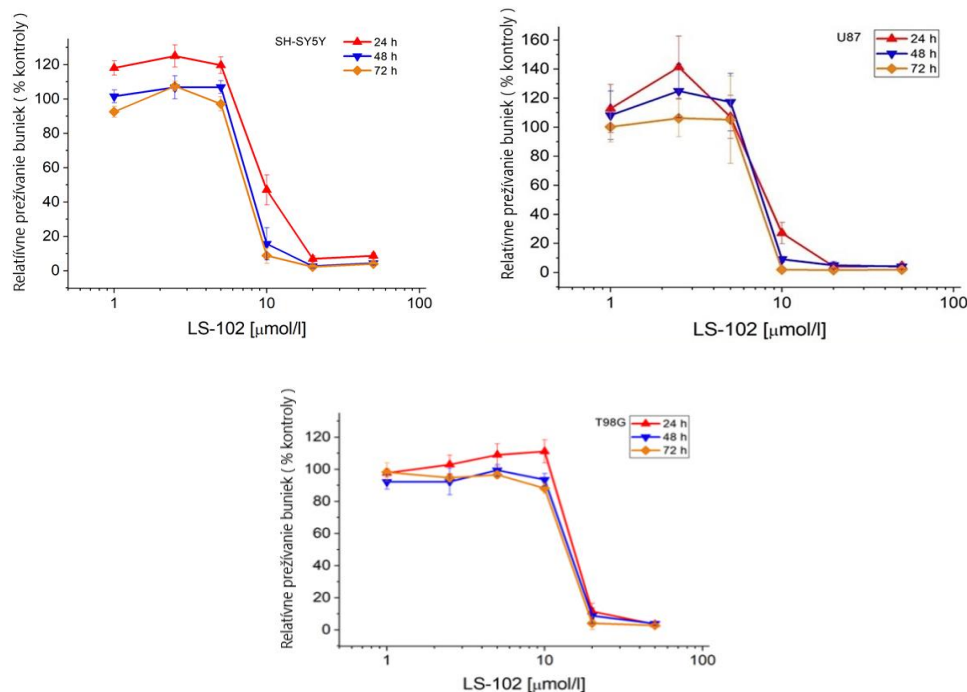
Izolácia RNA. K ovplyvneným bunkám sme pridali TRI reagent (MRC, USA). Izolovanú RNA sme rozsuspendovali vo vode bez nukleáz. Jej kvalitu a kvantitu sme stanovili použitím NanoPhotometer (Implen, DE).

Syntéza komplementárnej DNA a polymerázová reťazová reakcia. Z izolovanej RNA sme pomocou RT2 First Strand Kit syntetizovali komplementárnu DNA podľa odporúčaní výrobcu. Následne sme pripravili PCR reakciu v objeme 20 μ L s použitím primerov špecifických pre XBP1. Teplotný program sme nastavili na prístroji Profesional TRIO Thermocycler (Biometra, DE).

Separácia nukleových kyselín v agarózovom géli. PCR produkty sme separovali pri konštantnom napätí 90 V v agarózovom géli (3%) a výsledok sme vyhodnotili na prístroji Pharos FX™ Plus Molecular Imager (Bio-Rad, DE).

Výsledky

Vplyv LS-102 na relatívne prežívanie buniek SH-SY5Y, U87 a T98G je znázornený na Obr. 1.



Obrázok 1. Bunkové línie boli ošetrované rôznymi koncentraciami LS-102 počas časového intervalu, relatívne prežívanie buniek sa stanovilo MTT testom. Údaje sú prezentované ako priemer \pm S.D. (4 nezávislé experimenty pre každú koncentráciu).

Testovaním prežívania buniek pomocou MTT testu sme zistili zníženie relatívneho prežívania buniek všetkých bunkových línií, ktoré je závislé od koncentrácie LS-102 v bunke. Bunky T98G boli najodolnejšie voči LS-102 a bunky U87 vykazujú najvyššiu citlivosť na LS-102.

Vplyv LS-102 na expresiu HRD1. Bunkové línie sme ošetrili LS-102 v rôznych koncentraciách počas 24 hodín a potom sme hladinu HRD1 analyzovali *Western blotom*. Bola pozorovaná zvýšená hladina proteínu HRD1.

Relatívna expresia HRD1 v bunkových líniách ošetrovaných LS-102. Inkubácia glioblastomových buniek s LS-102 v koncentrácii 10 μ M po dobu 24 h viedla k štatisticky významnému zvýšeniu hladiny HRD1 (242% oproti kontrole). Hladina HRD1 bola zvýšená aj u neuroblastomov. Toto zvýšenie nebolo štatisticky významné.

Efekt LS-102 na zostrih XBP1. Po inhibícii HRD1 sme pozorovali aktiváciu IRE1 α ribonukleázovej aktivity spojenej so zostrihom XBP1 na XBP1s u buniek T98G.

Diskusia so závermi

Malígne ochorenia patria medzi vážne problémy humánnej medicíny, ktoré ovplyvňujú kvalitu a dĺžku života. Jednou z najbežnejších vlastností rakovinových buniek je ich schopnosť lokálne sa šíriť alebo metastázovať do iných tkanív, kde sú špecifické podmienky prostredia - hypoxia, nízka hladina glukózy, nedostatok rastového faktora, oxidačný stres, ktoré ovplyvňujú skladanie proteínov v ER. ERAD a UPR sú dva kľúčové mechanizmy kontroly kvality bielkovín v bunke. ERAD systém je dôležitý determinant normálovej fyziológie buniek a je dôležitým mechanizmom patogenézy. Nedávne štúdie poukázali na to, že ERAD je dôležitý pri udržiavaní fyziologickej homeostázy [7]. V nádorových bunkách je v dôsledku zvýšenej proliferácie zvýšená syntéza bielkovín, čím dochádza k preťaženiu ER. Predpokladá sa aktivácia najmä osi IRE1- XBP1. Aktivita IRE1 α je dôležitá pri tumorigenéze a agresivite u väčšiny druhov rakoviny ako je napr. leukémia, glioblastóm, myelóm, rakovina obličiek, prsníka a spája sa so zlou prognózou. Jedným z výsledkov zvýšenej aktivity dráhy IRE1-XBP1 je zvýšená expresia HRD1, ktorá je nevyhnutná pre proces ERAD [8].

Cieľom projektu bolo preskúmať vplyv inhibície enzýmovej aktivity HRD1 na prežívanie a odpoveď buniek bunkových línií SH-SY5Y , T98G a U87. Použili sme špecifický inhibítor HRD1 (LS-102). Zistili sme, že inhibícia HRD1 vedie k zníženiu prežívania všetkých skúmaných bunkových línií. Glioblastómové bunky U87 vykazujú najvyššiu citlivosť na LS-102, zatiaľ čo glioblastómové bunky T98G boli najodolnejšie voči LS-102. Pozorovali sme významné zvýšenie expresie HRD1 v bunkách T98G a U87. Ošetrovanie buniek T98G pomocou LS-102 vedie k aktivácii dráhy IRE1 α -XBP1 a následnej aktivácii ribonukleázovej aktivity IRE1 α , čo vedie k zostrihu XBP1 na XBP1s. Týmto možno vysvetliť zvýšenú expresiu HRD1 po ošetrovaní buniek inhibítorom HRD1, pretože XBP1s indukuje expresiu HRD1 [9]. Naše výsledky naznačujú, že glioblastómové bunky T98G a U87 odpovedajú na inhibíciu HRD1 prostredníctvom zvýšenej expresie HRD1. Nakoľko ERAD predstavuje esenciálny mechanizmus umožňujúci prežívanie buniek predpokladáme, že zvýšenie expresie HRD1 ako esenciálneho proteínu procesu ERAD predstavuje určitý kompenzačný mechanizmus, ktorým sa bunky snažia vyrovnáť s inhibíciou aktivity HRD1.

Pod'akovanie

Táto štúdia bola podporená grantami UK/60/22 a VEGA 1/0183/.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol* 2015; 17: 829–838. <https://doi.org/10.1038/ncb3184>
- [2] De Bie P, Ciechanover A (2011). Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1393–1402. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.16>

- [3] Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 766–772. <https://doi.org/10.1038/ncb0805-766>
- [4] Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21: 421-438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- [5] McGrath E, Logue S, Mnich K, Deegan S, Jäger R et al. The Unfolded Protein Response in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2018; 10: 344. <https://doi.org/10.3390/cancers10100344>
- [6] Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002; 415: 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>
- [7] Harnoss JM, Le Thomas A, Reichelt M., Guttman O, Wu TD et al. IRE1 α disruption in triple-negative breast cancer cooperates with anti-angiogenic therapy by reversing ER stress adaptation and remodeling the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2020; 80: 2368–2379. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3108>
- [8] Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals Through the Stress Sensor IRE1 α . *Physiol Rev* 2011; 91: 1219–1243. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2011>
- [9] Dibdiakova K, Saksonova S, Pilchova I, Klacanova K, Tatarkova Z et al. Both thapsigargin- and tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress increases expression of Hrd1 in IRE1-dependent fashion. *Neurol Res* 2019; 41: 177-188. <https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1547856>

DETEKCIA ZÁRODOČNÝCH PATOGÉNNÝCH VARIANTOV U SLOVENSKÝCH RÓMSKÝCH ONKOLOGICKÝCH PACIENTOV - PILOTNÁ ŠTÚDIA



Nikola Janoštiaková^{1,2}, Dominik Kodada^{1,2}, Oliver Petrovič², Michaela Hýblová², Mária Rečková^{3,4}, Michal Mego⁵, Vanda Repiská¹, Gabriel Minárik²

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava, Bratislava, Slovensko,

²Medirex Group Academy, Nitra, Slovensko,

³Národný onkologický ústav, Bratislava, Slovensko,

⁴POKO Poprad s.r.o., Poprad, Slovensko,

⁵II. Onkologická klinika LF UK a NOÚ, Bratislava, Slovensko

Úvod

Rómovia predstavujú na Slovensku druhú najpočetnejšiu národnostnú menšinu s odhadovaným počtom okolo 440 000 obyvateľov, čo tvorí približne 8 % populácie [1]. Napriek ich početnosti chýbajú systematické údaje o prevalencii rôznych ochorení, vrátane onkologických, v tejto národnostnej skupine. Získanie komplexného obrazu o chorobnosti rómskej populácie je však kľúčové pre efektívnu prevenciu, diagnostiku a liečbu ochorení [2].

Rozvoj onkologických ochorení je komplexný proces, na ktorom sa podieľajú rôzne faktory, ako sú fajčenie, nezdravá strava, expozícia karcinogénom a genetická predispozícia. Genetické faktory zohrávajú dôležitú úlohu pri vzniku rakoviny, a to buď priamo, v podobe dedičných génových mutácií, alebo nepriamo, v podobe polymorfizmov, ktoré ovplyvňujú individuálnu susceptibilitu voči rôznym karcinogénom [3].

Mismatch repair gény (MMR) sú kľúčové pre udržanie stability genómu a zabraňujú vzniku, resp. hromadeniu mutácií. Patogénne mutácie v génoch MMR vedú k dysfunkcii reparačných mechanizmov a kumulácii mutácií v bunkách, čo môže následne viesť k rozvoju rôznych typov malígnych ochorení [4].

Jedným z najvýznamnejších syndrémov súvisiacich s dysfunkciou génov MMR je Lynchov syndróm, dedičné ochorenie, ktoré zvyšuje riziko vzniku rôznych typov onkologických ochorení, vrátane kolorektálneho karcinómu, endometriálneho karcinómu, karcinómu žalúdka, močovodov, tenkého čreva či ovariálneho karcinómu [5]. Pri Lynchovom syndróme sú kauzálnymi dedičné mutácie v génoch MMR - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2* [6].

Rómovia predstavujú geneticky odlišnú subpopuláciu s vlastným genetickým profilom, ktorý sa líši od majoritnej slovenskej populácie. Táto genetická odlišnosť môže viesť k odlišným frekvenciám genetických mutácií, vrátane mutácií v génoch



MMR. Existuje predpoklad, že Rómovia by mohli mať zvýšenú prevalenciu patogénnych mutácií v génoch MMR a s tým súvisiace vyššie riziko vzniku Lynchovho syndrómu [7].

Cieľom tejto štúdie je identifikovať súbor mutácií súvisiacich s rakovinou v slovenskej rómskej populácii. Očakávame, že táto štúdia identifikuje aj súbor mutácií v génoch MMR u slovenskej rómskej populácie a poskytne cenné informácie o prevalencii a type týchto mutácií. Získané poznatky by mali prispieť k lepšiemu pochopeniu genetických faktorov ovplyvňujúcich rozvoj onkologických ochorení u Rómov a k rozvoju cielej prevencie a personalizovanej medicíny pre túto etnickú skupinu.

Materiál a metódy

Do štúdie boli zahrnuté vzorky 43 onkologických pacientov vo veku 37-77 rokov rómskeho etnika bez známych príbuzenských vzťahov s rozličnými diagnostikovanými typmi nádorových ochorení, a to: karcinóm pľúc a priedušiek, kolorektálny karcinóm, karcinóm vaječníkov, maternice, krčka maternice, prostaty, mäkkých a spojivových tkanív, mandlí (Obr. 1). Z periférnej krvi bola pomocou komerčne dostupnej súpravy *DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)* izolovaná genomická DNA, z ktorej boli ďalej pripravené NGS knižnice pre ciele resekvenovanie pomocou nami dizajnovaného génového panelu pokrývajúceho kódujúce oblasti 108 vybraných génov. Pri príprave knižníc sme použili komerčne dostupný kit a protokol *SureSelect XT HS2 DNA System (Agilent Technologies)*. Získané sekvenáčne dáta boli následne bioinformaticky spracované a zanalyzované. Na filtrovanie a anotáciu variantov s cieľom detekcie patogénnych/ pravdepodobne patogénnych variantov so zameraním sa na zárodočné mutácie súvisiace s nádorovými ochoreniami bola využitá komerčne prístupná platforma *Qiagen Clinical Insight (Qiagen)*.



Obrázok 1. Typy a počet prípadov jednotlivých karcinómov prítomných u pacientov zahrnutých do štúdie.

Výsledky

V súvislosti s typom prítomného nádoru a frekvenciou identifikovaných variantov/ mutácií boli patogénne, resp. pravdepodobne patogénne varianty/ mutácie detegované v 16 z 22 prípadov karcinómu pľúc a priedušiek, 4 z 10 prípadov kolorektálnych karcinómov, 3 z 5 prípadov karcinómov vaječníkov, 2 z 2 prípadov karcinómov maternice a 1 z 1 prípadu karcinómu krčka maternice (Obr. 2).

Najpočetnejšie patogénne, resp. pravdepodobne patogénne génové varianty boli obsiahnuté v géne *MSH6* – 3-krát v prípadoch karcinómu vaječníkov, 1-krát v prípade karcinómu krčka maternice a 6-krát v prípadoch karcinómov pľúc či priedušiek. Ďalej sme identifikovali patogénne, resp. pravdepodobne patogénne varianty v géne *MLH1* v troch prípadoch – 2-krát prípad karcinómu pľúc či priedušiek, 1-krát prípad karcinómu maternice; v géne *ATM* v dvoch prípadoch – 2-krát prípady kolorektálnych karcinómov, v géne *CHEK2* v dvoch prípadoch – 1-krát prípad karcinómu pľúc či priedušiek, 1-krát prípad karcinómu maternice; v géne *NF1* v dvoch prípadoch – 1-krát prípad karcinómu pľúc či priedušiek, 1-krát prípad kolorektálneho karcinómu; v géne *MSH2* v dvoch prípadoch – 2-krát prípad karcinómu pľúc či priedušiek. V génoch *NTHL1*, *SOS1*, *FANCM*, *CDH7B*, *BRCA2* boli detegované patogénne, resp. pravdepodobne patogénne mutácie po jednom prípade – takmer všetky prípady predstavovali karcinómy pľúc či priedušiek, pri géne *NTHL1* išlo o prípad kolorektálneho karcinómu (Tab. 1).

V 21 % vyšetovaných vzoriek (9 vzoriek) sme nedetegovali žiadnu suspektnú mutáciu – patogénnu, pravdepodobne patogénnu ani variant neznámej signifikancie.



Obrázok 2. Počet patogénnych, resp. pravdepodobne patogénnych mutácií v nich detegovaných pri jednotlivých diagnostikovaných typoch karcinómov.

Tabuľka 1. Patogénne, resp. pravdepodobne patogénne varianty detegované v jednotlivých génoch a typoch karcinómov. Prot. variant – proteínový variant; Het – heterozygotita; Hom – homozygotita; Pr. patogénny – pravdepodobne patogénny variant.

Gén	Transkript ID	Nukleotidový variant	Prot. variant	Zygotita	Klasifikácia
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.3261dupC	p.F1088fs*5	Het	Patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	C.3198_3199delTA	p.Y1066*	Het	Patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.2194C>T	p.R732*	Het	Patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.2764C>T	p.R922*	Het	Patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.1754T>C	p.L585P	Het	Pr. patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.1754T>C	p.L585P	Het	Pr. patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.2764C>T	p.R922*	Het	Patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.2804_2805delCT	p.S935*	Het	Patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.2194C>T	p.R732*	Het	Patogénny
<i>MSH6</i>	NM_000179.3	c.2764C>T	p.R922*	Het	Patogénny
<i>MLH1</i>	NM_000249.4	c.1171C>T	p.Q391*	Het	Patogénny
<i>MLH1</i>	NM_000249.4	c.1171C>T	p.Q391*	Het	Patogénny
<i>MLH1</i>	NM_000249.4	c.2135G>A	p.W712*	Het	Patogénny
<i>ATM</i>	NM_000051.4	c.1010G>A	p.R337H	Het	Pr. patogénny
<i>ATM</i>	NM_000051.4	c.1010G>A	p.R337H	Het	Patogénny
<i>CHEK2</i>	NM_001005735.2	c.599T>C	p.1200T	Het	Patogénny
<i>CHEK2</i>	NM_001005735.2	c.599T>C	p.1200T	Het	Patogénny
<i>MSH2</i>	NM_000251.3	c.488T>G	p.V163G	Het	Patogénny
<i>MSH2</i>	NM_000251.3	c.813_822delTGCGGTAATC	p.A272fs*3	Het	Pr. patogénny
<i>NF1</i>	NM_000267.3	c.2065G>A	p.V689M	Het	Pr. patogénny
<i>NF1</i>	NM_000267.3	c.2065G>A	p.V689M	Het	Pr. patogénny
<i>BRCA2</i>	NM_000059.4	c.9699_9702delTATG	p.C3233fs*15	Het	Patogénny
<i>CHD7</i>	NM_017780.4	c.4688G>A	p.R1563K	Het	Pr. patogénny
<i>FANCM</i>	NM_001308133.2	c.5023C>T	p.Q1675*	Het	Patogénny
<i>SOS1</i>	NM_005633.4	c.2156G>C	p.G719A	Het	Pr. patogénny
<i>NTHL1</i>	NM_001318193.2	c.244C>T	p.Q82*	Hom	Patogénny

Diskusia

Naša štúdia prináša cenné informácie o prevalencii a type genetických variantov génov súvisiacich s nádorovými ochoreniami, vrátane MMR génov u slovenských rómskych pacientov s onkologickým ochorením. Po zameraní sa na patogénne, resp. pravdepodobne patogénne varianty sme detegovali 26 rôznych variantov. V géne *MSH6* sme detegovali najviac takýchto variantov (10), nasledovali *MLH1* (3), *ATM* (2), *CHEK2* (2), *MSH2* (2), *NF1* (2), *BRCA2* (1), *CDH7* (1), *FANCM* (1), *SOS1* (1), *NTHL1* (1). Tieto varianty pravdepodobne zohrali úlohu pri rozvoji onkologického ochorenia. Zvlášť dôležitá je identifikácia patogénnych, resp. pravdepodobne patogénnych variantov v MMR génoch súvisiacich s Lynchovým syndrómom (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*). Ako už bolo spomenuté, Lynchov syndróm je dedičná forma ochorenia, ktorá významne zvyšuje riziko vzniku rôznych typov onkologických ochorení, vrátane kolorektálneho karcinómu – v našej kohorte pacientov sme mali 10 prípadov kolorektálnych karcinómov. Ide o najčastejší typ rakoviny asociovaný s Lynchovým syndrómom. Pacienti s Lynchovým syndrómom majú až 80 % riziko vzniku kolorektálneho karcinómu v priebehu života [8].

Rómovia predstavujú najpočetnejšiu geneticky odlišnú subpopuláciu Slovenska. Táto genetická odlišnosť, v kombinácii s reprodukčnou izoláciou niektorých rómskych komún [9], môže viesť k vyššej prevalencii určitých genetických mutácií a biologických rozdielov v porovnaní s majoritnou populáciou. Naša štúdia sa zamerala na rómskych pacientov bez vzájomných príbuzenských väzieb, avšak doteraz sme neanalyzovali asociáciu výsledkov s demografickými a klinickými charakteristikami pacientov. Medzi limity našej práce patrí chýbajúca kontrolná skupina nerómskych pacientov a relatívne malá vzorka pacientov. V budúcnosti plánujeme tieto limity odstrániť, čo nám pomôže komplexnejšie pochopiť vplyv genetických variantov, vrátane variantov MMR génov, na rozvoj onkologických ochorení u slovenských rómskych pacientov a k zlepšeniu personalizovanej medicíny pre túto etnickú skupinu.

Samostatná kategorizácia rómskeho etnika v genetických výskumoch vyvoláva etické otázky a môže byť vnímaná ako forma diskriminácie. Je dôležité zdôrazniť, že cieľom takýchto výskumov nie je stigmatizácia Rómov, ale snaha o lepšie pochopenie ich genetického profilu a identifikácia rizikových faktorov pre rozvoj onkologických a iných ochorení [10]. Získané poznatky by mali následne slúžiť na zlepšenie prevencie, diagnostiky a liečby u rómskych pacientov.

Pod'akovanie

Projekt vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Úrad splnomocnenca vlády SR pre rómske komunity. <https://www.romovia.vlada.gov.sk/atlas-romskych-komunit/atlas-romskych-komunit-2019/> (Dostupné online 3.4.2024).
- [2] Reckova M, Mardiak J, Plank L, Vulevova M, Cingelová S et al. Differences in Incidence and Biological Characteristics of Breast Cancer between Roma and Non-Roma Patients in Slovakia. *Klin Onkol* 2017; 30: 48-54. <https://doi.org/10.14735/amko201748>
- [3] Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008; 25: 2097-2116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>
- [4] Cohen SA, Leininger A. The genetic basis of lynch syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet* 2014; 22: 147–158. <https://doi.org/10.2147/TACG.S51483>
- [5] Stoffel EM, Yurgelun MB, Boland CR. Lynch syndrome. pp 3-19. In *Hereditary Colorectal Cancer: Genetic Basis and Clinical Implications*, Springer Cham, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74259-5_1
- [6] Zumstein V, Vinzens F, Zettl A, Heinimann K, Koeberle D et al. Systematic immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer: a single centre experience of 486 patients. *Swiss Med Wkly* 2016; 146:14315. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14315>
- [7] Arani N, Hancock IF. Cancer Epidemiology in Romani-Americans: A Review of the Current Literature. *Inquiries J* 2021; 13.10. <http://www.inquiriesjournal.com/a?id=1916>
- [8] Rubenstein JH, Enns R, Heidelbaugh J, Barkun A, Adams MA et al. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology* 2015; 149: 777-782. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.036>
- [9] Koupilová I, Epstein H, Holcík J, Hajioff S, McKee M. Health needs of the Roma population in the Czech and Slovak Republics. *Soc Sci Med* 2001; 53: 1191-1204. [https://doi.org/10.1016/s0277-9536\(00\)00419-6](https://doi.org/10.1016/s0277-9536(00)00419-6)
- [10] Ena GF, Aizpurua-Iraola J, Font-Porterías N, Calafell F, Comas D. Population Genetics of the European Roma-A Review. *Genes (Basel)* 2022; 13: 2068. <https://doi.org/10.3390/genes13112068>

MITOCHONDRIA IN TESTICULAR GERM CELL TUMORS: MORE THAN JUST A POWERHOUSE?



Pavlína Kabelíková, Danica Ivovič, Dana Jurkovičová

*Biomedical Research Center of the Slovak Academy of Sciences,
Dúbravská cesta 9, 845 05, Bratislava, Slovak Republic*

Úvod

Testikulárne nádory zo zárodočných buniek (TGCT) sú pomerne zriedkavé zhubné ochorenie, ide však o najčastejšiu solídnu malignitu mladých mužov vo veku od 14 až 44 rokov [1]. Aj napriek zapojeniu niektorých genetických faktorov, TGCT zjavne nie sú ochorením charakterizovaným významným počtom nahromadených mutácií ako pozorujeme vo väčšine solídnych nádorov a zdá sa, že doteraz známe genetické zmeny dostatočne nevysvetľujú iniciáciu a jedinečnú liečiteľnosť TGCT [2]. Terapeutická rezistencia malígnych buniek býva často spojená aj s chybami v ich apoptotickom programe. Úspešná eliminácia nádorových buniek preto vo veľkej miere závisí od schopnosti liečby stimulovať potlačené apoptotické dráhy a mitochondrie sú sľubným cieľom takéhoto prístupu [3]. Je známe, že CDDP sa hromadí v mitochondriách a tiež tvorí adukty s mitochondriálnou DNA a proteínmi, čo spôsobuje dereguláciu niekoľkých ich kľúčových funkcií. V mnohých prípadoch však poškodené mitochondrie nevedú k apoptóze, prežívajú a môžu akumulovať veľa mutácií. Pri rakovine boli zistené početné mutácie v mtDNA, ktoré neinaktivujú mitochondriálne funkcie, ale práve naopak menia energetický metabolizmus v prospech rastu rakovinových buniek [4]. Mitochondrie taktiež predstavujú energetickú zásobáreň bunky, zabezpečujú produkciu ATP prostredníctvom oxidačnej fosforylácie (OXPHOS). Regulácia dýchania je vysoko koordinovaný proces, ktorý musí zabezpečiť produkciu, zostavovanie a funkciu mitochondrií, aby uspokojil energetické potreby organizmu [5]. Enzýmy zahrnuté v OXPHOS sú multipodjednotkové komplexy kódované jadrovou aj mitochondriálnou DNA. Pre odhalenie príčin chemorezistencia je preto dôležité identifikovať genetické zmeny v jadre i mitochondriách a pochopiť princípy ich vzájomnej komunikácie.

Materiál a metódy

V našich analýzach sme použili TGCT bunkové línie s rôznym stupňom endogénnej a získanej rezistencia voči CDDP: senzitivnu 2102EP a rezistentné - bunkové línie 1411HP, 1777NRpmet. Bunkové línie boli kultivované v RPMI-1640 médiu s 10% fetálnym hovädzím sérom (FBS), penicilínom (100 units/mL) a streptomycínom (10 μ L/mL) pri 37 °C v 5 % CO₂.



Sekvenovanie Novej Generácie (NGS): Na extrakciu celkovej RNA z bunkových kultúr sa použil roztok TRI reagent činidla. Celková kvantifikácia RNA a čistota boli hodnotené v spektrofotometri NanoDrop™ Lite a fluorometri Qubit. Integrita RNA bola hodnotená pomocou bioanalyzátoru Agilent 2100. Pomocou súpravy Twist Library Preparation Kit a súpravy Twist Enrichment Panel Kit bola z extrahovanej celkovej RNA pripravená knižnica, ktorá bola následne sekvenovaná pomocou Illumina iSeq. Mutácie mitochondriálneho genómu jednotlivých TGCT bunkových línií boli identifikované a analyzované pomocou softvéru Illumina, validované pomocou IGV a MITOMAP a bioinformaticky a štatisticky vyhodnotené.

Mitochondriálne dýchanie: Mitochondriálne dýchanie bolo stanovené pomocou oxygrafu OROBOROS. Analýza respiračného reťazca je založená na titracii substrátov v oxygrafickej komore, zatiaľ čo spotreba O₂ sa zobrazovala na oxygrafe. Bunky boli pred meraním trypsinizované a resuspendované v PBS. Následne boli bunky napipetované do oxygrafickej komory spolu s jednotlivými substrátmi. Výsledky boli normalizované na aktivitu citrát syntázy.

Výsledky a Diskusia

V práci sme stanovili mutačný profil mitochondriálneho genómu rezistentných/senzitívnych TGCT bunkových línií.

Tab.1 sumarizuje identifikované zmeny v špecifických pozíciách, ktoré sa nachádzajú najmä v sekvenciách respiračných génov. Niektoré mutácie (polymorfizmy, SNP) už boli popísané, ale naša analýza odhalila aj nové doteraz nepopísané mutácie v týchto bunkových líniách. V metastatickej bunkovej línií 1777NRpmet sme identifikovali najvyšší počet mutácií v porovnaní s citlivou líniou 2102 EP. Novo identifikované varianty boli lokalizované v génoch *RNRI*, *RNR2*, *COXI* a *COX3*. V metastatickej línií 1411HP sme identifikovali nové, doteraz nepopísané mutácie lokalizované v génoch *ND1*, *ND3* a *ND5*. Obe metastatické línie TGCT sú veľmi zaujímavé, pretože ako jediné vykazujú mutácie v géne *ATP6*, komplexe V dýchacieho reťazca, ktorý je dôležitý pre produkciu ATP.

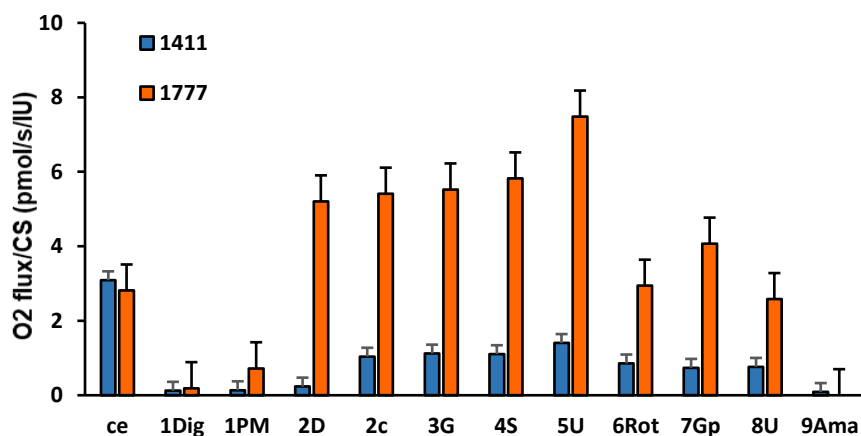
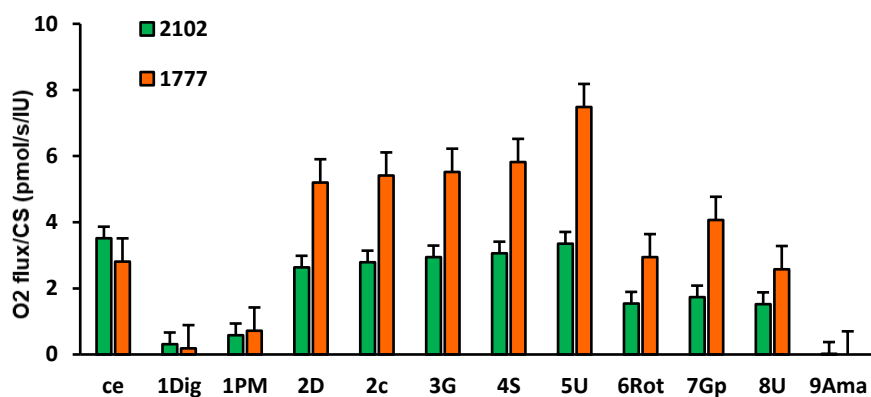
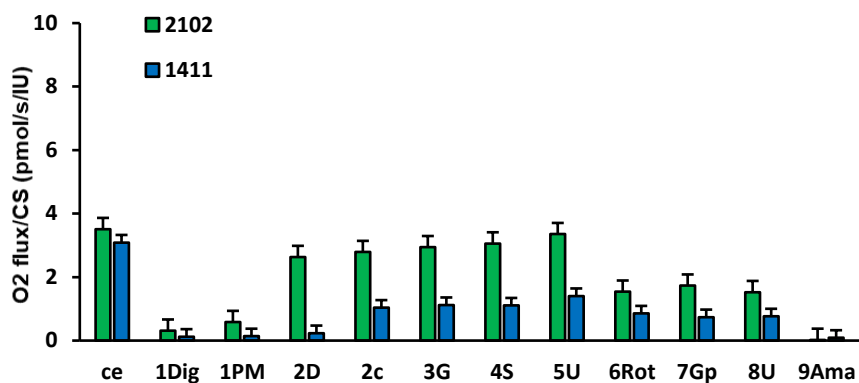
Keďže väčšina identifikovaných mutácií sa nachádzala v génoch dýchacieho reťazca, porovnali sme respiračnú aktivitu vybraných bunkových línií TGCTs pomocou OROBOROS oxygrafu. Analýza funkcie dýchacieho reťazca odhalila medzi líniami významné rozdiely, a to aj medzi rezistentnými bunkovými líniami navzájom. Z grafov môžeme vidieť, že najväčšie spotreby O₂, počas prídavku jednotlivých substrátov, vykazovala 1777NRpmet rezistentná TGCT bunková línia. Najväčšie rozdiely pozorujeme v substrátoch ADP, Cyt C, Glutamát a Sukcinát. ADP je substrátom komplexu V, dôležitý pre kontrolu aktivity tohto komplexu. Dôležitá je ale taktiež aj aktivita komplexu I, nakoľko produkcia ATP závisí aj od aktivity komplexu I, a teda či je OXPHOS aktívna. Cyt C je substrát na kontrolu funkcie komplexu IV, pridávaný na overenie aktivity OXPHOS, ale taktiež aj na test integrity vonkajšej mitochondriálnej membrány (MOM). Cyt C vstupuje do oxidačnej časti dýchacieho reťazca ako substrát pre COX (cytochróm c oxidáza) jedno z hlavných regulačných miest pre oxidačnú fosforyláciu. Glutamát je substrátom komplexu I, pridávaný pre jeho aktiváciu a funkciu tohto komplexu. Sukcinát, substrát pre sukcinát dehydrogenátu (komplex II), je dôležitý

pre dýchanie závislé od aktívneho komplexu II. Regulácia dýchania je teda vysoko koordinovaný proces, ktorý musí zabezpečiť produkciu, zostavovanie a funkciu mitochondrií, aby uspokojil energetické potreby organizmu.

Tabuľka 1. Variabilita identifikovaná porovnaním rezistentných TGCT bunkových línií s citlivou TGCT bunkovou líniou.

SENSITIVE CELL LINE	RESISTANT CELL LINE	POSITION	REF	ALT	RS_ID	ANNO GENE
2102EP	1411 HP	8856	G	A	rs878853078	ATP6
		10211	C	T	.	ND3
		10389	T	C	.	ND3
		12360	C	T	.	ND5
		12417	-	A	.	ND5
		16519	T	C	rs3937033	TRNP
	1777 NRpmet	73	A	G	rs869183622	RNR1
		195	T	C	rs2857291	RNR1
		709	G	A	rs2853517	RNR1
		1542	T	C	.	RNR1
		1888	G	A	rs2897260	RNR2
		2706	A	G	rs2854128	RNR2
		3086	T	C	.	RNR2
		4216	T	C	rs1599988	ND1
		4917	A	G	rs28357980	ND2
		6931	G	A	.	COX1
		7028	C	T	rs2015062	COX1
		8697	G	A	rs879233543	ATP6
		9812	C	T	.	COX3
		10463	T	C	rs28358279	TRNR
		11251	A	G	rs869096886	ND4
		11719	G	A	rs2853495	ND4
		12633	C	A	rs3926883	ND5
		13368	G	A	rs3899498	ND5
		14766	C	T	rs193302980	CYTB
		14905	G	A	rs193302983	CYTB
		15452	C	A	rs193302994	CYTB
		15607	A	G	rs193302996	CYTB
		15928	G	A	rs527236198	TRNT
		16519	T	C	rs3937033	TRNP

(REF- referenčná alela, ALT- zistená alternatívna alela, rs_id- ID známeho polymorfizmu, bodka/ „-“ - neznámy polymorfizmus, anno GENE- anotácia génu, kde bol polymorfizmus zistený)



Obrázok 1. Porovnanie toku O₂ mitochondriálnej respirácie v TGCT rezistentných a citlivých bunkových líniah. Údaje sú prezentované ako priemerný tok O₂/CS CDDP-rezistentných 1777NRpmet a 1411HP bunkových línii verzus citlivej 2102EP TGCT bunkovej línie zo štyroch až šiestich biologických replikátov.

V metastatickej 1777NRpmet TGCT bunkovej línii sme identifikovali najväčší počet mutácií, ktorý môžeme asociovať s aktivitou dýchacieho reťazca a pozorovaným najväčším nárastom spotreby O₂ (Obr. 1). Novo identifikované mutácie boli identifikované v *COX I* a *COX III* génoch (komplex IV- cytochróm C) a mohli by byť asociované aj s týmto nárastom spotreby O₂. Zaujímavé je, že druhá metastatická TGCT bunková línia 1411HP vykazovala opačný trend v porovnaní s 1777NRpmet. V tejto línii sme identifikovali 4 nové mutácie nachádzajúce sa v *ND3* a *ND5* (komplex I- Glutamát). Komplex I spolu s komplexom III a IV predstavujú elektrónové pumpy, a preto mutácie nachádzajúce sa v komplexe I by mohli byť zodpovedné za významný pokles spotreby O₂ (Obr.1). Odlišné správanie TGCT bunkových línii nás vedie k ďalším analýzám, v ktorých sa chceme zamerať na charakterizáciu funkčnosti jednotlivých komplexov dýchacieho reťazca. Lepšie pochopenie komplexnej úlohy mitochondrií v progresii rakoviny a terapeutickú odpoveď by mohlo poskytnúť široké portfólio nových potenciálnych biomarkerov a terapeutických cieľov, pre TGCT pacientov rezistentných na CDDP.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (grant č. APVV-19-0286) a Vedeckou grantovou agentúrou Slovenskej republiky (grant č. VEGA-2/0056/21).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ottaviano M, Giunta E, Rescigno P, Pereira Mestre R, Marandino L et al. The Enigmatic Role of TP53 in Germ Cell Tumours: Are We Missing Something? *Int J Mol Sci* 2021; 22: 7160. <https://doi.org/10.3390/ijms22137160>
- [2] Adra N, Einhorn LH. Testicular cancer update. *Clin Adv Hematol Oncol* 2017; 15: 386.
- [3] Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol* 2008; 18: 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.01.006>
- [4] Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 2006; 91: 807-819. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.033506>
- [5] Gammage PA, Frezza C. Mitochondrial DNA: the overlooked oncogenome? *BMC Biol* 2019; 17: 53. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0668-y>

SLAMF3 RECEPTOR AKO POTENCIÁLNY TERAPEUTICKÝ CIEĽ U VYBRANÝCH HEMATOLOGICKÝCH MALIGNÍT



Dominik Kľoc, Marek Šarišský

Ústav farmakológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice

Úvod

Napriek stále sa rozširujúcim možnostiam terapie zostávajú hematologické malignity ako CLL (chronická lymfocytová leukémia) a MM (mnohopočetný myelóm) nevyliciteľné. Aj z tohto dôvodu je hľadanie nových terapeutických cieľov a liečebných stratégií predmetom výskumu mnohých vedeckých tímov. Hľadanie a identifikácia nových špecifických antigénov exprimovaných patologickými bunkami môže mať diagnostický, diferenciálne diagnostický, prognostický a potenciálny terapeutický význam. Jednými z takýchto antigénov môžu byť aj SLAMF (Signaling lymphocytic activation molecules family) receptory.

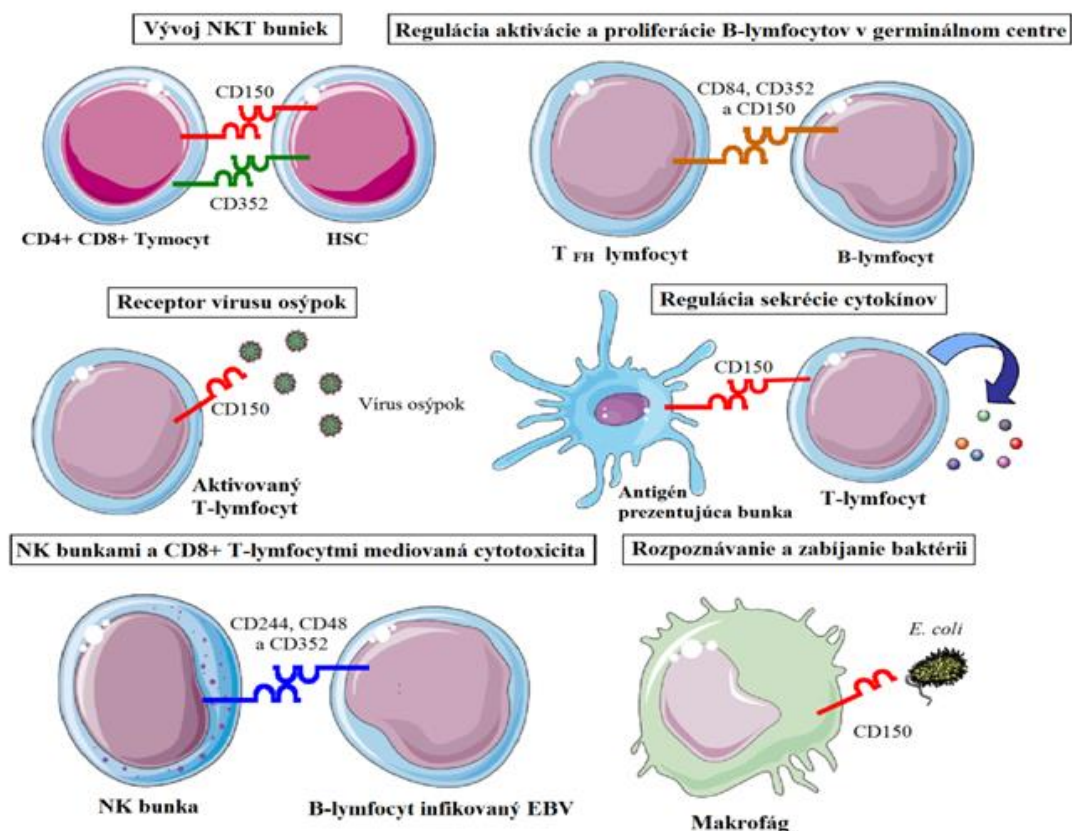
SLAMF receptory

SLAMF receptory sú súčasťou superrodiny imunoglobulínov (Ig) a pozostávajú z deviatich transmembránových glykoproteínov SLAMF1 (CD150), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (CD229), SLAMF4 (CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (CD352), SLAMF7 (CD319), SLAMF8 (CD353) a SLAMF9 (CD84H1). Sú zložené z extracelulárnych domén IgV a IgC2 s vysokou samoafinitou (selfligand) prostredníctvom väzby IgV-IgV. Na rozdiel od ostatných SLAMF receptorov, SLAMF2 a SLAMF4 nie sú selfligandy, ale viažu sa medzi sebou navzájom [viď prehľad 1]. SLAMF receptory sú exprimované na väčšine hematopoetických buniek a zohrávajú dôležitú úlohu v počiatkoch aj v neskorších fázach hematopoézy. Slúžia ako adhézne molekuly na povrchu hematopoetických buniek a čiastočne kontrolujú určité vrodené a adaptívne imunitné mechanizmy. Väzbové páry receptor-ligand ovplyvňujú nielen reguláciu proliferácie, cytotoxicitu, produkciu cytokínov T lymfocytmi, ale taktiež majú vplyv na cytotoxickú aktivitu NK (natural killer) buniek, aktiváciu B lymfocytov a generovanie imunitnej pamäte. Okrem toho majú vplyv aj na reguláciu prežívania neutrofilov, makrofágov a agregáciu krvných doštičiek [2,3].

Väčšina z týchto receptorov vykazuje rozdiely v expresii medzi normálnymi zdravými a patologickými bunkami u viacerých hematologických malignít vrátane CLL a MM. U CLL sú SLAMF1, SLAMF2 a SLAMF7 na patologických bunkách downregulované, zatiaľ čo SLAMF3, SLAMF5 a SLAMF6 sú upregulované [5].



U pacientov s MM malígne plazmatické bunky silne exprimujú SLAMF2, SLAMF3, SLAMF6 a SLAMF7. Naproti tomu expresia SLAMF1, SLAMF4 a SLAMF5 je obmedzená a SLAMF8 a SLAMF9 nie sú pri tomto ochorení zatiaľ popísané [6].



Obrázok 1. Funkcie SLAMF receptorov, Zdroj: Vlastný obrázok podľa [4].

Receptory, ktoré sú v zvýšenej miere exprimované, by sa mohli stať potenciálnym cieľom pre vývoj nových terapií CLL a MM. To, že SLAMF receptory môžu byť užitočné terapeutické ciele dokazuje aj už registrovaná anti-SLAMF7 monoklonová protilátka elotuzumab, ktorá je určená na použitie v kombinovanej liečbe relabovaného/refraktérneho MM. Vázba elotuzumabu na SLAMF7 receptor na patologickej bunke a NK bunke vedie k vyvolaniu ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) a zvýšeniu cytolytickej funkcie NK bunky [7]. V predklinických štúdiách boli ako potenciálne terapeutické ciele skúmané aj receptory SLAMF2 a SLAMF6. Myšacia anti-humánna SLAMF2 monoklonová protilátka významne inhibovala rast nádorových buniek u SCID (severe combined immunodeficiency disease) myší, ktorým boli naočkované MM bunky. Zároveň liečba anti-SLAMF2 inhibovala aj rast MM buniek transplantovaných priamo do myšacej kostnej drene. Anti-SLAMF2 monoklonová protilátka indukovala miernu ADCC, ale zato výraznú CDC (Complement-dependent cytotoxicity) [8]. Anti-SLAMF6 protilátky boli skúmané na myšacích modeloch po transplantácii agresívneho bunkového klonu myšacej CLL

(TCL1-192), myšacieho B bunkového lymfómu LMP2A/λMyc, a humánných MEC-1 a OSU-CLL bunkových línií. V štúdiu zistili, že po jednej injekcii monoklonovej protilátky proti SLAMF6 receptoru došlo k spomaleniu progresie CLL buniek v slezine, kostnej dreni a krvi, ale nie v peritoneálnej dutine a omente. Kombinácia anti-SLAMF6 protilátky a inhibítora Brutonovej tyrozínkinázy, ibrutinibu pôsobila synergicky a účinne eliminovala nádorové bunky aj v peritoneálnej dutine. Údaje z tejto štúdie naznačujú, že odstránenie patologických buniek závisí od ADCC vyvolanej anti-SLAMF6 a kostimulácie BCR (B-cell receptor) signalizácie, ktorá je dôležitá pre progresiu CLL [9].

SLAMF3

Jedným z potenciálnych terapeutických cieľov môže byť aj SLAMF3 receptor, ktorý je exprimovaný na patologických bunkách hematologických malignít ako sú bunky CLL, DLBCL (diffuse large B cell lymphoma), MCL (mantle cell lymphoma), folikulového lymfómu, lymfómu marginálnej zóny, vlasatobunkovej leukémie a MM [1]. Naše výsledky z predchádzajúcich štúdií preukázali, že SLAMF3 je overexprimovaný pri CLL v porovnaní so zdravými B lymfocytmi [5]. SLAMF3 môže fungovať ako jedinečný TAA (tumor associated antigen), a prezentácia SLAMF3 bunkami hlavného histokompatibilného komplexu môže umožňovať expanziu nádorovo špecifických T buniek [11]. Zároveň nadmerná expresia SLAMF3 receptora predstavuje negatívny prognostický marker a je spojená s kratším prežívaním pacientov [10]. V nedávnej štúdiu bolo zistené, že SLAMF3 a SLAMF4 receptory sú imunitné kontrolné body, ktoré inhibujú fagocytózu makrofágov. Delécia týchto SLAMF receptorov významne zvýšila fagocytózu CD19-pozitívnych hematopoetických cieľov [12]. Aj na základe týchto poznatkov je možné tvrdiť, že SLAMF3 môže predstavovať sľubný terapeutický cieľ liečby pacientov s CLL.

Taktiež u MM bola pozorovaná zvýšená expresia SLAMF3 u myelómových buniek v porovnaní s normálnymi plazmatickými bunkami. Expresia SLAMF3 je stabilná, bez ohľadu na štádium/progresiu ochorenia alebo fenotyp myelómových buniek. Čiže SLAMF3 môže slúžiť ako špecifický marker MM buniek a tak umožňovať identifikáciu myelómových buniek prietokovou cytometriou. Downregulácia SLAMF3 u myelómových buniek pomocou siRNA viedla k zníženiu počtu životaschopných myelómových buniek a zvýšilo to protinádorovú aktivitu konvenčných chemoterapeutík [13,14]. Tieto zistenia naznačujú, že SLAMF3 možno považovať za potenciálny terapeutický cieľ pre liečbu MM.

Záver

Ďalší výskum je potrebný na objasnenie úlohy SLAMF3 receptora v patogenéze CLL, MM a iných B bunkových hematologických malignít. Výskum a vývoj anti-SLAMF3 protilátok a ich schopnosti vyvolať od protilátok závislú cytotoxicitu (ADCC), od protilátok závislú bunkovú fagocytózu (ADCP) alebo cytotoxicitu závislú od komplementu (CDC) by mohli priniesť nové terapeutické možnosti pre pacientov so SLAMF3-pozitívnymi B bunkovými hematologickými malignitami.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla s podporou projektov VVGS-2023-2747 a VEGA 1/0617/22.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kl'oc D, Kurhajec S, Huniadi M, Sýkora J, Guman T et al. SLAM Family Receptors in B Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders. *Int J Mol Sci* 2024; 25: 4014. <https://doi.org/10.3390/ijms25074014>
- [2] Detre C, Keszei M, Romero X, Tsokos GC, Terhorst C. SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 157-171. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0193-0>
- [3] Ma CS, Nichols KE, Tangye SG. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 337-379. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141651>
- [4] Sintes J, Bastos R, Engel P. SLAM Family Receptors and Autoimmunity. pp 1 - 22. In: *Autoimmune Disorders – Pathogenetic Aspects*. Clio P. Mavragani (Ed.) 2011, p 506. <https://doi.org/10.5772/20641>
- [5] Coma M, Tothova E, Guman T, Hajikova M, Giertlova M et al. Altered expression pattern of SLAM family receptors on pathological B cells of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2017; 58: 1726 - 1729. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1251593>
- [6] Ishibashi M, Morita R, Tamura H. Immune Functions of Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Molecules in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 279. <https://doi.org/10.3390/cancers13020279>
- [7] Panaampon J, Kariya R, Okada S. Elotuzumab, a potential therapeutic humanized anti-SLAMF7 monoclonal antibody, enhances natural killer cell-mediated killing of primary effusion lymphoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2022; 71: 2497-2509. <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03177-6>
- [8] Hosen N, Ichihara H, Mugitani A, Aoyama Y, Fukuda Y et al. CD48 as a novel molecular target for antibody therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2012; 156: 213-224. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08941.x>
- [9] Yigit B, Halibocek PJ, Chen SS, O'Keefe MS, Arnason J et al. A combination of an anti-SLAMF6 antibody and ibrutinib efficiently abrogates expansion of chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* 2016; 7: 26346-26360. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8378>
- [10] Saberi Hosnijeh F, van der Straten L, Kater AP, van Oers MHJ, Posthuma WFM et al. Proteomic markers with prognostic impact on outcome of chronic lymphocytic leukemia patients under chemo-immunotherapy: results from the HOVON 109 study. *Exp Hematol* 2020; 89: 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.08.002>

- [11] Bund D, Mayr C, Kofler DM, Hallek M, Wendtner CM. Human Ly9 (CD229) as novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) recognized by autologous CD8+ T cells. *Exp Hematol* 2006; 34: 860-869. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.04.010>
- [12] Li D, Xiong W, Wang Y, Feng J, He Y et al. SLAMF3 and SLAMF4 are immune checkpoints that constrain macrophage phagocytosis of hematopoietic tumors. *Sci Immunol* 2022; 7: eabj5501. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abj5501>
- [13] Ishibashi M, Takahashi R, Tsubota A, Sasaki M, Handa H et al. SLAMF3-mediated signaling via ERK pathway activation promotes aggressive phenotypic behaviors in multiple myeloma. *Mol Cancer Res* 2020; 18: 632-643. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0391>
- [14] Atanackovic D, Panse J, Hildebrandt Y, Jadczyk A, Kobold S et al. Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 2011; 96: 1512-1520. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.036814>

INTERAKCIA MEDZI TP53 A CDKN1A POLYMORFIZMAMI A RIZIKOM VZNIKU KARCINÓMU PROSTATY



Martina Knoško Brožová¹, Mária Škereňová^{4,5}, Jana Jurečeková¹, Ján Kliment², Róbert Dušenka², Daniel Evin^{1,3}, Martina Mečiaková¹, Marta Vilčková¹, Monika Kmeťová Sivoňová¹

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, SR

²Urologická klinika, Univerzitná nemocnica v Martine, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, SR

³Klinika nukleárnej medicíny, Univerzitná nemocnica v Martine, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, SR

⁴Ústav klinickej biochémie, Univerzitná nemocnica v Martine, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, SR

⁵Martinské centrum pre biomedicínu - BioMed, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, SR

Úvod

Karcinóm prostaty (KP) je heterogénne ochorenie, na ktorého patogenéze sa podieľa zvyšujúci sa vek, etnicita, environmentálne faktory a genetické príčiny. Incidencia ochorenia neustále rastie, čo z neho robí druhé najčastejšie onkologické ochorenie u mužov na Slovensku. Karcinóm prostaty postihuje hlavne mužov starších ako 50 rokov, kde najvyšší počet zaznamenaných prípadov je okolo veku 66 rokov. Okrem asociácie so zvyšujúcim sa vekom bolo ochorenie spojené aj s etnicitou, životným štýlom aj genetickými príčinami. Zapojenie génov výrazne ovplyvňuje aj globálnu frekvenciu ochorenia, pričom sa už mnohé gény využívajú v diagnostike ako biomarkery [1]. Genetické zmeny v nádorových bunkách sú častokrát spájané s defektmi bunkového cyklu a zapríčiňujú jeho nesprávnu reguláciu. Nesprávna regulácia bunkového cyklu ovplyvňuje bunkovú proliferáciu a tým aj samotný vývoj nádoru.

Abnormálny rast buniek a ich transformáciu na nádorové môžu zapríčiniť mutácie v onkogénoch alebo tumor-supresorových génoch, ktoré tak stratia schopnosť kontroly proliferácie. Do týchto skupín génov patria aj jednotlivé regulátory kontrolných bodov bunkového cyklu, ktorých hlavnou úlohou je zabrániť prenosu genetických defektov do ďalšej generácie [2]. Pokiaľ poškodenie DNA nie je včas opravené dochádza k nekontrolovateľnému deleniu buniek a tak vzniku mnohých ochorení. Kontrolné body bunkového cyklu sú G₁, G₂ a M a navzájom sa líšia v zapojení špecifických proteínov. Medzi základné regulátory bunkového cyklu patria cyklín-dependentné kinázy (CDK), cyklíny a inhibítory CDK. Progresiu bunkovým cyklom zabezpečuje aktivita komplexu CDK/cyklín, ktorá môže byť regulovaná



Autorské práva © 2024 Autori

postranskripčnými modifikáciami alebo aj interakciou s inhibítorom CDK [3]. Jedným z univerzálnych inhibítorov CDK/cyklín je p21^{WAF1/Cip1}, ktorý inhibuje prechod pri kontrolných bodoch G₁ a G₂. Proteín p21^{WAF1/Cip1} je kódovaný génom *CDKN1A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). Okrem inhibície komplexu CDK/cyklín, ktorý zabezpečuje prechod do ďalšej fázy bunkového cyklu, interaguje aj s proliferujúcim jadrovým antigénom PCNA, ktorý zas inhibuje DNA replikáciu. P21^{WAF1/Cip1} však dokáže pôsobiť ako dvojstranný regulátor, kedy jeho regulácia je závislá od bunkovej lokalizácie, či tumor-supresorového proteínu p53. Ak je v bunkovom prostredí dostatok proteínu p53, tak p21^{WAF1/Cip1} bude vykazovať tumor-supresívne účinky, kedy po aktivácii p53 dôjde aj k prechodnej expresii p21^{WAF1/Cip1}, čo pri poškodení DNA umožní inhibíciu komplexu CDK/cyklín alebo PCNA. Ak je v prostredí nedostatok proteínu p53, tak p21^{WAF1/Cip1} bude pôsobiť ako onkogén, pretože bude nadmerne exprimovaný a bunky sa môže stať rezistentnými na chemoterapiu a uniknúť aj bunkovému starnutiu [4]. Keď dôjde k strate alebo nadobudnutiu novej funkcie p21^{WAF1/Cip1} pôsobením mutácie, nastáva strata kontroly bunkového cyklu. Proteín p53 je jedným z hlavných synergistov p21^{WAF1/Cip1}, ktorý je kódovaný génom *TP53*. Hlavnou úlohou p53 je práve transaktivovať cieľové gény ako je aj gén *CDKN1A* (p21^{WAF1/Cip1}). Výber cieľových génov však závisí aj od rozsahu poškodenia DNA, aby mohlo dôjsť o oprave DNA. Ak je poškodenie nezvratné, tak p53 prejde modifikáciou a vznikne jeho apopticky aktívna forma. V rámci génu *TP53* sú mutácie detekovateľné u 50% ľudských karcinómov, čo inhibuje celé dráhu zastavenia bunkového cyklu [5].

Materiál a metódy

Cieľom našej štúdie bolo sledovať asociáciu polymorfizmov génu *CDKN1A* (rs730506, G>C) a *TP53* (rs12947788, G>A; rs17878362, Ins16bp) s rizikom vzniku karcinómu prostaty a s klinicko-patologickými charakteristikami (sérové PSA, Gleasonovo skóre a patologické T štádium). Analyzovali sme 486 vzoriek pacientov s KP a 443 vzoriek zdravých jedincov. Najskôr sme izolovali jadrovú DNA s využitím komerčného kitu Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). Následne sme stanovili koncentráciu a čistotu spektrofotometricky a DNA uskladnili pri teplote -80°C. Takto pripravené vzorky sa použili na analýzu vybraných polymorfizmov pomocou genotypizačných metód *PCR*, *HRM* a *PCR-RFLP*.

Výsledky

Pri porovnávaní frekvencií genotypov medzi pacientami s KP a zdravými jedincami, sme zistili signifikantne zvýšené riziko vzniku KP pri polymorfizme rs730506 (Tab. 1), G/C u jedincov s jednou mutantnou C alelou génu *CDKN1A* (p<0,001), ako aj pri mutantnom genotype CC (p=0,005).

U pacientov nesúcich genotyp CC sme pozorovali signifikantnú asociáciu s agresívnejším typom nádoru (GS >7; p=0,005).

Tabuľka 1. Výsledky genetickej analýzy polymorfizmu CDKN1A génu (rs730506, G/C).

Genotyp	Kontrolná skupina vs. pacienti s KP OR (95 % CI)	P-hodnota
GG	1,0 (ref.)	-
GC	1,4 (1,1 - 1,8)	0,01
CC	2,2 (1,2 - 3,7)	0,008
GC+CC	1,5 (1,1 - 1,9)	0,001
ALELY		
G	1,0 (ref.)	-
C	1,5 (1,2 - 1,8)	0,0004

Potvrdili sme tiež signifikantnú asociáciu *TP53* Ins16bp SNP genotyp II ($p=0,04$) a rizikom vzniku KP (Tab. 2). Analýza polymorfizmu *TP53* (rs12947788, G>A) nepreukázala asociáciu s rozvojom vzniku KP, ani koreláciu s klinicko-patologickými charakteristikami.

Tabuľka 2. Výsledky genetickej analýzy polymorfizmu Ins16bp (rs17878362)

Genotyp	Kontrolná skupina vs. pacienti s KP OR (95 % CI)	P-hodnota
DD	1,0 (ref.)	-
DI	1,01 (0,7 - 1,3)	0,9
II	2,4 (1,0 - 5,6)	0,04
DD+II	1,0 (0,8 - 1,4)	0,5
ALELY		
D	1,0 (ref.)	-
I	1,1 (0,9 - 1,4)	0,2

Kombinovanou genotypovou analýzou polymorfizmov *CDKN1A* (G>C) a *TP53* (Ins16bp) (Tab. 3) sme pozorovali signifikantne zvýšené riziko vzniku KP u pacientov nesúcich kombináciu genotypov *CDKN1A* GC a *TP53* Ins16bp SNP DI ($p=0,04$).

Tabuľka 3. Vzájomná korelácia polymorfizmov CDKN1A génu a TP53 génu ; * $p<0,05$.

	p21 (rs730506)		
	GG	GC	CC
p53 (dup)	OR (95% CI)		
DD	1,00 (ref.)	1,42 (1,0-2,03)*	2,04 (0,9-4,5)
DI	1,14 (0,8-1,6)	0,98 (0,6-1,6)	1,89 (0,7-5,3)
II	1,81 (0,6-5,6)	3,02 (0,8-11)	X

Diskusia

Karcinóm prostaty sa vo väčšine prípadov vyvíja veľmi nenápadne, asymptomatický. Práve bezpríznakový priebeh ho radí medzi najčastejšiu malignitu u mužov s vysokou globálnou incidenciou. Pochopenie molekulárnych mechanizmov vzniku nádorových ochorení by mohlo zohrávať v budúcnosti kľúčovú úlohu. Jedným z takýchto mechanizmov je regulácia kontrolných bodov, ktorá zabráni, aby sa poškodená DNA dostala do dcérskych buniek [6]. Jedným z regulátorov bunkového cyklu je aj inhibítor komplexu CDK/cyklín proteín p21^{WAF1/Cip1}. Proteín p21^{WAF1/Cip1} je dvojstranný regulátor, ktorý dokáže rast nádorových buniek stimulovať aj inhibovať. U mnohých typov karcinómov bola potvrdená zvýšená alebo znížená hladina expzie, ktorá by mohla byť spôsobená prítomnosťou mutácie. Karcinóm prostaty je však komplexné ochorenie, ktoré nemusí byť vyvolané len jednou mutáciou v kandidátnom géne, ale aj interakciou nízkofrekvenčných polymorfizmov v rôznych génoch spolu s vplyvom prostredia na fenotyp. Predpokladá sa, že rôzne genetické variácie v *CDKN1A* géne (p21^{WAF1/Cip1}) by mohli zohrávať podstatnú úlohu pri modifikácii rizika vzniku KP [7]. Príkladom je práve substitúcia G/C (polymorfizmus rs730506), pri ktorej bolo preukázané, že ovplyvňuje dráhu medzi p21^{WAF1/Cip1} a p53 v súvislosti so vznikom karcinómu pľúc. Štúdia sa zamerala na viacero SNP, aby preukázala genetickú diferenciáciu v distribúcii podľa geografickej polohy. Podobné výsledky boli preukázané aj pri štúdiu kaukazskej populácie, kde bol tento SNP pridaný kvôli jeho potenciálnej regulačnej funkcii v proteíne spolu s polymorfizmami v *TP53*, kde sa potvrdila aj ich znížená expresia [8]. Nám sa podarilo preukázať zvýšenú frekvenciu rizika vzniku KP s jedincov s mutantnou alelou C, aj genotypom CC. Ďalším regulátorom je p53, ktorý dokáže rozoznať poškodenie DNA a následne tak spustiť transkripciu *CDKN1A* génu, čím dôjde k zastaveniu bunkového cyklu. Gén *TP53* je jedným z najmutovanejších génov pri nádorových ochoreniach, pričom jedným z najviac študovaných polymorfizmov je Ins16bp, pri ktorom bolo preukázané, že je predisponujúci faktor rozvoju karcinómu prsníka [9]. Pri analýze tohto polymorfizmu sme tiež preukázali zvýšené riziko vzniku KP u jedincov s genotypom II. Keďže je karcinóm prostaty veľmi komplexné ochorenie, je potrebné podrobne pochopiť mechanizmus a následný vývoj nádoru. Záverom môžeme konštatovať, že kombinácia uvedených genotypov by mohla jedným z genetických markerov KP.

Pod'akovanie

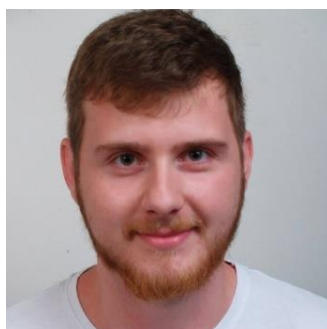
Táto práca bola podporená projektmi: VEGA č. 1/0014/22.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ittmann M. (2018). Anatomy and histology of the human and murine prostate. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 8(5).
- [2] Khan HM, Cheng HH. Germline genetics of prostate cancer. Prostate 2022; 82 Suppl 1: S3-S12. <https://doi.org/10.1002/pros.24340>
- [3] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 2009; 461, 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>

- [4] Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in cell differentiation, migration and cancer therapy. *Cancers (Basel)* 2019; 11: 1220. <https://doi.org/10.3390/cancers11091220>
- [5] Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocrine Relat Cancer* 2006; 13: 293-325. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01172>
- [6] Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F, Jemal A. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 2020; 77: 38-52. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.005>
- [7] Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: a two-faced genome guardian. *Trends Mol Med* 2017; 23: 310-319. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.001>
- [8] Tian C, Chen Z, Ma X, Yang M, Wang Z. Comparison of genetic variants in cancer-related genes between chinese Hui and Han populations. *PLoS One* 2015; 10: e0145170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145170>
- [9] Korthagen NM, van Moorsel CHM, Barlo NP, Kazemier KM, Ruven HJT et al. Association between variations in cell cycle genes and idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2012; 7: e30442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030442>

TEKUTÁ BIOPSIA A JEJ POTENCIÁL V DIAGNOSTIKE KARCINÓMU ENDOMETRIA



Dominik Kodada^{1,2}, Nikola Janoštiaková^{1,2}, Patrik Krumpolec¹, Michaela Hýblová¹, Vanda Repiská², Gabriel Minárik¹

¹Medirex Group Academy, Novozámocká 67, 949 05 Nitra, Slovensko

²Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovensko

Úvod

Pri zhubných nádoroch tela maternice je pozorovaný nárast incidencie a mortality, pričom v súčasnosti sú najčastejšou gynekologickou malignitou v rozvinutých krajinách sveta. Spomedzi týchto nádorov je najčastejším typom endometriálny karcinóm (EC) (1). V priebehu rokov sa testovalo množstvo prístupov, ktoré si dávali za cieľ zefektívnenie personalizácie diagnostiky a následnej terapie a v posledných rokoch sa ukazuje využitelnou tzv. molekulárna klasifikácia. Tá je oproti predchádzajúcim prístupom objektívnejšia a kategorizuje nádory na základe biomarkerov typu zmien/mutácií prítomných v nukleových kyselinách (DNA/RNA) nádorového tkaniva (2). Tekutá biopsia z krvnej plazmy, ako neinvazívny spôsob získavania relevantného biologického materiálu reprezentujúci aj „nádorové tkanivo“ už preukázala svoj potenciál pri detekcii nádorových zmien pri rôznych typoch nádorov. Pri EC však doposiaľ nebola dostatočne preštudovaná, no svojou minimálnou invazívnosťou by mohla predstavovať alternatívny skriningový prístup, ktorým by bolo možné u pacientiek detegovať spomínané molekulárne markery karcinogenézy (3).

Materiál a metódy

V pilotnej štúdií sme porovnávali detekciu vybraných biomarkerov (onkomutácií, mikrosatelitovú nestabilitu – *Microsatellite Instability* MSI, nádorovú mutačnú záťaž – *Tumour Mutational Burden* TMB) a to analýzou cirkulujúcej tumorovej DNA z krvnej plazmy (ctDNA) a DNA z nádorového tkaniva fixovaného formalínom v parafínovom bločku (FFPE-DNA). Nádorové tkanivá a krvná plazma pochádzali z 21 slovenských pacientiek s EC vo veku od 34 do 84 rokov (Tab. 1) s priemerným vekom 64,77 roku. U všetkých prípadov v štúdií sa jednalo o nádory endometrioidnej histológie. Karcinómy boli rôzneho štádia (G1 – 4, G2 – 12, G3 – 5) a stupňa (IA – 11, 7/21 IB – 7, II – 1, IIIA – 2) (Tab. 1). Na izoláciu ctDNA sme využili QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a platformu QIASymphony (QIAGEN) na izoláciu DNA z krvnej plazmy, pričom na izoláciu FFPE-DNA sme využili Ionic® Purification System a Ionic® FFPE To Pure DNA Kit (Purigen) podľa príslušných originálnych protokolov od výrobcov. Na prípravu genomických sekvenáčnych knižníc



sme využili príslušné TruSight Oncology 500 a TruSight Oncology 500 ctDNA (Illumina) kity podľa príslušných originálnych protokolov od výrobcov. Následne boli knižnice sekvenované na NovaSeq 6000 (Illumina) a po primárnej analýze anotované využitím nástroja Qiagen Clinical Insight (QIAGEN).

Štúdia bola schválená Etickou komisiou Bratislavského samosprávneho kraja (06196/2020/HF). Pacientky poskytli informovaný súhlas so zaradením do štúdie.

Výsledky

U všetkých 21 pacientiek sme úspešne identifikovali potenciálne klinicky relevantné mutácie asociované s EC aspoň na úrovni ctDNA. V 3 FFPE-DNA vzorkách sme onkomutácie neodhalili. Dokopy sme identifikovali mutácie vo viac ako 70 génoch. U dvoch tretín pacientiek (14/21) sme identifikovali aspoň jednu spoločnú potenciálne klinicky významnú mutáciu prítomnú aj na úrovni ctDNA, aj na úrovni FFPE-DNA. Z 5 vzoriek vysokého stupňa (G3) nebola u 2 párov (ctDNA spolu s FFPE-DNA) nájdená žiadna potenciálne klinicky relevantná mutácia na úrovni FFPE-DNA, ale len na úrovni ctDNA. Identickú mutáciu u G3 vzoriek sme identifikovali tiež len v 2 pároch. Zhodne sme vysokú tumorovú záťaž identifikovali medzi ctDNA a FFPE-DNA len u 1 pacientky, pričom na úrovni FFPE-DNA bola identifikovaná u 4 vzoriek, kým na úrovni ctDNA u 3 (Tab. 1). Mikrosatelitová nestabilita bola identifikovaná u 2 pacientok, v oboch prípadoch len na úrovni FFPE-DNA (Tab. 1).

Tabuľka 1. Charakteristiky kohorty a údaje o tumorovej mutačnej záťaži a mikrosatelitovej nestabilite v nádorových vzorkách a vzorkách cirkulujúcej tumorovej DNA. Vysoké úrovne tumorovej mutačnej záťaže a vysoké % mikrosatelitovej nestability farebne zvýraznené. Tabuľka prevzatá z pôvodnej publikácie (4).

Číslo pacientky	Vek pri hysterektómii	Stupeň a štádium nádoru	TMB hodnota FFPE-DNA	TMB hodnota ctDNA	MSI (%) FFPE-DNA	MSI (%) ctDNA
1	64	G3 IA	0,80	2,50	0,00	0,00
2	63	G2 IA	3,90	9,80	3,39	0,00
3	70	G3 IIIA	0,80	5,10	1,68	0,05
4	75	G2 IA	1,60	4,20	0,00	0,09
5	58	G2 IA	1,60	3,10	5,22	0,00
6	60	G2 IA	1,60	4,20	0,85	0,50
7	68	G2 IA	1,60	0,00	1,64	0,00
8	76	G2 IB	16,40	3,30	13,54	0,05
9	84	G2 IB	32,10	26,30	25,20	0,46
10	61	G2 II	9,40	6,00	2,46	0,14
11	60	G1 IA	0,00	5,20	1,69	0,00
12	60	G1 IA	6,30	0,00	3,45	0,00
13	34	G1 IA	1,60	2,50	1,64	0,00
14	63	G2 IB	28,20	3,30	0,84	0,09

15	57	G2 IA	0,00	1,70	0,00	0,05
16	63	G3 IB	7,10	0,80	2,32	0,00
17	84	G2 IB	8,60	11,60	0,83	0,00
18	64	G3 IB	0,00	37,20	1,68	0,23
19	73	G1 IA	41,50	2,40	42,28	0,14
20	68	G3 IIIA	0,00	50,20	0,80	0,81
21	64	G2 IB	89,60	9,10	0,04	0,04

Z mutácii detegovaných z 21 FFPE-DNA boli najčastejšie mutácie v génoch *PTEN* (48 %), *ARID1A* (29 %), *PIK3CA* (29 %), *PIK3R1* (24 %), *CTCF* (24 %), *BRCA2* (24 %), *ZFH3* (19 %), *CTNNB1* (14 %), *FGFR2* (14 %), *SOX17* (14 %), *CHEK2* (14 %), *TP53* (14 %). Na úrovni ctDNA boli nezvyčajne časté mutácie v génoch *DNMT3A* (52 %) a *TET2* (14 %), ktoré sme na úrovni FFPE-DNA neidentifikovali ani v jedinom prípade (Tab. 2). Vyskytovali sa ale u 4 z 5 vzoriek vysokého stupňa a štádia. Ostatné najčastejšie mutované gény *CHEK2* (24 %), *PTEN* (19 %), *ZFH3* (19 %), *PIK3CA* (14 %), *TP53* (14 %) sme identifikovali už v podobnejších frekvenciách (Tab. 2).

Tabuľka 2. Zoznam najfrekvencovanejších mutovaných génov (zoradenie podľa zostupnej frekvencie v FFPE-DNA). Tabuľka prevzatá z pôvodnej publikácie [4].

Názov génu	frekvencia mutácii (%)	
	FFPE-DNA	ctDNA
<i>PTEN</i>	48	19
<i>PIK3CA</i>	29	14
<i>ARID1A</i>	29	10
<i>PIK3R1</i>	24	14
<i>CTCF</i>	24	10
<i>BRCA2</i>	24	10
<i>ZFH3</i>	19	19
<i>CHEK2</i>	14	24
<i>TP53</i>	14	14
<i>FGFR2</i>	14	5
<i>CTNNB1</i>	14	5
<i>SOX17</i>	14	0
<i>FAT</i>	10	0
<i>KRAS</i>	5	5
<i>DNMT3A</i>	0	52
<i>TET2</i>	0	14

Diskusia

Napriek obmedzenému počtu vzoriek analyzovaných v našej štúdií sme mohli pozorovať niekoľko ukazovateľov podobných s rozsiahlejšími štúdiami (priemerný vek pacientiek, podiel nádorov podľa stupňa a štádia, najčastejšie mutované gény v nádoroch EC) (5,6). V súlade s našim predpokladom sme viac onkomutácií identifikovali vo vzorkách samotných nádorov ako v krvnej plazme (Tab. 2). Početnosť mutácií na základe štádia a stupňa nádoru neukazovala jednoznačný trend a z dôvodu rozmeru kohorty je náročne interpretovateľná. Zaujímavým môže byť ale nárast počtu identifikovaných onkomutácií na úrovni ctDNA medzi pacientkami s nádormi nízkeho stupňa a vysokého stupňa (4). Najčastejšie identifikované onkomutácie, rovnako na úrovni FFPE-DNA aj ctDNA, boli v géne *PTEN* (Tab. 2). Tie sú prítomné u takmer polovice prípadov nádorov EC (5), pričom sú najčastejšie asociované s endometrioidnou histológiou a skorým štádiom EC a teda s lepšou prognózou pre pacientky. Gén *PTEN* je tumor supresor a v prirodzenom stave negatívne reguluje PI3K-AKT signálnu dráhu (5). Gén *ARID1A*, jeden z troch najčastejšie mutovaný gén u nádorov v našej štúdií (Tab. 2), je podobne tumor supresorom a kóduje podjednotkou chromatin remodelujúceho proteínového (SWI/SNF) komplexu. Jeho mutácie nie sú výhradne asociované so žiadnou konkrétnou histológiou (6).

Mutácie, ktoré majú podľa súčasnej molekulárnej klasifikácie najväčší klinický význam sú v géne *POLE*, v génoch, ktorých produkty sa zúčastňujú *mismatch* opravy (MMR) DNA, v géne *CTNNB1* a v géne *TP53* (7). Mutácie v géne *POLE* sú typické pre nádory s nízkou závažnosťou (7). V našej štúdií sme ich identifikovali u 2 vzoriek ale len na úrovni FFPE-DNA. Stredne závažné sú nádory s mutáciami v MMR génoch alebo v géne *CTNNB1* (7). Z génov, ktorých produkty sa zúčastňujú MMR sme identifikovali 2 mutácie v géne *MLH1* a v nádore jednej pacientky 2 rôzne mutácie v géne *MSH6*. Mutácie v géne *MLH1*, ale boli u rôznych pacientiek, pričom u jednej sa vyskytovala iba na úrovni ctDNA a u druhej iba na úrovni FFPE-DNA. Mutácie v géne *CTNNB1* boli prítomné u 3 pacientiek len v FFPE-DNA a u 1 pacientky len na úrovni ctDNA. Najzávažnejšie EC prípady sú asociované s mutáciami v géne *TP53* (7). V našej štúdií sme identifikovali tieto mutácie u 3 pacientiek na úrovni ctDNA, avšak u 3 iných pacientiek na úrovni FFPE-DNA. Z pozorovania, že ani u jednej pacientky nebola *TP53* mutácia nájdená na oboch úrovniach súčasne a z vyššie uvádzaných pozorovaní usudzujeme, že tekutá biopsia s využitím ctDNA z krvnej plazmy má pri molekulárnej klasifikácii nádorov a pri odvodzovaní prognóz EC podľa nej značne limitovaný potenciál.

Za zmienku stojí pacientka, u ktorej sme na úrovni FFPE-DNA identifikovali *POLE* mutáciu, 2 mutácie v géne *MSH6* a aj mutácie v géne *TP53*. Takýto „*multiple-classifier*“ prípad by však mal mať na základe pozorovaní menej závažnú prognózu, skôr podobnú nádorom iba s *POLE* mutáciou (8). Pri 2 mutáciách *MSH6* a zároveň pozorovanej mikrosatelitovej nestabilite nevylučujeme možnosť, že by sa mohlo jednať aj o hereditárnu mutáciu u pacientky, nakoľko germinálne mutácie v génoch asociovaných s Lynchovým syndrómom patria u pacientiek s EC medzi najčastejšie (9).

Mutácie v génoch *DNMT3A* a *TET2* sú (okrem EC) asociované najmä s klonálnou hematopoézou. Tá vzniká v dôsledku somatických mutácií

v hematopoetických bunkách. Prirodzene je asociovaná s vysokým vekom a zvýšenou mortalitou na kardiovaskulárne ochorenia (10). Vysoká miera ich incidencie na úrovni ctDNA môže byť asociovaná s vyšším vekom pacientiek, ale na základe našich pozorovaní (mutácie prítomné u 4 z 5 G3 pacientiek) by tieto mutácie mohli predstavovať potenciálny negatívny prognostický marker, ktorý by bol dobre identifikovateľný z ctDNA.

V našej práci vydanéj pred konaním konferencie (4) na základe opísaných výsledkov uznávame, že pilotná štúdia naznačuje potenciál využitia tekutej biopsie pri skríningu a skorej diagnostike EC. Jej potenciál sa však ukázal byť značne limitovaný pri odvodzovaní prognózy podľa najčastejších molekulárnych biomarkerov EC.

Pod'akovanie

Projekt vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: E359- E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- [2] Vermij L, Smit V, Nout R, Bosse T. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. *Histopathology* 2020; 76: 52-63. <https://doi.org/10.1111/his.14015>
- [3] Łukasiewicz M, Pastuszak K, Łapińska-Szumczyk S, Róžański R, Veld SGJGI' et al. Diagnostic Accuracy of Liquid Biopsy in Endometrial Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 5731. <https://doi.org/10.3390/cancers13225731>
- [4] Kodada D, Hyblova M, Krumpolec P, Janostiakova N, Barath P et al. The Potential of Liquid Biopsy in Detection of Endometrial Cancer Biomarkers: A Pilot Study. *Int J Mol Sci*; 24: 7811. <https://doi.org/10.3390/ijms24097811>
- [5] Djordjevic B, Hennessy BT, Li J, Barkoh BA, Luthra R et al. Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing. *Mod Pathol* 2012; 25: 699-708. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.208>
- [6] Toumpeki C, Liberis A, Tsirkas I, Tsirka T, Kalagasidou S et al. The Role of ARID1A in Endometrial Cancer and the Molecular Pathways Associated With Pathogenesis and Cancer Progression. *In Vivo* 2019; 33: 659-667. <https://doi.org/10.21873/invivo.11524>
- [7] den Heerik ASVM, Horeweg N, Nout RA, Lutgens LCHW, van der Steen-Banasik EM et al. PORTEC-4a: international randomized trial of molecular profile-based adjuvant treatment for women with high-intermediate risk endometrial cancer.

Int J Gynecol Cancer 2020; 30: 2002-2007. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-001929>

- [8] León-Castillo A, Gilvazquez E, Nout R, Smit VT, McAlpine JN et al. Clinicopathological and molecular characterisation of “multiple-classifier” endometrial carcinomas. *J Pathol* 2020; 250: 312-322. <https://doi.org/10.1002/path.5373>
- [9] Kral J, Jelinkova S, Zemankova P, Vocka M, Borecka M et al. Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer. *Oncol Lett* 2023; 25: 216. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13802>
- [10] Cobo I, Tanaka T, Glass CK, Yeang C: Clonal hematopoiesis driven by DNMT3A and TET2 mutations: role in monocyte and macrophage biology and atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr Opin Hematol* 2022; 29: 1-7. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000688>

MOLECULES DERIVED FROM EXERCISE-CONDITIONED HUMAN PLASMA AND MOLECULAR MECHANISM OF THEIR TUMOR-SUPPRESSIVE EFFECTS ON COLORECTAL CANCER CELLS



Jana Komárová¹, Martina Takáčová², Jozef Ukropec¹,
Barbara Ukropcová^{1,3}, Tímea Kurdiová¹

¹*Institute of Experimental Endocrinology, BMC, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*

²*Institute of Virology, BMC, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*

³*Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava*

Introduction

Cancer is the second most common cause of death in Slovakia and colorectal cancer is one of the most frequently diagnosed types [1]. Improved cancer treatment and prevention strategies can positively impact the health and well-being of cancer survivors and also general population.

Regular physical activity is an effective prevention of diverse pathologies such as cardiovascular and neurodegenerative diseases, even various types of cancer - prostate, lung, breast, or colorectal cancer [2, 3]. Exercise stimulates skeletal muscle and other organs to release molecules - exerkinines - which affect many tissues and organs across the body. Exerkinines can be released directly into the bloodstream but can also be secreted via extracellular vesicles which may act like molecular transporters and mediators of anticancer effects of exercise, capable of modulating the viability and proliferative capacity of cancer cells.

Extracellular vesicles are small vesicular formations secreted by almost all cells in the body. Based on their size, biogenesis, and type of secretion from the cell, they can be divided into microvesicles, exosomes, and apoptotic bodies [4]. Of these, exosomes bounded by a phospholipid bilayer, ranging in size from 30 to 150 nm, which are secreted from the cell by exocytosis, have attracted the most interest nowadays. They are now showing great potential in intercellular communication as they carry a mixture of proteins, lipids or various RNAs. This mixture is transported throughout the body, thus being able to modify both the physiological and pathological processes of recipient cells [5].

The objectives of the presented work were to i) verify the methodology for exosome isolation from human plasma and b) to study the effect of exercise-conditioned human plasma on the proliferative capacity of cancer cells.



Materials and methods

Exosome isolation: Exosomes from blood plasma were isolated on columns by size exclusion chromatography (SEC, qEV, Izon) following the manufacturer's instructions.

Nanoparticle tracking analysis (NTA): By NTA, nanoparticle concentration in the first 7 SEC eluted fractions was obtained using 10 μ l from each fraction, measured 5 times.

Western blot: The presence of exosomes was confirmed by identifying their marker, the membrane protein CD63. The three most exosome-enriched fractions were pooled and concentrated on a 100K concentration column (Millipore). Separation of the sample was carried out under denaturing conditions on gels containing 10% acrylamide (Mini-PROTEAN Tetra cell, BIO-RAD). Proteins were transferred to a PVDF membrane (Millipore). After transfer, the membrane was blocked with BSA solution and incubated with primary anti-CD63 antibody (1:1000, Exosome-anti-CD63, Thermo Fisher) overnight at 4 °C and then with secondary antibody (1:10000, fluorescein-coupled anti-mouse, Thermo Fisher). The membrane was scanned using the Odyssey infrared imaging system (Li-Cor).

Exosome internalization: Isolated and concentrated exosomes were labelled with PKH26 fluorescent dye. As a control, we used PBS labelled by an identical procedure. The labelled exosomes/PBS were added to cells at a concentration of 0.8% of the total medium volume. Subsequently, the cells were incubated for 24 h in an incubator at 37 °C and 5% CO₂.

Fluorescent activated cell sorting (FACS): After 24h of incubation with labelled exosomes, cells were washed with PBS and harvested by trypsinization, centrifuged, and resuspended in PBS. The presence of labelled exosomes in cells was measured by flow cytometry (FACS, BD Biosciences) at Ex/Em 551/567 nm.

Confocal microscopy: Cells were incubated for 24h with fluorescently labelled exosomes/PBS after seeding onto collagen-coated slides. Subsequently, cells were fixed with 4% formaldehyde for 20 min. For visualization of the cytoskeleton, cells were stained with phalloidin conjugated with fluorescent dye. After staining, cells were washed 3 times with PBS, transferred to a slide with a mounting medium with DAPI (Abcam), and observed under a confocal microscope (Nikon).

Human colorectal cancer cell line HCT 116 (ATCC) was used. Blood was collected from 3 individuals with age 31-33, before, immediately after, and 60 minutes after a single bout of cycling on a stationary bike for 40 minutes at 75% of their maximal heart rate.

xCELLigence: Cell number increasing in time was determined by xCELLigence measuring minor changes of cellular impedance that occur upon changes in cell number. The cell number was observed in octaplicates of cells treated with 10% plasma collected before and immediately after a single bout of exercise.

BrdU: Cell proliferation rate was measured by scanning the amount of BrdU that was incorporated into the DNA of proliferating cells. Cells were treated with 10%

plasma collected before, immediately after, and 60 minutes after a single bout of exercise.

Results and discussion

The presence of exosomes isolated from human plasma was verified by two methodologies. Indirectly, by measuring the concentration of exosomes-like sized particles using NTA, we observed their increased concentration in the S3-S5 fractions, in the fractions where their highest content should occur [6]. The highest concentration of exosomes was $1,75 \times 10^9$ particles/ml in the S3 fraction, $1,72 \times 10^9$ particles/ml in the S4 fraction, and $1,4 \times 10^9$ particles/ml in the S5 fraction (Fig. 1A). Direct evidence of the presence of exosomes in human plasma was obtained by Western blot using a primary antibody against tetraspanin CD63, an antibody standardly used as a marker of exosomes. We observed a single band on the membrane with a molecular weight of approximately 60 kDa, which corresponds to the molecular weight of glycosylated CD63 present on the surface of exosomes (Fig. 1B).

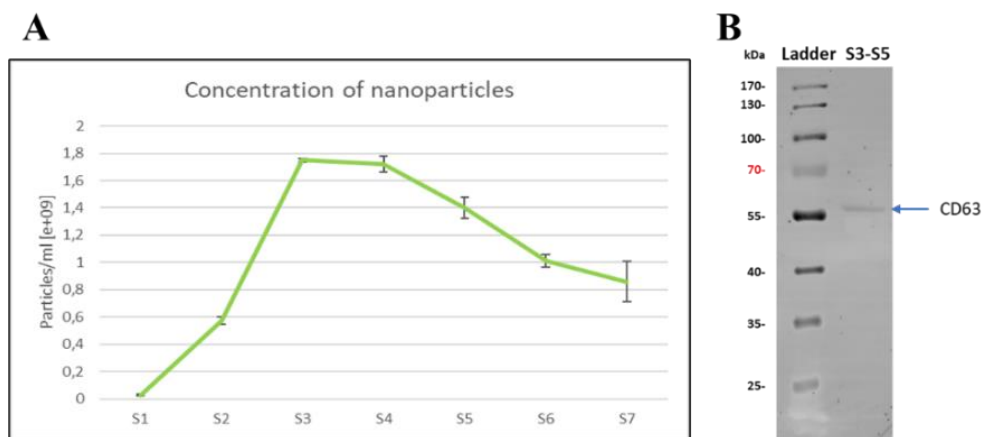


Figure 1. The presence of exosomes in the sample. (A) Nanoparticle tracking analysis showing the concentration of nanoparticles in size exclusion chromatography eluted fractions isolated from human blood plasma. (B) Western Blott analysis shows the presence of one band with a molecular weight of approximately 60kDa corresponding to exosome membrane marker CD63. S1-S7 the numbers of the eluted fractions.

Internalization of exosomes into the colorectal cancer cells was assessed by fluorescent-activated cell sorting. The intensity of the fluorescent signal in HCT 116 cells incubated with PBS (set as background) was 15, with PBS + PKH26 (red fluorescent dye) the intensity was 48 (technical control), and incubated with exosomes labelled with PKH26, the observed intensity was 3909 (Fig. 2A). Visualization of exosome internalization under the confocal microscopy shows no PKH26 red fluorescent signal in cells incubated with PBS + PKH26, but we can see the presence of a red signal (exosomes) in cells incubated with labelled exosomes with PKH26 (Fig. 2B). These observations clearly show that exosomes isolated from plasma with SEC are internalised by colorectal cancer cells in vitro.

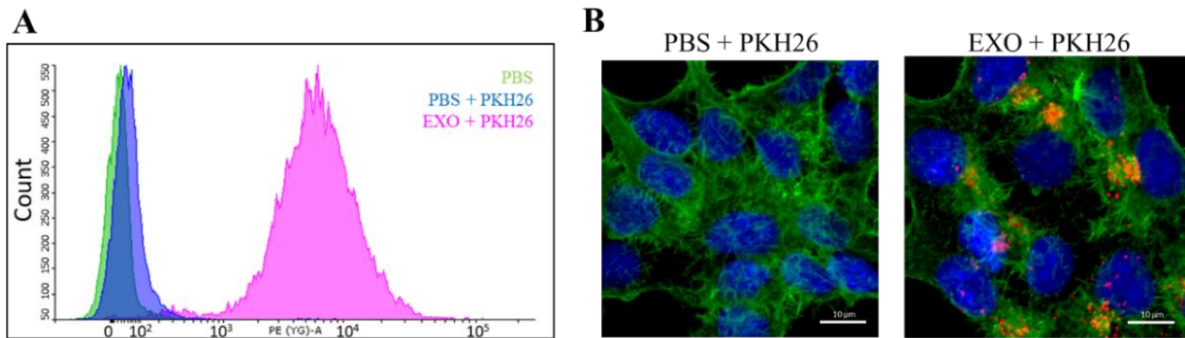


Figure 2. Internalization of exosomes into the HCT 116 cells. (A) fluorescent activated cell sorting showing the intensity of the fluorescent signal in HCT 116 cells after incubation with PBS, PBS + PKH26, or exosomes + PKH26. (B) confocal microscopy of HCT 116 cells after incubation with PBS + PKH26 and exosomes + PKH26. blue- DAPI (nuclei), green- phalloidin (actin), red- PKH26 (exosomes)

The effect of exercise-conditioned human plasma on cancer cell number was analysed by xCELLigence, which can provide quantitative real-time monitoring of cell numbers. We observed lower HCT116 cell number after the 72h incubation with human plasma collected right after a single bout of exercise compared to basal state- plasma collected before the exercise (Fig. 3A). Additionally, cancer cells proliferation rate was assessed by BrdU assay measuring the incorporation of labelled BrdU into the dividing cells. We also observed significant inhibition of cell proliferation with plasma collected immediately after a single bout of exercise compared to basal state plasma (Fig. 3B).

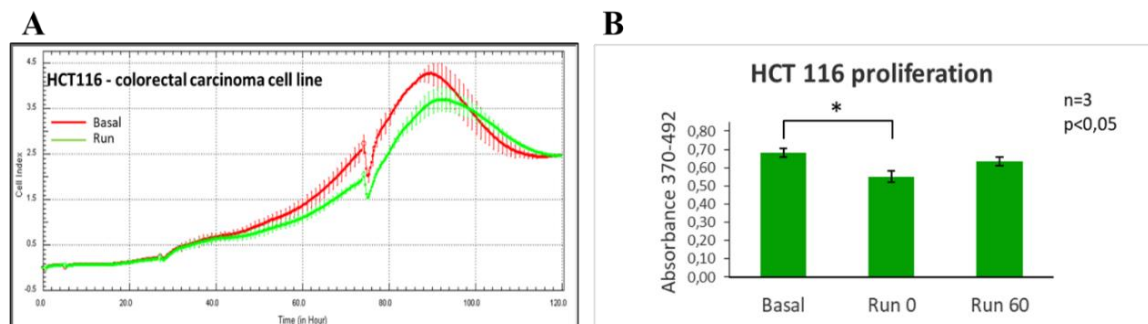


Figure 3. HCT 116 treatment with human blood plasma (A) xCELLigence monitoring cell number after incubation with human plasma collected before (basal) and immediately after (run) a single bout of aerobic exercise (B) BrdU assay indicating cell proliferation of HCT 116 after incubation with human plasma collected before (basal), immediately after (run 0) and 60 minutes after (run 60) a single bout of aerobic exercise.

These preliminary results revealed an inhibitory effect of exercise-conditioned plasma collected immediately after a single bout of exercise compared to pre-exercise plasma. Similar results were already observed by other research groups [7], which

provide us with a stable starting point to reveal molecular mechanisms standing behind the inhibitory effect of exercise on cancer cells. To strengthen our results, a higher number of patients will be tested and treatment with plasma-derived exosomes will be performed to clarify the molecular mechanism underpinning the beneficial effects of exercise on cancer prevention and treatment.

Conclusion

Described experiments have shown both indirectly and directly that we can efficiently isolate exosomes from human blood plasma using size-exclusion chromatography. We also proved the ability of human colorectal cancer HCT 116 cells to uptake SEC-isolated plasma exosomes into their cytoplasm. Finally, our preliminary data showed that treatment with exercise-conditioned human plasma decreases cancer cell number and proliferation rate compared to pre-exercise plasma.

Acknowledgement

This study is supported by grant VEGA-2/0144/23, APVV 20-0466 and VEGA-2/0076/22.

References

- [1] <https://www.noisk.sk/narodny-onkologicky-register/epidemiologia-nadorovych-ochoreni-na-slovensku> (cited: 20. April 2024)
- [2] Brandt C, Pedersen BK. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defence against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 520258. <https://doi.org/10.1155/2010/520258>
- [3] Cormie P, Zopf EM, Zhang X, Schmitz KH. The impact of exercise on cancer mortality, recurrence, and treatment-related adverse effects. *Epidemiol Rev* 2017; 39: 71-92. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxx007>
- [4] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells* 2019; 8: 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- [5] Isaac R, Gomes Reis FC, Ying W, Olefsky JM. Exosomes as mediators of intercellular crosstalk in metabolism. *Cell Metab* 2021; 33: 1744-1762. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.08.006>
- [6] IZON. <https://www.izon.com/qev/overview>. (cited: 15. March 2024)
- [7] Orange ST, Jordan AR, Odell A, Kavanagh O, Hicks KM et al. Acute aerobic exercise-conditioned serum reduces colon cancer cell proliferation in vitro through interleukin-6-induced regulation of DNA damage. *Int J Cancer* 2022; 151: 265-274. <https://doi.org/10.1002/ijc.33982>

ADIPOCYTMI-PRODUKOVANÉ FAKTORY OVPLYVŇUJÚ EXPRESIU KARBONICKEJ ANHYDRÁZY IX V BUNKÁCH KARCINÓMU PRSNÍKA A HRUBÉHO ČREVA



Jana Lapinová, Tereza Goliaš, Martina Takáčová

Virologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Oddelenie nádorovej biológie, Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Zvýšená prevalencia obezity je spojená s rizikom vzniku rakoviny prsníka, hrubého čreva a rekta [1]. Tukové tkanivo pozostávajúce z adipocytov hrá dôležitú úlohu v mnohých fyziologických procesoch vrátane udržiavania energetickej homeostázy a metabolizmu. Taktiež sa podieľa na endokrinnej signalizácii prostredníctvom produkcie hormónov, cytokínov, rastových faktorov a adipokínov. Tieto faktory sú okrem svojich fyziologických úloh zodpovedné aj za aktiváciu signálnych dráh zapojených do proliferácie, diferenciácie, adhézie a invázie nádorových buniek [2].

V nádorovom mikroprostredí dochádza k rozvoju hypoxie, ktorá sa vyznačuje nízkou hladinou kyslíka a obmedzeným prísunom živín. Adaptívnu odpoveď buniek na hypoxiu zabezpečuje hypoxiou-indukovaný transkripčný faktor 1 (HIF-1). V hypoxických podmienkach dochádza k dimerizácii podjednotiek HIF-1 α a HIF-1 β , ktoré sa následne viažu na hypoxia-responzívne elementy niektorých génov, napríklad karbonickej anhydrázy IX (CA IX) [3]. Proteín CA IX je exprimovaný v pevných nádoroch, pričom sa podieľa na regulácii vnútrobunkového pH a podporuje prežívanie buniek v hypoxickom prostredí. Okrem toho sa zásadne podieľa na acidifikácii extracelulárneho mikroprostredia, čím prispieva k zvýšenej migrácii a invázivnosti nádorových buniek [4]. Prítomnosť CA IX v nádorových bunkách je spojená s ich agresívnejším fenotypom, s nepriaznivou prognózou nádorového ochorenia a s rezistenciou na chemoterapiu [5].

Cieľom práce bolo skúmať vplyv kondicionovaného média derivovaného z adipocytov na expresiu CA IX a HIF-1 α v bunkových líniiach derivovaných z karcinómu prsníka a hrubého čreva. Okrem toho bol sledovaný vplyv kondicionovaného média na adhéziu nádorových buniek. Objasnenie mechanizmu vplyvu adipocytmi-produkovaného média na nádorové bunky by mohlo prispieť k lepšiemu pochopeniu interakcie medzi obezitou a nádorovými ochoreniami.

Materiál a metódy

Bunkové línie: Bunkové línie HCT116 (CCL-247) a BT-20 (HTB-19) boli kultivované vo vysokoglukózovom DMEM doplnenom 10% fetálnym teľacím sérom (FCS) a 0,1% gentamicínom. Na kultiváciu 3T3-L1 buniek (CL-173) bolo použité vysokoglukózové DMEM doplnené 10% „newborn“ teľacím sérom (NCS), 1% penicilínom a streptomycínom. Bunky boli kultivované v termostate s 5% CO₂ pri 37°C. Inkubácia v hypoxii bola realizovaná v hypoxickom inkubátore (Ruskin Technologies; 1% O₂, 5% CO₂) pri 37°C. Bunková línia HCT116 KO CA9 bola vytvorená CRISPR/Cas9 technikou podľa práce Kéry *et al.* [6].

Diferenciácia 3T3-L1 buniek: Adipogénna diferenciácia bola indukovaná podľa protokolu Zebisch *et al.* [7] Preadipocyty diferencovali v DMEM s 10% FCS, 0,1% gentamicínom s prídavkom 0,5 mM 3-izobutyl-1-metyl-xantínu, 0,25 µM dexametazónu, 1 µg/ml inzulínu a 2 µM rosiglitazónu počas dvoch dní. Následne bolo diferenciačné médium I nahradené diferenciačným médiom II s prídavkom 1 µg/ml inzulínu. Po 72 hodinách sa médium vymenilo (2x) a následne boli adipocyty použité na prípravu kondiciovaného média.

Príprava kondiciovaného média z adipocytov: Po diferenciácii adipocytov sa k bunkám pridalo čerstvé DMEM s 10 % FCS, ktoré bolo po 24 h odobraté, centrifugované pri 1 000 rpm, 10 min, 4°C, a následne použité ako kondiciované médium (CM).

Izolácia RNA a real-time PCR (qPCR): RNA bola izolovaná s použitím TRI Reagent™ podľa protokolu od výrobcu a následne sa 1 µg RNA použil na reverznú transkripciu. qPCR sa uskutočnila s použitím SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix. Nastavenia prístroja boli nasledovné: 10 min pri 95°C, 40 cyklov pri 95°C počas 15 s a 60°C počas 1 min. Sekvencie primerov boli: CA9 sense: 5'-ACTGCCTATGAGCAGTTGCT-3' a CA9 antisense: 5'-TAGCCGAGAGTCACCAGGTC-3', β-aktín sense: 5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3' a β-aktín antisense: 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'.

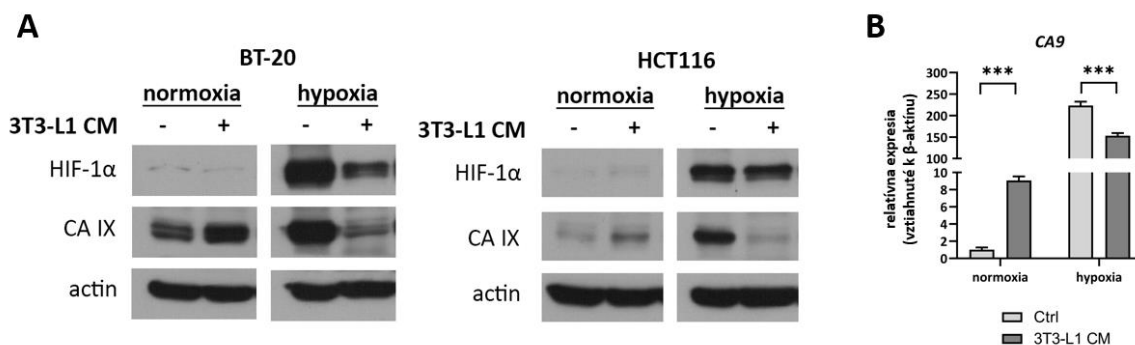
SDS PAGE a Western Blot (WB): Bunkové extrakty boli pripravené v lyzačnom roztoku (150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0,05% deoxycholát sodný, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4). 30 µg proteínov bolo zmiešaných s 2x Laemmliho pufrom a nanesených na 10% SDS PAGE gél. Po elektroforetickej separácii boli proteíny prenesené na PVDF membránu. Následne boli membrány blokované v 5% odtučnenom mlieku a inkubované s primárnymi protilátkami voči proteínom CA IX (M75, 1:3, hybridómové médium) [8], HIF-1α (1:250; BD Biosciences, 610959) a β-aktín (1:5000; Cell Signaling, #3700). Po premytí boli membrány inkubované so sekundárnymi protilátkami (polyklonové kozie anti-myšie IgG konjugované s peroxidázou, P0447, DAKO) nariedenými 1:5000 v 5% odtučnenom mlieku. Signál bol vizualizovaný pomocou chemiluminiscenčného (ECL) činidla na röntgenových filmoch.

Analýza adhézie: Bunky HCT116 wild-type a HCT116 KO CA9 boli opracované s CM alebo čerstvým médiom (kontrola) počas 24 h. Následne boli založené na 96-jamkovú platničku (50 000 buniek/jamka) a po dobu 1 h boli ponechané

adherovať. Médium s neadherovanými bunkami bolo odsaté a adherované bunky boli premyté s PBS. Po 4-hodinovej inkubácii bola adhézia vyhodnotená MTT testom podľa protokolu od výrobcu a absorbancia bola zmeraná pri 570 nm.

Výsledky a diskusia

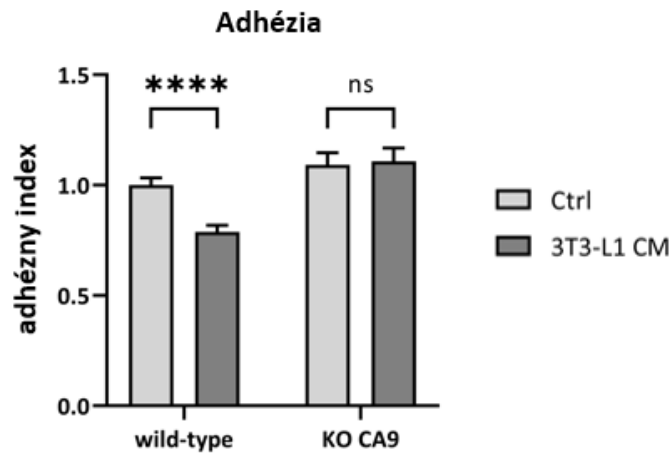
Nádorové bunky derivované z karcinómu hrubého čreva a prsníka boli najskôr založené v požadovanej hustote, následne (po 24 h) opracované s CM alebo čerstvým médiom a kultivované v normoxických alebo hypoxických podmienkach. Kým v normoxii sme po pridaní CM získaného z bunkovej línie 3T3-L1 pozorovali zvýšenú expresiu proteínu CA IX, tak v hypoxii došlo k poklesu hladiny CA IX (Obr. 1A). Tento efekt bol zreteľný nielen v bunkách derivovaných z karcinómu hrubého čreva (HCT116), ale aj v bunkách derivovaných z karcinómu prsníka (BT-20). V súlade s výsledkami získanými prostredníctvom WB bola pozorovaná signifikantne zvýšená hladina génu CA9 v normoxii (> 9-násobok) a signifikantne znížená expresia CA9 v hypoxických podmienkach (p hodnota < 0,001) (Obr. 1B). Taktiež sme po opracovaní oboch bunkových línií s CM pozorovali ovplyvnenú hladinu α podjednotky proteínu HIF-1 čo naznačuje, že k zvýšeniu hladiny CA IX v normoxii dochádza v dôsledku aktivácie hypoxiou-indukovanej signálnej dráhy.



Obrázok 1. Vplyv kondicionovaného média (CM) derivovaného z 3T3-L1 adipocytov na expresiu CA IX v bunkách odvodených z nádorov hrubého čreva a prsníka. A) WB analýza proteínov CA IX a HIF-1 α po opracovaní buniek s CM v normoxii a hypoxii počas 24 h. Hladina β -aktínu slúži ako kontrola nanesenia rovnakého množstva proteínov na gél. B) qPCR analýza génu CA9 po opracovaní buniek s 3T3-L1 CM. Dáta sú prezentované ako priemer \pm SD. *** $p < 0,001$

Na základe literatúry vieme, že CM z adipocytov prispieva k invázií buniek karcinómu prsníka a hrubého čreva [2, 9], avšak presný mechanizmus nie je zatiaľ známy. Preto sme sa rozhodli sledovať vplyv CM z adipocytov na adhézne vlastnosti HCT116 buniek prirodzene exprimujúcich gén CA9 (HCT116 wild-type) a porovnať ich s bunkami s vyradeným génom CA9 (HCT116 KO CA9). Ako je znázornené na grafe v Obrázku 2, opracovanie HCT116 wild-type buniek s 3T3-L1 CM viedlo k významnému zníženiu ich adhémie oproti kontrolným bunkám bez CM. Naopak,

v bunkách HCT116 KO CA9 nebol pozorovaný žiadny rozdiel v adhézne kapacite po pridaní CM oproti kontrole. Tento výsledok naznačuje, že znížená adhézia buniek HCT116 je priamo sprostredkovaná proteínom CA IX a jeho zvýšenou expresiou v nádorových bunkách po opracovaní 3T3-L1 CM.



Obrázok 2. Adhézia buniek opracovaných s kondicionovaným médiom (CM) získaným z 3T3-L1 adipocytov. Bunky HCT116 wild-type boli spolu s bunkami s vyradeným génom CA9 (HCT116 KO CA9) opracované s 3T3-L1 CM po dobu 24 h a následne boli analyzované adhézne vlastnosti nádorových buniek. Dáta sú prezentované ako priemer \pm SD. n.s. $p \geq 0,05$; **** $p < 0,0001$

Záver

Naše výsledky dokazujú, že faktory prítomné v sekretóme adipocytov ovplyvňujú hladinu CA IX v nádorových bunkách. Kým v normoxických podmienkach je expresia CA IX vplyvom CM zvýšená, tak v hypoxii dochádzalo k poklesu jej expresie. Vzhľadom k pozitívnej korelácii s hladinou HIF-1 α predpokladáme, že pozorovaný efekt CM na CA IX je výsledkom ovplyvnenia hypoxiou-indukovanej signálnej dráhy. Po opracovaní buniek s CM bola taktiež pozorovaná znížená adhézia HCT116 wild-type buniek, avšak žiadny efekt nebol zreteľný pri HCT116 bunkách s vyradeným génom CA9. Je zrejmé, že efekt CM na adhéziu nádorových buniek je sprostredkovaný proteínom CA IX. Na základe spomínaných výsledkov môžeme konštatovať, že v prítomnosti adipocytov vedú nádorové bunky nadobudnúť vlastnosti, ktoré zvýšia ich invazívny potenciál. Ďalšie analýzy nám umožnia odhaliť význam adipocytmi-indukovanej expresie CA IX v nádorových bunkách a tým lepšie pochopiť molekulárne mechanizmy spájajúce obezitu a rakovinu.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore projektov VEGA 2/0050/24, APVV-19-0098 a APVV-20-0480.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016; 375: 794-798. <https://doi.org/10.1056/NEJMs1606602>
- [2] Carter JC, Church FC. Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility. *Exp Mol Pathol* 2012; 92: 312-317. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.03.005>
- [3] Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60: 7075-7083.
- [4] Svastova E, WitarSKI W, Csaderova L, Kosik I, Skvarkova L et al. Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J Biol Chem* 2012; 287: 3392-3402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286062>
- [5] Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Semin Cancer Biol* 2015; 31: 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.08.002>
- [6] Kery M, Oravcova N, Radenkovic S, Iuliano F, Tomaskova J et al. Pyruvate dehydrogenase kinase 1 and carbonic anhydrase IX targeting in hypoxic tumors. *Neoplasma* 2018; 66: 63-72. https://doi.org/10.4149/neo_2018_180531N357
- [7] Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 2012; 425: 88-90. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.005>
- [8] Pastoreková S, Závadová Z, Kostál M, Babusíková O, Závada J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology* 1992; 187: 620-626. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90464-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90464-z)
- [9] Amemori S, Ootani A, Aoki S, Fujise T, Shimoda R et al. Adipocytes and preadipocytes promote the proliferation of colon cancer cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G923-929. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00145.2006>

ÚLOHA ESTROGÉNOVÉHO RECEPTORA SPRIAHNUTÉHO S G-PROTEÍNMÍ (GPER) PRI VZNIKU A PROGRESII KARCINÓMU PROSTATY



Martina Mečiaková¹, Monika Kmeťová Sivoňová¹, Ján Kliment², Róbert Dušenka², Daniel Evin^{1,3}, Martina Knoško Brožová¹, Marta Vilčková¹, Jana Jurečeková¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin, Slovensko

²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine a Univerzitná nemocnica Martin, Urologická klinika, Martin, Slovensko

³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine a Univerzitná nemocnica Martin, Klinika nukleárnej medicíny, Martin, Slovensko

Úvod

Karcinóm prostaty patrí celosvetovo medzi najčastejšie onkologické ochorenia postihujúce mužov. Hlavným rizikovým faktorom podmieňujúcim vznik ochorenia je vek. Karcinóm prostaty postihuje najmä mužov starších ako 50 rokov [1]. Medzi rizikové faktory tiež patria etnicita, familiárna predispozícia, genetické a environmentálne faktory [2].

Vznik a progresia karcinómu prostaty závisí najmä od pohlavných hormónov [1]. Estrogény, hoci sú považované hlavne za ženské pohlavné hormóny, zohrávajú dôležitú úlohu pri udržiavaní zdravia mužov, ako aj pri karcinogenéze prostaty. Estradiol sa u mužov zúčastňuje na regulácii spermatogenézy, erektilnej funkcie a udržiavaní zdravého libida [3]. Estrogény pôsobia prostredníctvom estrogénových receptorov. Klasické estrogénové receptory ER α a ER β sa nachádzajú vo vnútri bunky a po naviazaní ligandu majú priamy genómový efekt, ktorým modulujú transkripciu vybraných génov. ER α zodpovedá za zvýšenú proliferáciu buniek, čím môže podporovať karcinogenézu prostaty, kým ER β vedie k aktivácii apoptózy a má pravdepodobne skôr protektívny účinok. Estrogénový receptor spriahnutý s G-proteínmi (GPER) je lokalizovaný na bunkovej membráne a v endoplazmatickom retikule. Zabezpečuje rýchle negenómové pôsobenie estrogénov nezávislé od ovplyvnenia transkripcie. Po naviazaní estrogénov na GPER dochádza k aktivácii vnútrobunkových signálnych kaskád, ktoré regulujú bunkovú proliferáciu, bunkový cyklus, apoptózu, ako aj ďalšie procesy. Presná úloha GPER pri karcinóme prostaty nie je zatiaľ známa, predpokladá sa skôr jeho protektívne pôsobenie [1]. Aktivácia GPER pomocou selektívneho agonistu G-1 viedla k inhibícii rastu a k nekroze kastrofene rezistentného karcinómu prostaty, čo z neho robí potenciálny terapeutický cieľ[4].

Cieľom práce bolo sledovať asociáciu medzi polymorfizmami (rs3808350, rs3808351) lokalizovanými v promótorovej oblasti *GPER1* génu kódujúceho GPER receptor a rizikom vzniku a progresie karcinómu prostaty. Zároveň sme sledovali



expresiu *GPER1* génu v tkanivách karcinómu prostaty, ako aj vplyv sledovaných polymorfizmov na zmeny expresie tohto génu.

Materiály a metódy

Študovaná populácia. Štúdia zahrňovala 724 pacientov s histologickým potvrdením karcinómom prostaty (Vek: $\bar{x} = 66,5$, $SD = 9,6$) a kontrolnú vzorku 668 zdravých mužov (Vek: $\bar{x} = 66,5$, $SD = 9,6$). Vzorky tkaniva boli získané od 48 pacientov s karcinómom prostaty (Vek: $\bar{x} = 69$, $SD = 7,9$) a ako kontrolná vzorka bolo použité rutinne odobraté tkanivo benígnej hyperplázie prostaty (BHP) od 39 pacientov (Vek: $\bar{x} = 68,9$, $SD = 7,9$). Štúdia bola schválená Etickou komisiou Univerzity Komenského v Bratislave a všetci muži predložili informovaný súhlas s účasťou na štúdiu.

Genotypizácia. Genómová DNA bola izolovaná z krvi pomocou The Wizard® Genomic DNA Purification kitu (Promega Corporation). Polymorfizmy boli analyzované pomocou alelovo špecifickej PCR reakcie. Polymorfizmus rs3808350 bol analyzovaný pomocou nasledujúcich primerov: P1 (A): 5' CTA TTT TTA AGT GAC ATG TCG CA 3', P2 (G): 5' TAA AAA TTC AAA CCT TGA AAT ATC C 3', P3 (1): 5' CAG TAC AAG TTA CTT ACC CGC C 3', P4 (2): 5' ATA TGT ACC TTT TTG TAT TTG GAT GAT A 3'. PCR mastermix obsahoval 100 ng DNA, 2,4 μ l 5X HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL (Solis BioDyne OÜ), 0,5 μ l každého primeru a 6,6 μ l nuclease-free H₂O. PCR program pozostával z 15 min počiatočnej denaturácie pri 95°C, po ktorej nasledovalo 37 cyklov - 20s pri 95°C, 45s pri 58°C, 1 min pri 72°C, a finálna polymerizácia 10 min pri 72°C. PCR produkty boli separované pomocou 3% agarózovej elektroforézy. Výsledné produkty mali veľkosť 205 bp pre alelu A a 294 bp pre alelu G. Polymorfizmus rs3808351 bol analyzovaný pomocou nasledujúcich primerov: P1 (G): 5' GGC TTG GGG GGC CTC GCT ATG 3', P2 (A): 5' CGA TGG CCG CCC CAT GAG TGT 3', P3 (1): 5' CTC ATA CTC AGC GGA CAA AGG ATC ACT CAG C 3', P4 (2): 5' CTG CTC ATG GTT GCG GAT TTC ACA GTC T 3'. PCR master mix obsahoval: 100 ng DNA, 2,4 μ l 5X HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL (Solis BioDyne OÜ), 0,5 μ l primerov P1 a P2, 0,3 μ l primerov P3 a P4 a 7 μ l nuclease-free H₂O. PCR program pozostával z 15 min počiatočnej denaturácie pri 95°C, po ktorej nasledovalo 32 cyklov - 20s pri 95°C, 45s pri 67,3°C, 1 min pri 72°C, a finálna polymerizácia 10 min pri 72°C. Produkty boli separované pomocou 4% agarózovej elektroforézy. Výsledné produkty mali veľkosť 196 bp pre alelu G a 231 bp pre alelu A.

Analýza génovej expresie. RNA bola izolovaná z tkanív pomocou AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kitu (Qiagen GmbH). Na prepis RNA (1 μ g) do cDNA bol použitý RT2 First Strand kit (Qiagen GmbH). Na semi-kvantitatívnu real-time PCR bol použitý RT2 qPCR Primer Assay for Human *GPER1* (Qiagen GmbH) a ako referenčný gén bol použitý *GAPDH*.

Štatistická analýza. Vypočítali sme frekvenciu jednotlivých genotypov u pacientov s karcinómom prostaty a u zdravých mužov. Asociácia s karcinómom prostaty bola sledovaná kalkuláciou Odds ratio. Analýza expresie génu *GPER1* bola sledovaná pomocou Livakovej metódy. C_q hodnoty *GPER1* génu boli porovnané s C_q hodnotami referenčného génu a následne bola získaná hodnota ΔC_q . Fold-change bol vypočítaný ako $2^{-\Delta\Delta C_q}$.

Výsledky a diskusia

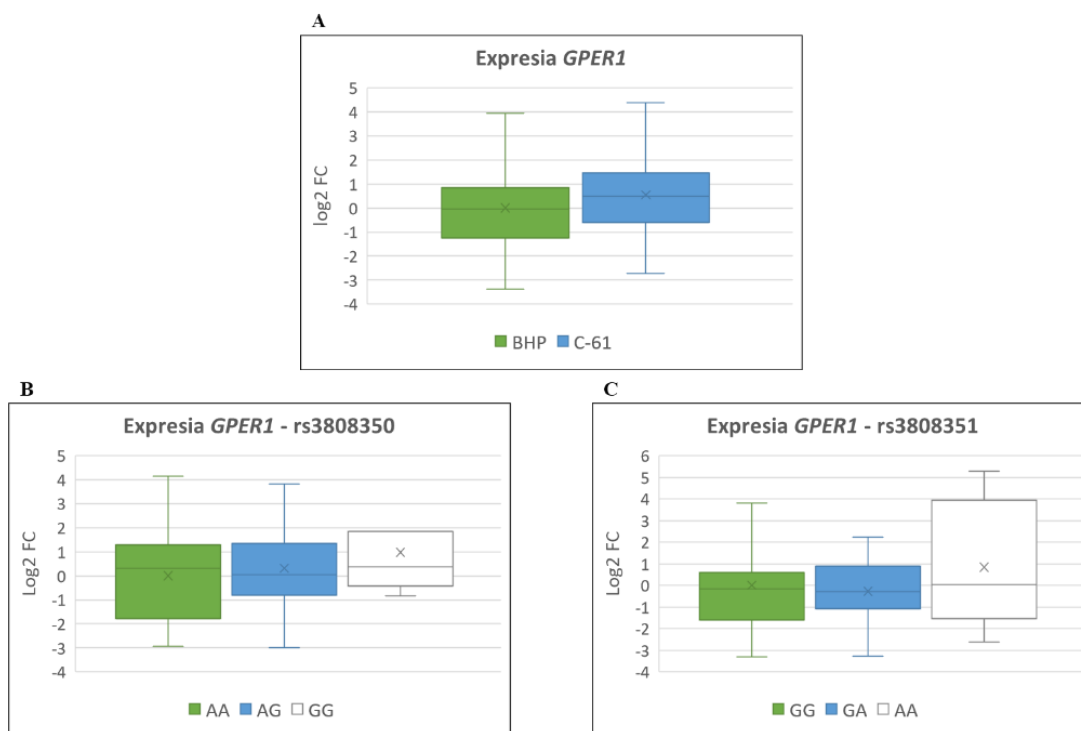
Zistili sme štatisticky významnú asociáciu AG genotypu (OR=1,33, p=0,02), GG genotypu (OR=1,41, p=0,04), ako aj G alely (OR=1,22, p=0,01) polymorfizmu rs3808350 s rizikom vzniku karcinómu prostaty. Polymorfizmus rs3808351 nevykazoval žiadnu asociáciu s rizikom vzniku karcinómu prostaty (Tab. 1). Po rozdelení pacientov podľa vybraných klinicko-patologických parametrov sme zistili významnú asociáciu GG genotypu rs3808350 polymorfizmu so zvýšeným rizikom karcinómu prostaty u pacientov s hladinou PSA nižšou ako 10 ng/ml (OR=1,54, p=0,0437), Gleasonovým skóre ≤ 7 (OR=1,50, p=0,04) a pT3/pT4 štádiom (OR=2,16, p=0,05). Nezistili sme asociáciu medzi vybranými klinicko-patologickými parametrami a rs3808351 polymorfizmom.

Doteraz nebola publikovaná štúdia asociácie týchto dvoch polymorfizmov s rizikom vzniku karcinómu prostaty. Polymorfizmy rs3808350 a rs3808351 sú však považované za potenciálne prognostické markery progresie onkologických ochorení a to najmä u Ázijskej populácie [5]. Najviac študované sú tieto polymorfizmy pri karcinóme prsníka, kde sa zistila asociácia polymorfizmu rs3808351 s histopatologickými charakteristikami (veľkosť nádoru, stupeň malignity) [6].

Pri analýze expresie *GPER1* v tkanivách sme celkovo zistili 1,46-násobne vyššiu expresiu u pacientov s karcinómom prostaty v porovnaní s kontrolnou skupinou (Obr. 1). Expresia *GPER1* u karcinómu prostaty nie je jednoznačne popísaná. Kým niektoré štúdie popisujú zníženú expresiu *GPER1* u karcinómu prostaty s nízkym Gleasonovým skóre, iné zistili zvýšenú expresiu *GPER1* u kastrocačne rezistentného karcinómu prostaty. Zmeny expresie *GPER1* v tkanivách karcinómu prostaty sú pravdepodobne podmienené štádiom ochorenia [4,7].

Tabuľka 1. Asociácia vybraných *GPER1* polymorfizmov s rizikom vzniku karcinómu prostaty

rs3808350	OR (95% CI)	Hodnota p
AA	ref.	
AG	1,33 (1,06 - 1,68)	0,02
GG	1,41 (1,03 - 1,95)	0,04
Alela A	ref.	
Alela G	1,22 (1,04 - 1,42)	0,01
rs3808351	OR (95% CI)	Hodnota p
GG	ref.	
AG	0,96 (0,77 - 1,20)	0,70
AA	1,14 (0,80 - 1,22)	0,49
Alela G	ref.	
Alela A	1,03 (0,87 - 1,21)	0,75



Obrázok 1. Analýza expresie GPER1. A) Sledovanie expresie GPER1 v tkanivách pacientov s karcinómom prostaty a u pacientov s BHP. B) Sledovanie vplyvu polymorfizmu rs3808350 na expresiu GPER1. C) Sledovanie vplyvu polymorfizmu rs3808351 na expresiu GPER1.

Hoci sme v našej práci sledovali zvýšenú expresiu *GPER1* u pacientov s karcinómom prostaty v porovnaní s kontrolnou skupinou, tieto výsledky nezohľadňujú štádium ochorenia. Zistili sme tiež, že pacienti s GG genotypom rs3808350 polymorfizmu majú 1,96-násobne vyššiu expresiu *GPER1* v porovnaní s pacientami s AA genotypom. Zvýšená expresia *GPER1* u pacientov so sledovanými polymorfizmami je pravdepodobne podmienená lokalizáciou daných polymorfizmov v promótorovej oblasti a ich následným vplyvom na transkripciu *GPER1* génu.

Výsledky našej práce poukazujú na možnú významnú úlohu GPER v patogenéze karcinómu prostaty.

Pod'akovanie

Tento projekt vznikol s podporou grantu VEGA no. 1/0014/22

Zoznam použitej literatúry

- [1] Figueira M, Cardoso HJ, Socorro S. The role of GPER signaling in carcinogenesis: A focus on prostate cancer, pp 59-117. In: Fayyaz S, Farooqi A (Eds.). Recent

Trends in Cancer Biology: Spotlight on Signaling Cascades and microRNAs. Springer Cham, 2018, p. 308. ISBN 978-3-319-71553-7

- [2] Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC et al. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7: 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- [3] Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian Journal of Andrology* 2016; 18: 435-440. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.173932>
- [4] Lam HM, Ouyang B, Chen J, Ying J, Wang J et al. Targeting GPR30 with G-1: a new therapeutic target for castration-resistant prostate cancer. *Endocrine Relat Cancer* 2014; 21: 903-914. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0402>
- [5] Ulhaq ZS, Soroya GV, Milliana A, Tse KFW. Association between GPER gene polymorphisms and GPER expression levels with cancer predisposition and progression. *Heliyon* 2021; 7: e06428. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06428>
- [6] Giess M, Lattrich C, Springwald A, Goerse R, Ortmann O et al. GPR30 gene polymorphisms are associated with progesterone receptor status and histopathological characteristics of breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 118: 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.09.001>
- [7] Rago V, Romeo F, Giordano F, Ferraro A, Carpino A. Identification of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in human prostate: expression site of the estrogen receptor in the benign and neoplastic gland. *Andrology* 2016; 4: 121-127. <https://doi.org/10.1111/andr.12131>

ANALÝZA ROZDIELOV METABOLIZMU MASTNÝCH KYSELÍN V TESTIKULÁRNYCH NÁDOROVÝCH BUNKÁCH SENZITÍVNYCH A REZISTENTNÝCH NA CISPLATINU



Viktória Piatriková¹, Eva Kocianová¹, Božena Omasta²,
Jana Tomášková², Tereza Goliaš¹

¹Biomedicínske centrum, SAV, Virologický ústav, Oddelenie nádorovej biológie, Bratislava, Slovenská republika;

²Biomedicínske centrum, SAV, Virologický ústav, Oddelenie ekológie vírusov, Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Testikulárne nádory síce nepredstavujú častú malignitu, ale postihujú predovšetkým mladých chlapcov a mužov. V prípade neskorej diagnostiky alebo výskytu chemorezistencie sú to práve títo mladí muži v produktívnom veku, ktorí prídu o život. Predpokladá sa, že v európskych krajinách celkový počet pacientov s rakovinou semenníkov vzrastie do roku 2035 až o 13 % [1].

S rastúcim počtom prípadov stúpa aj počet pacientov rezistentných na cytostatikum cisplatinu (CisPt), ktorá predstavuje hlavné liečivo tohto ochorenia. Keďže nádorové bunky dokážu modulovať svoj metabolizmus, aby si zabezpečili prežívanie aj v nepriaznivých podmienkach nádorového mikroprostredia ovplyvneného chemoterapiou, porozumenie rozdielov medzi bunkami senzitívnymi a rezistentnými na chemoterapiu by mohlo viesť k pochopeniu mechanizmov vzniku chemorezistencie [2].

Súčasný výskum poukazuje na obrovský význam mastných kyselín (MK) pre proces tumorigenézy. Príklady zahŕňajú zvýšenú závislosť nádorových buniek na *de novo* syntézu a exogénnu absorpciu MK nielen na udržanie ich rýchlej proliferácii, ale aj na ich funkciu ako základný energetický zdroj počas podmienok metabolického stresu, ktorý môže byť navodený napríklad aj chemoterapiou [3].

Vzhľadom na dôležitosť MK pre tumorigénne procesy je cieľom našej práce porovnávať expresiu enzýmov potrebných na syntézu MK v bunkách citlivých a rezistentných na CisPt. Konkrétne sme sa zamerali na enzýmy ako je adenosíntrifosfát-citrátlyáza (ACLY), acetyl-koenzým A karboxyláza 1 (ACC1), syntáza mastných kyselín (FASN) a transkripčný faktor sterolový regulačný prvok viažuci proteín 1 (SREBP-1), ktorý reguluje ich expresiu.

Na významnú rolu metabolizmu MK pri CisPt rezistencii sme poukázali aj pomocou farmakologickej inhibície FASN inhibítorom C75 a inhibície ACC1 inhibítorom TOFA.



Materiály a metódy

Kultivácia buniek. Pracovali sme s testikulárnou nádorovou líniou NTERA-2, senzitivnou a rezistentnou na CisPt (dar od Dr. Kaľavská, Národný onkologický ústav, Bratislava). Bunky sme kultivovali v kultivačných miskách s médiom DMEM obsahujúcim 10 % fetálne teľacie sérum (FCS) a 50 mg/ml gentamicín pri teplote 37 °C v termostate Forma Direct Heat CO2 Incubator (Thermo Scientific).

Western blot. Jeden deň po nasadení 1 000 000 buniek na miskú sme bunky zlyzovali pomocou lyzačného roztoku RIPA (1 mM EDTA, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X100, 0,05 % deoxycholát sodný). Po elektroforetickej separácii proteínov pomocou SDS-PAGE a ich transfere na PVDF membránu (Macherey-Nagel), sme membránu blokovali v 5 % mlieku. Následne sme membránu inkubovali s primárnymi protilátkami (ACC1 Rb 1:1000, ACLY Rb 1:1000, 1:1000, FASN Rb 1:1000, BACT M 1:10000, SREBP-1 M 1:250). Po inkubácii sme membránu premyli a následne ju inkubovali v mixe sekundárnych protilátok (LiCor α -Rb-800CW 1:10 000 a α -M-680RD 1:10 000) Fluorescenčný signál sme skenovali skenerom Odyssey CLx (LI-COR).

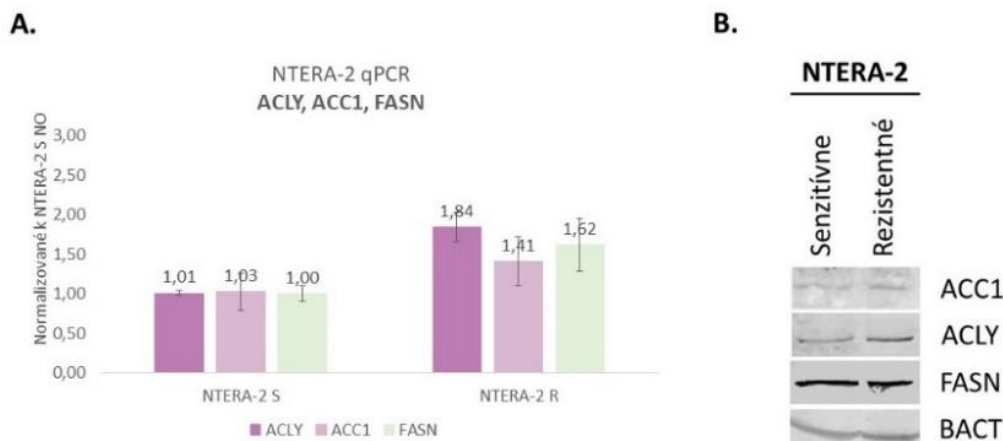
qPCR. Sledovanie expresie génov sme uskutočnili pomocou metódy qPCR. Využili sme SsoAdvanced universal SYBR® Green supermix (Bio-Rad Laboratories). Amplifikáciu (40 cyklov) sme uskutočnili v prístroji StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) s amplifikačným programom 95°C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min.

Luciferázový test. Transfekciu sme vykonali 24 hod po založení 500 000 buniek na kultivačné misky. Na transfekciu sme využili plazmidy pDLR-Luc (SRE) (*firefly*) a 100 ng Renilly (*sea pansy*). Po 24 hod inkubácii sme bunky zlyzovali pomocou protokolu kitu Dual-Luciferase Report Assay System 10-Pack (Promega) a luciferázovú aktivitu merali prístrojom Synergy H4 Microplate Reader (BioTek).

Testovanie viability buniek. Bunky (1000 buniek/jamka) sme založili na 96-jamkovú platničku. Po 24 hod sme pridali 1 μ M CisPt a 25 μ M C75 - inhibítor FASN, 0,5 μ M TOFA - inhibítor ACC). Po 4 dňovej inkubácii sme viabilitu stanovili pridaním farbičky Cell Titer Blue (Promega), ktorú sme s bunkami inkubovali 4 dni a následne sme odmerali intenzitu fluorescencie prístrojom SYNERGY H4 microplate reader (BioTek) pri vlnových dĺžkach excitácia 530 a emisia 590.

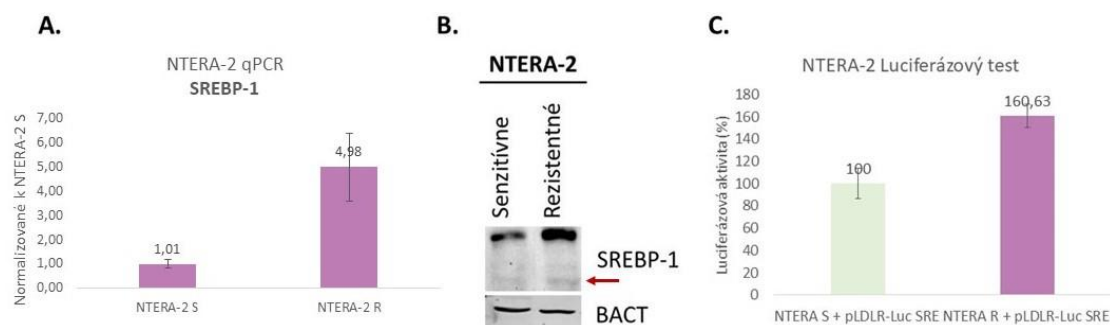
Výsledky a diskusia

Dnes už vieme, že dysregulovaný metabolizmus lipidov môže prispievať k plasticite nádorových buniek a súvisieť so vznikom chemorezistencie [4]. V prípade testikulárnej nádorovej línie NTERA-2 sa javí, že na cisplatinu rezistentné bunky majú zvýšenú expresiu enzýmov syntézy MK - ACLY, ACC1 a FASN (Obr. 1A). Avšak, zvýšené množstvo daných proteínov sme v rezistentných bunkách pozorovali iba v prípade enzýmov ACC1 a ACLY (Obr. 1B).



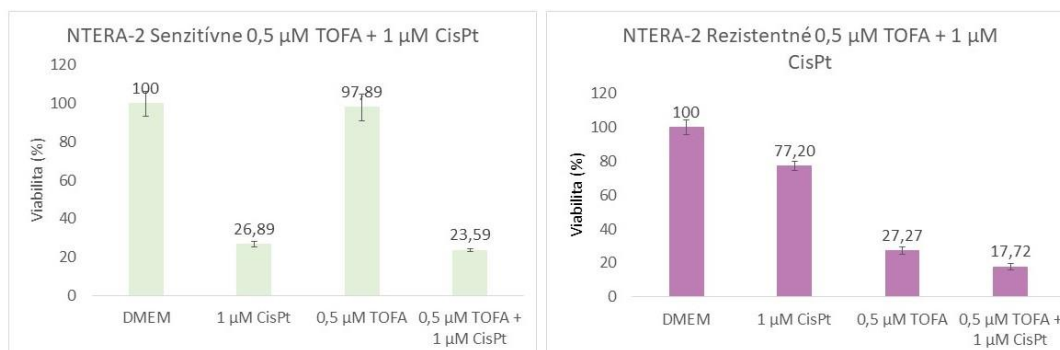
Obrázok 1. Expresný profil ACLY, ACC1, FASN v testikulárnej nádorovej línii NTERA-2. A) Rezistentné bunky vykazujú zvýšenú mieru expzie enzýmov ACLY, ACC1, FASN na úrovni mRNA. B) Na úrovni proteínov majú rezistentné bunky zvýšené množstvo enzýmu ACC1 a ACLY.

Dané rozdiely nás viedli k analýze transkripčného faktora s názvom sterolový regulačný prvok viažuci proteín 1 (SREBP-1), o ktorom je známe, že sa podieľa na pozitívnej regulácii syntézy MK [5]. Pomocou metódy qPCR sme v rezistentných bunkách detegovali zvýšenú expresiu tohto transkripčného faktora (Obr. 2A). Podobný výsledok sme dosiahli aj metódou Western blot. Rezistentné bunky oproti senzitivným bunkám vykazovali zvýšené množstvo celkového SREBP-1, ale aj zvýšené množstvo jeho aktívnej štiepenej formy (Obr. 2B). Navyše, na základe luciferázového testu rezistentné bunky preukazovali zvýšenú transaktiváciu cieľových génov SREBPs, a to až o 60 % (Obr. 2C).



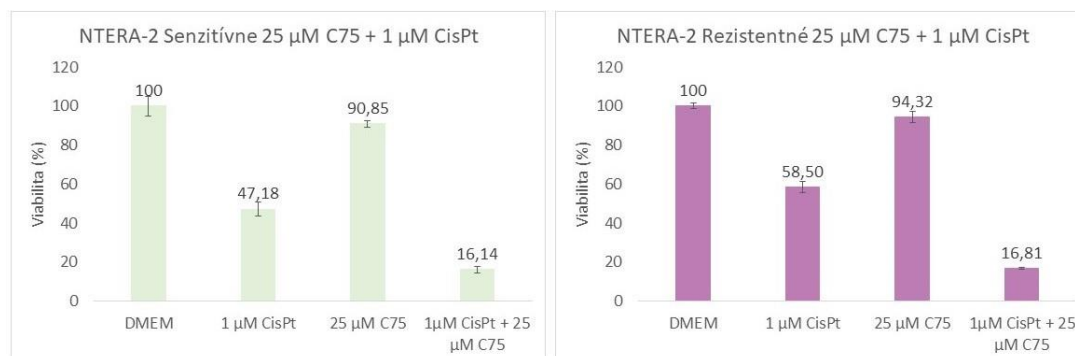
Obrázok 2. Expresný profil SREBP-1 v testikulárnej nádorovej línii NTERA-2. A) Rezistentné bunky vykazujú zvýšenú mieru expzie SREBP-1a. B) Na úrovni proteínov majú rezistentné bunky zvýšené množstvo celkovej aj aktívnej štiepenej formy SREBP-1. (červená šípka) C) Rezistentné bunky línii NTERA-2 majú zvýšenú mieru transaktivácie cieľových génov. SREBPs.

Kombinovaná terapia testovaná na viacerých typoch nádorov častokrát viedla k zmenám v metabolických dráhach súvisiacich s lipidmi, čím nastalo zvrátenie chemorezistencie [2]. Zaujímalo nás, či podobný efekt môžeme pozorovať aj v testikulárnych nádorových bunkách. Na farmakologickú inhibíciu enzýmu ACC1 sme využili inhibítora TOFA. Samotný inhibítora nemal takmer žiadny vplyv na prežívanie senzitívnych buniek, avšak v prípade rezistentných buniek nastalo zníženie viability až o 73 %. Zároveň sa nám podarilo zvýšiť účinnosť CisPt takmer o 60 % (Obr. 3).



Obrázok 3. Viability NTERA-2 buniek po inkubácii s 1 μ M CisPt a 0,5 μ M TOFA. Cílená inhibícia ACC1 viedla k zvýšeniu citlivosti buniek na CisPt.

Pomocou inhibítora C75 sme dokázali, že inhibícia FASN zvyšuje citlivosť testikulárnych nádorových buniek na CisPt. Samotný inhibítora má opäť iba mierny vplyv na prežívanie buniek. V tomto prípade sme zvýšili účinok CisPt o približne 31-42 % (Obr. 4).



Obrázok 4. Viability NTERA-2 buniek po inkubácii s 1 μ M CisPt a 25 μ M C75. Inhibícia enzýmu FASN mala za následok zvýšenie účinku CisPt.

Záver

Na základe výsledkov našich experimentov predpokladáme, že na transkripčnej úrovni majú testikulárne nádorové bunky rezistentné na CisPt podporenú expresiu enzýmov syntézy MK. Zároveň sme dokázali, že cílená farmakologická inhibícia

vybraných enzýmov syntézy MK zvyšuje citlivosť testikulárnych nádorových buniek na CisPt. Napriek tomu, že na porozumenie komplexnej regulácie tohto metabolizmu v testikulárnych nádoroch je potrebné vykonať hlbšiu analýzu, veríme, že nami poskytnuté dôkazy preliminárneho charakteru poukazujú na potenciál kombinovanej terapie zacielenej na metabolizmus MK.

Pod'akovanie

Táto práca bola vytvorená vďaka projektom VEGA 2/0099/23, VEGA 2/0078/23 a APVV-22-0341.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Znaor A, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Laversanne M, Kuliš T et al. Testicular cancer incidence predictions in Europe 2010-2035: A rising burden despite population ageing. *Int J Cancer* 2020; 147: 820-828. <https://doi.org/10.1002/ijc.32810>
- [2] Wang Z, Wang Y, Li Z, Xue W, Hu S et al. Lipid metabolism as a target for cancer drug resistance: progress and prospects. *Front Pharmacol* 2023; 14: 1274335. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1274335>
- [3] Koundouros N, Pouligiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer* 2020; 122: 4-22. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0650-z>
- [4] Vishwa R, BharathwajChetty B, Girisa S, Santha Aswani B, Alqahtani MS et al. Lipid metabolism and its implications in tumor cell plasticity and drug resistance: what we learned thus far? *Cancer Metastasis Rev* 2024; 43: 293-319. <https://doi.org/10.1007/s10555-024-10170-1>
- [5] Zhao Q, Lin X, Wang G. Targeting SREBP-1-Mediated Lipogenesis as Potential Strategies for Cancer. *Front Oncol* 2022; 12: 952371. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.952371>

ZVRÁTENIE CHEMOREZISTENCIE NÁDOROV VZNIKAJÚCICH ZO ZÁRODOČNÝCH BUNIEK POMOCOU KOMBINOVANEJ TERAPIE ZAMERANEJ NA SUBPOPULÁCIU NÁDOROVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK



Natália Udvardová^{1,2} Lucia Kučerová^{2,3}, Michal Mego^{1,3}

¹Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

²Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i.,
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

³Jednotka translačného výskumu II. Onkologickej kliniky LFUK a NOÚ,
Klenova 1, 833 10 Bratislava

Úvod

Nádorové mikroprostredie tvorí viacero typov buniek, vrátane nádorových kmeňových buniek [1]. Tento typ buniek je svojimi vlastnosťami podobný normálnym kmeňovým bunkám, je prekursorom viacerých bunkových typov, vrátane kmeňových buniek a prekursorových buniek, ktoré ďalej diferencujú. Nádorové kmeňové bunky sú v nádore zodpovedné za progresiu, metastázovanie a taktiež súvisia s rezistenciou na protinádorovú liečbu a recidívou nádorov po liečbe. Nádorové kmeňové bunky obsahujú špecifické proteíny, tzv. markery, ktoré sa od markerov kmeňových buniek líšia v tom, že sú nadexprimované a signálne dráhy v ktorých sú zapojené sú často deregulované. Tieto markery sú špecifické biomarkery významné najmä z hľadiska diagnostiky nádorových ochorení, a predstavujú tiež sľubné terapeutické ciele [2]. Až 95% nádorov zo zárodočných buniek je detegovaných v semenníkoch (TGCT z *angl. Testicular Germ Cell Tumor*). Tieto nádory sa v populácii nevyskytujú často ale u mladých mužov vo veku od cca 15 – 44 rokov ide a o najčastejšiu malignitu so stále stúpajúcou incienciou. Liečba týchto solídnych nádorov je vďaka chirurgickému zákroku, radiológii a najmä chemoterapii na báze cisplatiny veľmi úspešná. Existuje však približne 15 – 20% pacientov, ktorý na tento typ chemoterapeutickej liečby vykazujú rezistenciu, recidívujú, a asi 3-5% týchto pacientov nakoniec ochoreniu podľahne. Práve títo pacienti vyžadujú zefektívnenie liečby.

V našej práci sme sa zamerali na detekciu markerov na paneli chemorezistentných a chemosenzitivných nádorových buniek, ktoré následne využijeme ako možný terapeutický cieľ [3, 4]. Efektívnosť vybraných látok následne testujeme in vitro aj in vivo podmienkach. Viaceré štúdie poukazujú na účinnosť konjugátu protilátka – liečivo (ADC z *angl. Antibody Drug Conjugate*) Sacituzumab Govitekanu zacieleného na povrchový marker nádorových buniek TROP – 2 pri rôznych typoch nádorov [5, 6]. Tento povrchový marker sme úspešne detegovali na niekoľkých typoch nádorových bunkových línii a pilotné štúdie dokazujú cytotoxický a protinádorový efekt.



Materiál a Metodika

Bunkové línie. V našej práci sme použili rôzne histologické subtypy nádorových zárodočných bunkových línií (*GCTs* – z *angl. Germ Cell Tumors*) vrátane embryonálneho karcinómu (2102Ep, NCCIT, TERA-1, TERA-2, NTERA-2 NEC8), choriokarcinómu (JEG-3, JAR), seminómu (TCam-2), teratómu (Susa), nádoru žltkového vaku (NOY-1), testikulárneho nádoru žltkového vaku (NCRG-1) a z nich odvodené izogénne varianty rezistentné na cisplatinu rezistené varianty. Tieto bunkové línie boli komerčne zakúpené (ATCC[®] z *angl. American Type Culture Collection*), DSMZ z *angl. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) alebo získané darom z iných laboratórií. Rezistentné varianty týchto bunkových línií boli derivované priamo v našom laboratóriu (postupným zvyšovaním selekčného tlaku cisplatiny) alebo získané darom. Kultivačné média (DMEM z *angl. Dulbecco's Modified Eagles Medium*, s obsahom glukózy 4,5g/l, Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Germany; RPMI 1640, Sigma – Aldrich; Advanced-DMEM/F12 (1X) Gibco, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA; McCoy's 5A, Sigma – Aldrich). Všetky použité media obsahovali 10% fetálne hovädzie sérum (Gibco, ThermoFischer Scientific), a Antibiotický a antimykotický roztok A5955 (100x), Sigma - Aldrich. Bunky boli kultivované v podmienkach 2D alebo 3D (vo forme multiceulárnych sféroidov), v termostate pri 37°C s 5% obsahom CO₂.

qRT-PCR. RNA bola zo vzoriek vyizolovaná pomocou komerčne dostupného kitu (NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification; Macherey – Nagel; Germany) a prepísaná do cDNA s využitím kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischer Scientific; Waltham MA, USA). V oboch prípadoch sme postupovali podľa priloženého manuálu výrobcu. Kvalita a čistota vyizolovanej RNA bola stanovená pomocou NanoDrop spektrofotometra ND – 100 (ThermoFischer Scientific). Génová expresia vo vzorkách bola sledovaná pomocou kvantitatívnej real – time PCR s využitím TaqMan sond (TaqMan[™] Gene expression Assay, FAM; ThermoFischer Scientific). Porovnanie hladiny expresie sledovaných génov bolo vyhodnotené s použitím 2 – $\Delta\Delta C_t$ metódy, pričom expresia génu GADPH (Glyceraldehyd – 3 – fosfát dehydrogenáza) bola referenčnou hodnotou. Pre priebeh reakcie bol použitý termocyklér AriaMX Real – time PCR systém (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).

Prietoková cytometria. Na detekciu povrchového markera Trop – 2 bola použitá protilátka Trop – 2 anti – human, APC REAfinity[™] clone REA916 (Miltenyi Biotec, Germany) v riedení 1:50 a bolo použitých 500 000 nádorových buniek. Mŕtve bunky boli vylúčené z analýzy na základe farbenia Sytox Green a analýza prebehla pomocou BD FACSCanto[™] II flow cytometer (Beckton Dickinson, USA), ktorý obsahuje program FACS Diva. Dáta boli vyhodnotené pomocou programu FCS Express.

Stanovenie relatívnej bunkovej viability. Na stanovenie ciltivosti buniek po ovplyvnení Sacituzumab govitekanom (SG, IMMU-132, Selleckchem, Huston, USA) bol použitý luminiscenčný kit: CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA), podľa postupu uvedeného u výrobcu. Bunky boli nasadané v množstve 1×10^5 /jamka v 100 μ l kultivačného média na 96 jamkové platničky (Cell culture microplate, F-bottom, μ CLEAR[®], white, cellstar[®], Greiner Bio-one, Germany), po 6 hodinách boli liečené SG (Selleckchem) v rôznych

koncentráciach (v technických tripikátoch). Na konci experimentu boli hodnoty vyjadrené ako priemery replikátov \pm SD, a relatívna viabilita bola uvedená v percentách. Za 100 % bunkovú viabilitu sa považovala luminiscencia kontrolných buniek bez liečiva. Hodnoty IC₅₀ sme vyhodnotili pomocou Graphpad Prism[®] (Boston, MA, USA).

3D mnohobunkové sféroidy boli kultivované v 96 – jamkových platničkách s ultra – nízkou priľnavosťou (ULA platničky, Corning[™]; Thermo Fisher Scientific, NY USA). v kultivačnom médiu 3 dni. Následne boli ovplyvnené rôznymi koncentraciami liečiva - SG, (Selleckchemm). Po 4 dňoch bola relatívna viabilita 3D mnohobunkových sféroidov odtestovaná pomocou testu CellTiter-Glo[™] 3D Cell Viability Assay (Promega Corporation) a výsledky boli vyhodnotené pomocou Graphpad Prism[®] (Graphpad Inc., La Jolla, CA, USA).

In vivo experimenty. V súlade s inštitucionálnymi smernicami a podľa schválených protokolov (ústavnou etickou komisiou a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR - Ro- 5862-3/2023-220) boli použité 6 až 8 – týždňové myši NSG[®] (NOD.Cg-Prkdcscid II2rgtm1 wjl/SzJ/ *). Vhodná bunková línia bola vybraná na základe predošlých *in vitro* výsledkov, a podaná suspenzia obsahovala 1×10^6 buniek v 100 μ l zmesi: extracelulárnej matrix (ECM Gel - Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma liquid, BioRea, Lamballe – France) 1:1 (50 μ l média DMEM bez séra, 50 μ l ECM). Bunková suspenzia bola podaná bilaterálne subkutánne každej zo skupiny 8 NSG myší. Na 7. deň, po dosiahnutí hmatateľných nádorov 1x1 mm u všetkých zvierat, bol 4 myšiam podaný intravenozne liek Trodelvy[®] (SG 200mg; prášok na koncentrát na infúzny roztok; registračné číslo: EU/1/21/1592/001) v množstve 17,5mg/kg. Zvieratám bolo podaných maximálne 8 dávok s frekvenciou dvakrát týždenne [7]. Dvom zvieratám zo skupiny bola podaná cisplatina (Hospira UK Ltd., Warwickshire, UK) (3mg/kg/dávka; maximálne 4 dávky s frekvenciou 1x týždenne). Nádory boli zmerané posuvným meradlom a objem vypočítaný podľa vzorca pre objem elipsoidu: $\text{objem} = 0,52 \times ((\text{šírka} + \text{dĺžka})/2)^3$. Zvieratá boli utratené, keď nádory presiahli objem 1 cm³, v prípade zhoršeného zdravotného stavu skôr. Výsledky boli vyhodnotené v Graphpad Prism[®] (Graphpad Inc., La Jolla, CA, USA).

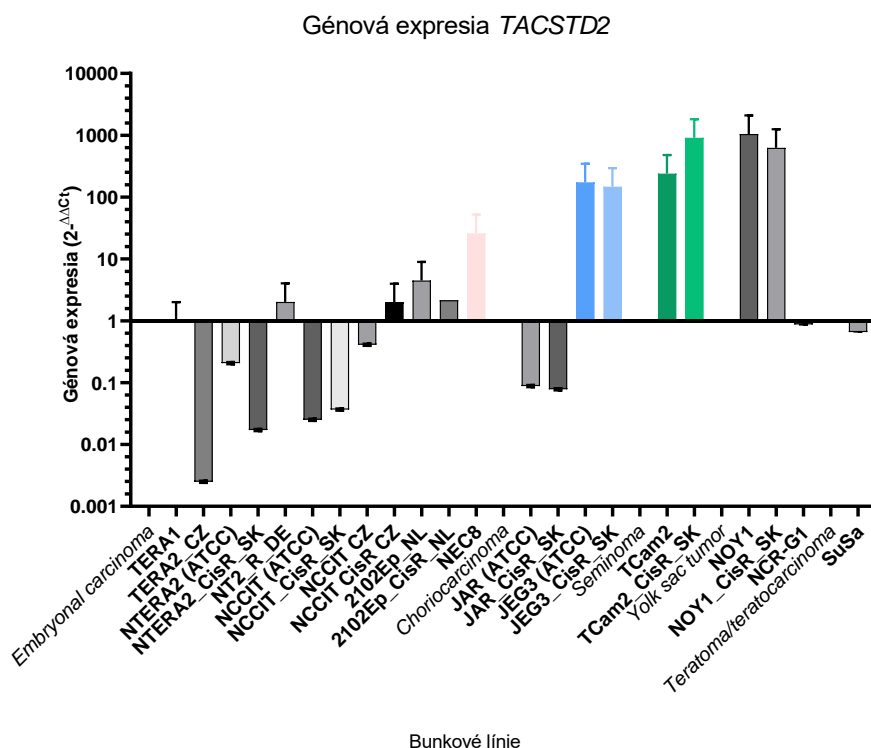
Výsledky a diskusia

Cisplatina ako chemoterapeutické činidlo je veľmi účinná pri mnohých solídnych nádoroch vrátane TGCT avšak u niektorých pacientov vzniká chemoterapeutická rezistencia, následkom ktorej dochádza k recidíve ochorenia, pacienti majú zlú prognózu a zomierajú. Celkový mechanizmus rezistencie TGCT nie je doposiaľ objasnený [8-10]. Niektoré bunkové línie TGCT dokonca vykazujú skríženú rezistenciu na viaceré platínové analógy (oxaliplatina, karboplatina) [11]. Práve z tohto hľadiska je dôležité skúmať nové terapeutické možnosti, nezávislé od liekov na báze platiny.

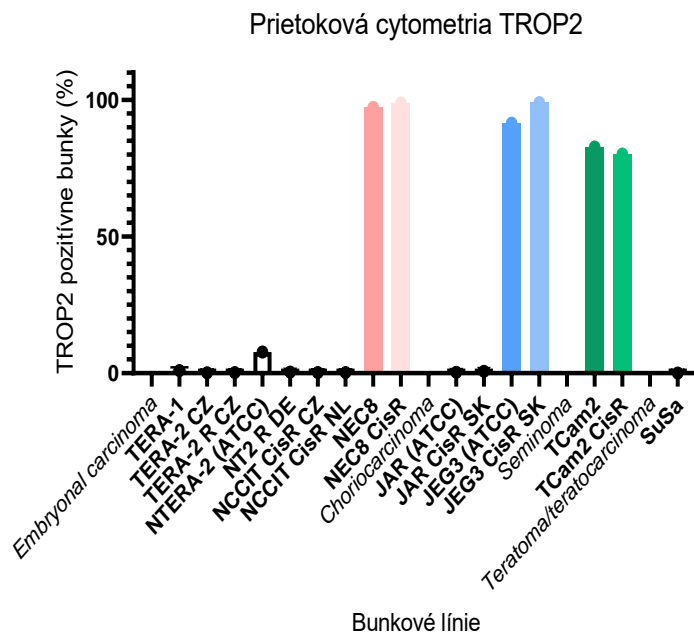
Viaceré štúdie dokazujú účinnosť imunoterapeutického prístupu konjugátu protilátka – liek (ADC) Sacituzumab Govitekan zacieleného na povrchový marker nádorových buniek TROP – 2 pri rôznych typoch nádorov [5, 6]. SG je doposiaľ

schválený FDA pre metastatický trojito – negatívny karcinóm prsníka (TNBC – z angl. *Triple – negative breast cancer*) a metastatický uroteliálny karcinóm [5, 12].

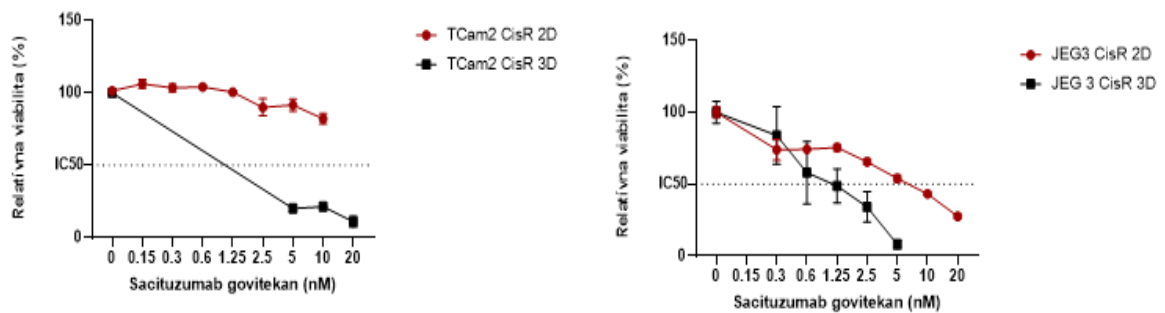
Expresia Trop – 2, transmembránového glykoproteínu, bola potvrdená v nádorových zárodočných bunkách NTERA – 2 a Susa (1 – internetový zdroj uvedený v referenciách). V našej práci bola expresia TROP – 2 analyzovaná viacerých histologických podtypoch GCT. Výsledky dokazujú nadexpresiu génu *TACSTD2* a zároveň aj proteínu Trop – 2 u bunkových línií histologických podtypov GCT: choriokarcinóm – JEG3 a jeho cisplatina – rezistentného variantu JEG3 CisR, seminómu (TCam2, TCam2 CisR), nádoru žltkového vaku (NOY1, NOY1 CisR) a embryonálneho karcinómu (NEC8) (Obr. 1 a 2). Cytotoxicita SG *in vitro* poukázala, že u bunkovej línie JEG3 CisR a TCam2 CisR bola senzitivita v 3D multicelulárnych sféroidoch vyššia v porovnaní s bunkovou líniou kultivovanou v 2D prostredí (v monovrstve). Hodnoty IC_{50} boli: IC_{50} (TCam2 CisR 2D) = > 10 nM SG; IC_{50} (TCam2 CisR 3D) = 1,25 nM SG; IC_{50} (JEG3 CisR 2D) = 8 nM SG; (JEG3 CisR 3D) = 1,25 nM SG (Obr. 3). Toto zistenie naznačuje jeho možný protinádorový účinok *in vivo*. Taktiež bola overená cytotoxicita liečiva Irinotekan *in vitro* bez naviazania na humanizovanú monoklonálnu protilátku, ktorá špecificky rozoznáva povrchový marker TROP-2. Z výsledkov vyplýva, že na dosiahnutie čo najvyššej citlivosti GCT je potrebný ADC SG a nie len jeho cytotoxický agent Irinotekan.



Obrázok 1. Stanovenie génovej expresie *TACSTD2* génu vo vybraných bunkových líniách

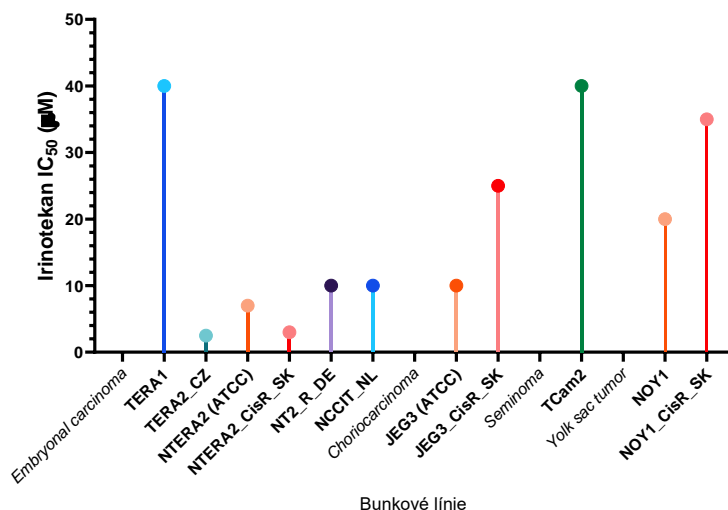


Obrázok 2. Percentuálne vyjadrenie pozitivity Trop – 2 vo vybraných bunkových líniách GCT



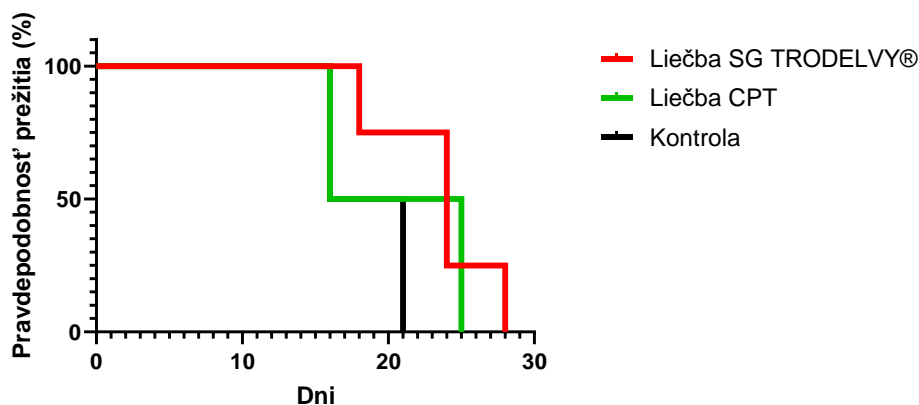
Obrázok 3. Stanovenie citlivosti SG na 2D a 3D bunkovom modeli línií TCam2 CisR a JEG3 CisR.

Na overenie protinádorového účinku SG TRODELVY® bola v pilotnom experimente na skupine 8 zvierat subkutánne bilaterálne injikovaná bunková línia JEG3 CisR. Zvieratá boli rozdelené do troch skupín. Neliečená skupina predstavovala kontrolu (n=4 xenografty), liečená kontrola ošetrovaná cisplatinou (n=4 xenografty) a liečená kontrola SG TRODELVY® (n=8 xenograftov). Napriek tomu, že skupina zvierat liečená SG TRODELVY® dosahovala najdlhšiu dĺžku prežívania v porovnaní s kontrolami ale aj skupinou liečenou cisplatinou, tieto výsledky nedosiahli štatistickú významnosť (Obr. 4).

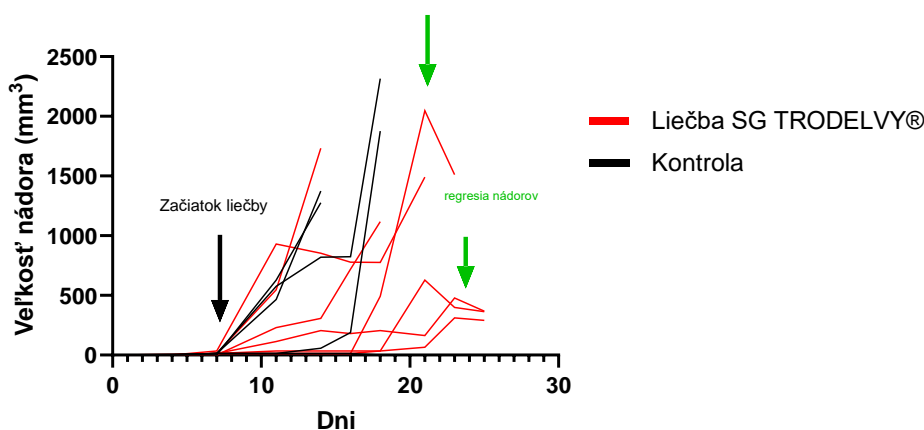


Obrázok 4. Citlivosť bunkových línií GCT na Irinotekan.

JEG3 CisR je agresívny typ choriokarcinómu so zlou progresiou [13]. V našom *in vivo* experimente sme pozorovali rýchly, agresívny rast nádorov a väčšina zvierat, ktoré boli liečené, musela byť z dôvodu zhoršujúceho sa zdravotného stavu a prekročenia veľkosti nádoru 1x1cm³, utratená skôr, než im bola podaná plná dávka liečiva. Toto viedlo k obmedzeniu sledovania možného dlhodobého účinku liečiva. Avšak, všetky xenografty liečené SG TRODELVY® po 14. dni od začatia liečby vykazovali regresiu. Dlhodobý efekt sa nám však práve z dôvodu agresivity tohto ochorenia nepodarilo sledovať (Obr. 5 a 6).



Obrázok 5. Pravdepodobnosť prežitia (%) zvierat po podaní SG TRODELVY® v porovnaní s neliečenými zvieratami a zvieratami liečenými cisplatinou.



Obrázok 6. Zmena veľkosti nádorov (mm^3) po podaní liečby SG TRODELVY® v porovnaní s neliečenými kontrolami.

Záver

S ohľadom na naše doterajšie výsledky plánujeme skúmať cytotoxický a protinádorový účinok liečiva Sacituzumab govitekan na ďalších GCT, ktoré exprimujú povrchový marker TROP – 2. Nové poznatky získané v tomto výskume by mohli viesť k zavedeniu ADC v liečbe TGCT pacientov a priniesť nové liečebné možnosti pre pacientov rezistentných na chemoterapeutické liečivá na báze platiny.

PodĎakovanie

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja – grant APVV-20-0158, APVV-21-0197, grant VEGA 2/0124/21 a s podporou Nadácie Výskum Rakoviny a Liga proti rakovine.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ju F, Atyah MM, Horstmann N, Gul S, Vago R et al. Characteristics of the cancer stem cell niche and therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13: 233. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02904-1>
- [2] Oren O, Smith BD. Eliminating Cancer Stem Cells by Targeting Embryonic Signaling Pathways. *Stem Cell Rev Rep* 2017; 13: 17-23. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9691-3>
- [3] Cabral ERM, Pacanhella MF, Lengert AVH, Dos Reis MB, Leal LF et al. Somatic mutation detection and KRAS amplification in testicular germ cell tumors. *Front Oncol* 2023; 13: 1133363. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1133363>

- [4] Oldenburg J, Berney DM, Bokemeyer C, Climent MA, Daugaard G et al. Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2022; 33: 362-375. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.01.002>
- [5] Bardia A, Mayer IA, Vahdat LT, Tolaney SM, Isakoff SJ et al. Sacituzumab Govitecan-hziy in Refractory Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2019; 380: 741-751. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1814213>
- [6] Sakach E, Sacks R, Kalinsky K. Trop-2 as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2022; 14: 5936. <https://doi.org/10.3390/cancers14235936>
- [7] Cardillo TM, Govindan SV, Sharkey RM, Trisal P, Arrojo R et al. Sacituzumab Govitecan (IMMU-132), an Anti-Trop-2/SN-38 Antibody-Drug Conjugate: Characterization and Efficacy in Pancreatic, Gastric, and Other Cancers. *Bioconjug Chem* 2015; 26: 919-931. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00223>
- [8] McHugh DJ, Gleeson JP, Feldman DR. Testicular cancer in 2023: Current status and recent progress. *CA Cancer J Clin* 2024; 74: 167-186. <https://doi.org/10.3322/caac.21819>
- [9] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [10] Országhová Z, Kalavská K, Mego M, Chovanec M. Overcoming Chemotherapy Resistance in Germ Cell Tumors. *Biomedicines* 2022; 10: 972. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050972>
- [11] Perry J, Powles T, Shamash J, Veerupillai A, McGrowder E et al. The relative activity of cisplatin, oxaliplatin and satraplatin in testicular germ cell tumour sensitive and resistant cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 925-933. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-0944-6>
- [12] Faltas B, Goldenberg DM, Ocean AJ, Govindan SV, Wilhelm F et al. Sacituzumab Govitecan, a Novel Antibody--Drug Conjugate, in Patients With Metastatic Platinum-Resistant Urothelial Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2016; 14: e75-79. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.10.002>
- [13] Watanabe E, Yokoi A, Yoshida K, Sugiyama M, Kitagawa M et al. Drug library screening identifies histone deacetylase inhibition as a novel therapeutic strategy for choriocarcinoma. *Cancer Med* 2023; 12: 4543-4556. <https://doi.org/10.1002/cam4.5243>

Internetové zdroje:

1 www.proteinatlas.org

2 www.clinicaltrials.gov

MODELOVANIE MIKROPROSTREDIA NÁDOROV PANKREASU PRE SPOĽAHLIVEJŠIE PREDKLINICKÉ TESTOVANIE LIEČIV



Mária Urbanová¹, Verona Buociková¹, Marína Cihová¹,
Monika Buríková¹, Lucia Juhásiková¹, Laura
Drnd'áková¹, Viera Horváthová-Kajabová¹, Lucia
Rojíková¹, Marianna Maková², Ladislav Bačiak^{3,4},
Daniel Gogola⁴, Jana Jakubechová^{1,5}, Božena
Smolková¹

¹Oddelenie molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

²Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava

³Centrálne laboratória, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava

⁴Ústav merania, Slovenská akadémia vied, Bratislava

⁵Oddelenie prípravy kmeňových buniek, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

Úvod

Duktálny adenokarcinóm pankreasu (PDAC) predstavuje viac ako 90 % zo všetkých karcinómov pankreasu a odhaduje sa, že do roku 2030 sa stane druhou najčastejšou príčinou úmrtí súvisiacich s rakovinou [1]. Vysoká mortalita PDAC je dôsledkom jeho neskorej detekcie, agresívnej povahy, skorého metastázovania a vysokej rezistencie na dostupné možnosti liečby.

Nádorové mikroprostredie (TME) tvorené hustou strómou, fibrózou a podpornými stromálnymi bunkami, predstavuje majoritnú časť celkovej nádorovej hmoty nádorov PDAC (u niektorých pacientov tvorí TME až 80 % nádorovej hmoty) [2]. Nádorové mikroprostredie hrá kľúčovú rolu v progresii a odpovedi PDAC na liečbu, hlavne v dôsledku vysokej heterogenity nádorových buniek a denznej imunopresívnej povahy TME [3]. Najvýznamnejším a najviac zastúpeným komponentom PDAC TME sú fibroblasty asociované s nádorom (CAFs). Súčasná štúdia naznačujú potenciál epigenetickej terapie, vrátane epigenetického hypometylačného činidla decitabín (DAC), pri modulácii TME a zvýšení jeho citlivosti na chemoterapiu [4].

Cieľom nášho projektu bolo vytvoriť robustný predklinický model, zložený z nádorových buniek a CAFs, ktorý bude lepšie zodpovedať nádorovému prostrediu PDAC, a bude vhodný na testovanie nových terapeutických možností s využitím kombinácie štandardnej chemoterapie a DAC.

Materiál a metódy

Primokultúra CAFs derivovaná z primárnej vzorky PDAC (grade 1) bola kultivovaná v nízkoglukózovom DMEM so 6% extraktom z krvných doštičiek. Pre

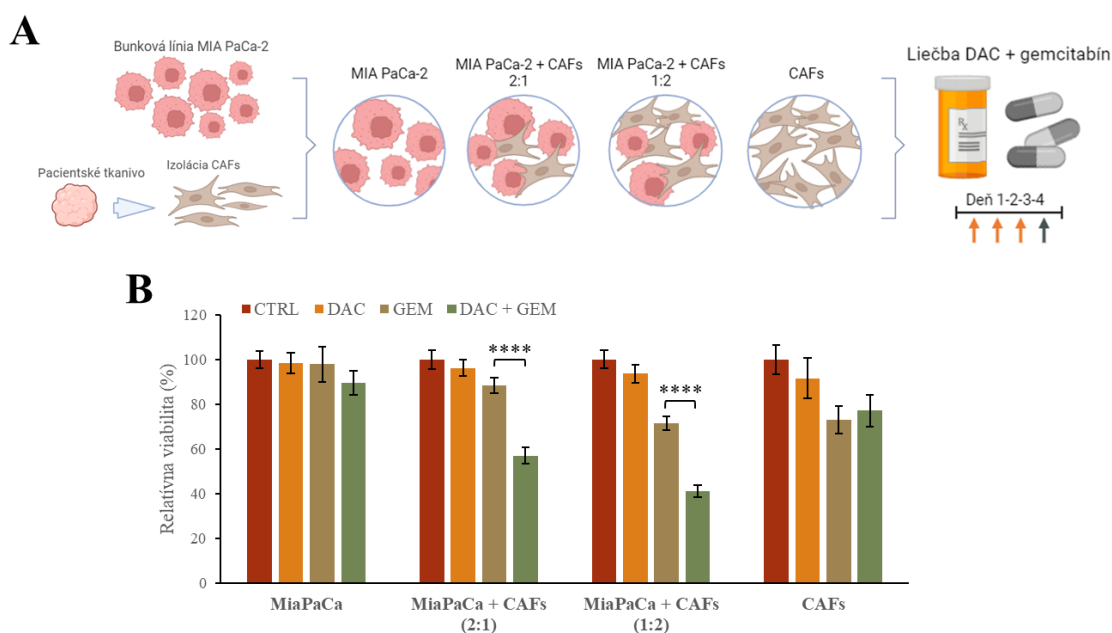


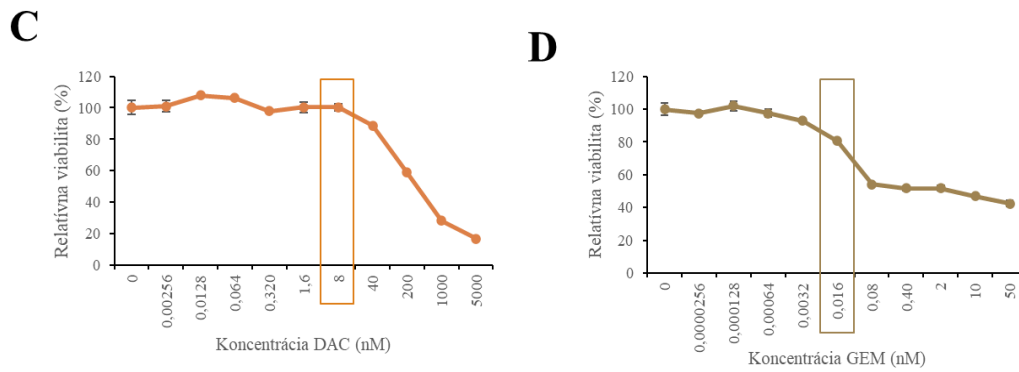
vývoj *in vitro* modelu PDAC TME bola primokultúra CAFs kokultivovaná s komerčne dostupnou nádorovou bunkovou líniou MIA PaCa-2 v pomere 2:1 a 1:2 (Obr. 1A). Následne bola táto kokultúra ovplyvnená netoxickou dávkou DAC (8 nM) a nízkou IC-20 dávkou štandardnej chemoterapie gemcitabín (0,016 nM). Výsledný efekt kombinovanej liečby na bunky bol vyhodnotený pomocou luminiscenčného testu viability.

Pre vývoj ortotopického *in vivo* modelu boli do pankreasu imunodeficientných SCID myši injikované nádorové bunky MIA PaCa-2 spolu s CAFs v pomere 2:1. Myši boli následne liečené intraperitoneálne nízkou dávkou DAC (0,5 mg/kg, 3-krát týždenne) alebo gemcitabínom (60 mg/kg, raz za 2 týždne) počas 4 týždňov (Obr. 2A). Rast nádorov bol monitorovaný raz týždenne pomocou magnetickej rezonancie (MRI) (Obr. 2B).

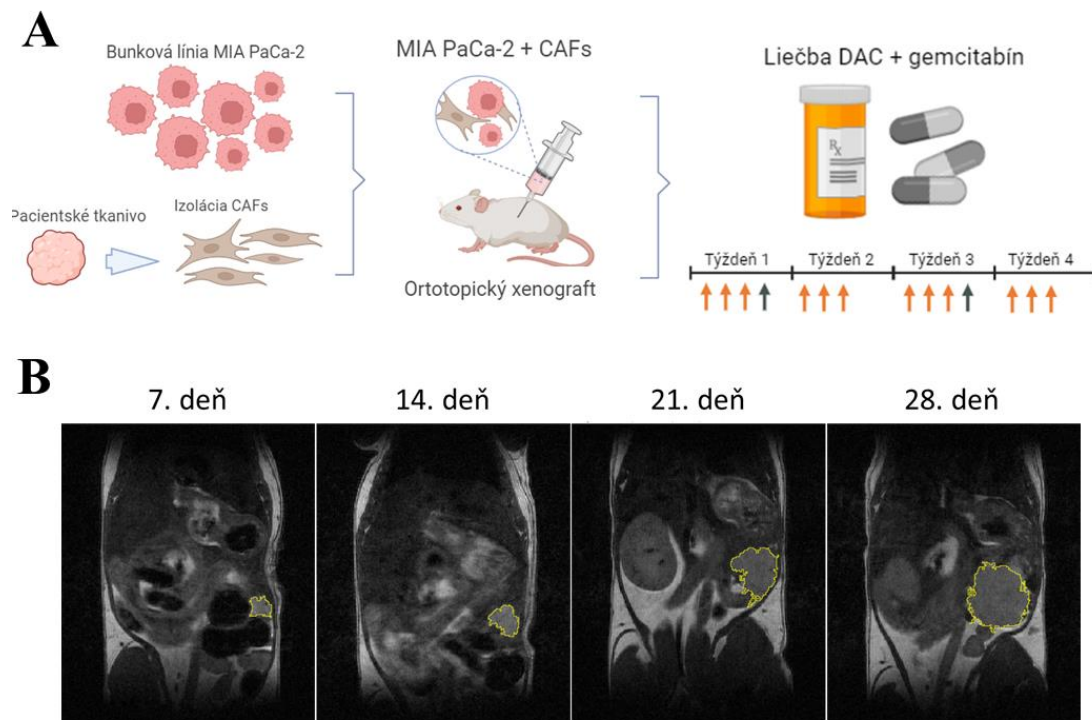
Výsledky

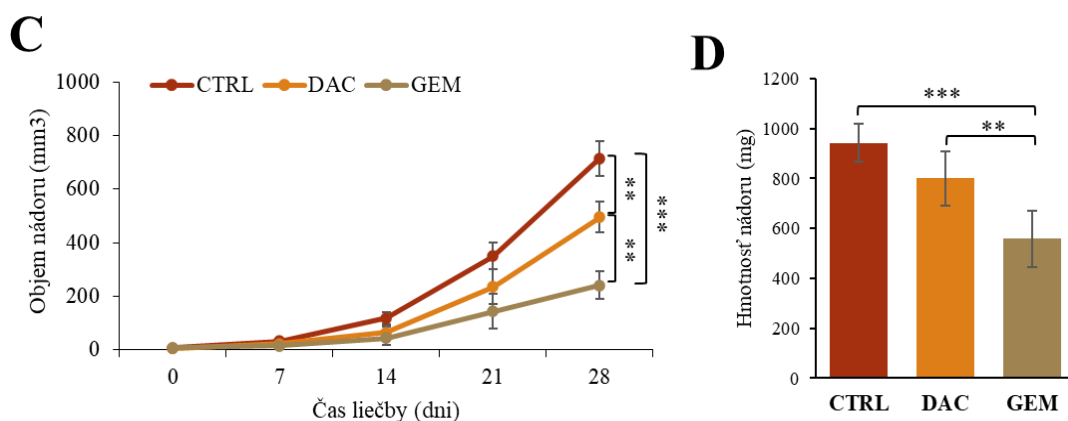
Nádorové bunky MIA PaCa-2 kokultivované s CAFs (v oboch pomeroch) lepšie reagovali na štandardnú chemoterapiu gemcitabín, ako aj na kombinovanú liečbu gemcitabínu s DAC, v porovnaní so samotnými nádorovými bunkami MIA PaCa-2 (Obr. 1B). Bunky MIA PaCa-2 na použitú koncentráciu DAC a gemcitabínu, zvolenú na základe predchádzajúceho experimentu (Obr. 1C – D), vôbec neodpovedali. Zaujímavé je, že samotné CAFs boli tiež vysoko odolné voči oboj liečbam, čo naznačuje, že práve bunkové interakcie v spoločnej kokultúre ovplyvňujú nádorové bunky a aj ich senzitivitu na liečbu.





Obrázok 1. Testovanie kombinovanej terapie na in vitro modeli PDAC TME. (A) Grafické znázornenie experimentálneho dizajnu. (B) Výsledný efekt kombinovanej liečby na nádorové bunky, CAFs a ich kokultiváciu v pomere 2:1 a 1:2. Výsledky sú zobrazené ako relatívna viabilita štandardizovaná voči neovplyvnenej kontrole \pm štandardná odchýlka. Štatistická významnosť je ** $p < 0,0001$. (C) Krivka senzitivity nádorových buniek MIA PaCa-2 na stúpajúce koncentrácie DAC; koncentrácia 8 nM predstavuje najvyššiu netoxickú dávku DAC. (D) Krivka senzitivity nádorových buniek MIA PaCa-2 na stúpajúce koncentrácie gemcitabínu; koncentrácia 0,016 nM predstavuje koncentráciu s IC-20.**





Obrázok 2. Ortotopický in vivo model PDAC TME₂ (A) Grafické znázornenie experimentálneho dizajnu. (B) Monitorovanie rastu nádorov raz týždenne pomocou MRI. (C) Efekt liečby DAC a gemcitabínom na rast ortotopických nádorov. Objem nádoru bola vypočítaná na základe MRI skenov ± štandardná odchýlka. Štatistická významnosť je *** $p < 0,001$ a ** $p < 0,01$. (D) Výsledná hmotnosť nádorov v jednotlivých skupinách po utratení (5. týždeň) ± štandardná odchýlka. Štatistická významnosť je *** $p < 0,001$ a ** $p < 0,01$.

Zvolená koncentrácia DAC aj gemcitabínu signifikantne znížila rast ortotopických nádorov derivovaných z nádorovej bunkovej línie MIA PaCa-2 a CAFs (Obr. 2C). Kombinovaná liečba DAC + gemcitabín bola pre liečené SCID myši príliš toxická a preto skupina s kombinovanou terapiou bola z etických dôvodov utratená po prvom týždni liečby. Po ukončení liečby sme vyhodnotili efekt liečby aj na výslednú hmotnosť nádorov. U skupiny liečenej gemcitabínom došlo k signifikantnému zníženiu hmotnosti (o viac ako 40 %) v porovnaní s neliečenou skupinou (Obr. 2D).

Diskusia

CAFs patria medzi hlavné zložky TME, ktoré výrazne ovplyvňujú vlastnosti nádorov. Podporujú rast, proliferáciu, invazívnosť a chemorezistenciu nádorových buniek [5].

Naša štúdia potvrdzuje významnú úlohu CAFs v odpovedi PDAC na liečbu. Prekvapivo kokultivácia nádorových buniek s CAFs viedla z zvýšeniu sensitivity buniek na štandardnú chemoterapiu ako aj jej kombináciu s DAC. Tento výsledok naznačuje, že CAFs priamo kokultivované s nádorovými bunkami predstavujú myofibroblastický subtyp myCAFs, ktorý podľa viacerých autorov podporuje odpoveď na liečbu a je asociovaný s lepšou prognózou PDAC [6, 7]. DAC preukázal významný potenciál na reprogramovanie PDAC TME. Pri jeho *in vitro* kombinácii so štandardnou chemoterapiou signifikantne zvýšil účinnosť gemcitabínu, čo v súlade s inými autormi, podporuje potenciálne využitie DAC na zvýšenie účinnosti chemoterapie [8, 9].

Naše zistenia naznačujú, že CAFs prítomné v nádoroch PDAC modulujú odpoveď na liečbu a ovplyvnenie PDAC TME prostredníctvom DAC by mohlo výrazne zvýšiť účinnosť štandardnej chemoterapie. Dostupnosť relevantných predklinických

modelov lepšie mimikujúcich TME je dôležitým predpokladom pre testovanie inovatívnych liečebných prístupov PDAC.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantmi APP0337, APP0497, APVV-20-0143, APVV-21-0197 a projektom VISION (H2020 – No 857381).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM, Nead KT. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open* 2021; 4: e214708. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.4708>
- [2] Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, Fingerle AA, Dobritz M et al. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 454-467. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.115>
- [3] Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1338. <https://doi.org/10.3390/ijms18071338>
- [4] Hackanson B, Daskalakis M. Decitabine. *Recent Results Cancer Res* 2014; 201: 269-297. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54490-3_18
- [5] Biffi G, Tuveson DA. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev* 2021; 101: 147-176. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2019>
- [6] Koh B, Jeon H, Kim D, Kang D, Kim KR. Effect of fibroblast co-culture on the proliferation, viability and drug response of colon cancer cells. *Oncol Lett* 2019; 17: 2409-2417. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9836>
- [7] Geng X, Chen H, Zhao L, Hu J, Yang W et al. Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 655152. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.655152>
- [8] Lin L, Liu X, Yu H, Deng H, Peng K et al. Inhibitory effect and related mechanism of decitabine combined with gemcitabine on proliferation of NK/T cell lymphoma cells. *Front Pharmacol* 2023; 14: 1134895. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1134895>
- [9] Xu S, Jiang C, Lin R, Wang X, Hu X et al. Epigenetic activation of the elongator complex sensitizes gallbladder cancer to gemcitabine therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2021; 40: 373. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02186-0>

PROFILOVANIE EXPRESIE IMUNITNÝCH KONTROLNÝCH BODOV V MYELÓMOVOM MIKROPROSTREDÍ



Zuzana Valušková¹, Nikoleta Csicsátková¹, Katarína Suroviaková¹, Mária Elisabeth Marinkovičová¹, Linda Zbellová¹, Gábor Beke^{1,2}, Andrea Mlčáková³, Tatiana Železníková⁴, Ľuboš Kl'učár², Ján Sedlák¹, Ľuboš Drgoňa⁵, Danka Cholujová¹, Jana Jakubíková¹

¹Oddelenie imunológie nádorov, Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava, SK

²Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava, SK

³Oddelenie laboratórnej hematológie a transfúziológie, Národný onkologický ústav, Bratislava, SK

⁴Úsek prietokovej cytometrie, Onkologický ústav sv. Alžbety, s. r. o., Bratislava, SK

⁵Klinika onkohematológie LF UK, Národný onkologický ústav, Bratislava, SK

Úvod

Mnohopočetný myelóm (MM) je nevyliciteľné, biologicky heterogénne nádorové ochorenie plazmatických buniek. MM predstavuje približne 1% zo všetkých neoplastických ochorení a je druhou najčastejšou hematologickou malignitou na svete. Klonálna expanzia malígnych plazmatických buniek v kostnej dreni vedie k nadprodukcii nefunkčných imunoglobulínov a imunoglobulínových reťazcov [1]. U väčšiny pacientov s MM predchádzajú aktívnemu symptomatickému MM premalígne štádiá, konkrétne monoklonálna gamapatia neurčitého významu (MGUS) a/alebo tlejúci mnohopočetný myelóm (SMM), ktoré sú charakterizované absenciou klinických symptómov súvisiacich s MM [2]. Pre rast a prežívanie myelómových buniek má okrem cytogenetických abnormalít kľúčovú úlohu nádorové mikroprostredie, ktoré predstavujú mezenchymálne stromálne bunky, makrofágy a monocyty infiltrujúce nádor. MM bunky majú schopnosť vyhnúť sa imunitnému systému hostiteľa potlačením imunitnej odpovede moduláciou imunitných buniek, ako sú aktivácia vyčerpaných T buniek, neschopnosť prezentovať antigén a akumulácia supresorových imunitných buniek. Imunitná odpoveď je regulovaná imunitnými kontrolnými bodmi, membránovými receptormi nachádzajúcimi sa na imunitných bunkách, ktoré sú aktivované po rozpoznaní svojich ligandov na antigén prezentujúcich bunkách alebo nádorových bunkách. Proteín programovanej smrti 1 (PD-1), cytotoxický lymfocytový antigén 4 (CTLA-4), lymfocyty aktivujúci gén 3 (LAG-3), T bunkový imunoglobulín a proteín obsahujúci mucínovú doménu 3 (TIM-3) a T bunkový imunoreceptor s imunoglobulínovou a ITIM doménou (TIGIT) sú imunosupresívne imunitné kontrolné body, ktoré negatívne regulujú aktiváciu imunitných efektorových buniek a tým znižujú protinádorovú odpoveď [3]. Naopak, stimulačné molekuly ako sú indukovaťelný T bunkový kostimulátor (ICOS), glukokortikoidmi indukovaný s TNFR rodinou súvisiaci gén (GITR), CD27, CD40 a 4-1BB zvyšujú úroveň imunologických reakcií



proti malígnym bunkám. Napriek tomu, že sa terapia monoklonálnymi protilátkami proti imunitným kontrolným bodom stala významnou v boji proti MM, len malá podskupina pacientov liečených inhibítormi imunitných kontrolných bodov dosiahla významné klinické výsledky. Lepšie pochopenie MM mikroprostredia kostnej drene a bunkových, molekulárnych a regulačných mechanizmov medzi nádorovou bunkou a imunitnou bunkou je kľúčové pri vývoji nových a účinnejších liečebných postupov pre pacientov s MM [4].

Materiál a metódy

Pacientska kohorta. Kostná dreň bola odobratá jedincom s MGUS (n = 20) a pacientom s aktívnym mnohopočetným myelómom (n = 140) počas štandardného diagnostického vyšetrenia. Vzorky pacientov boli zaradené do štúdie po podpísaní písomného informovaného súhlasu v súlade s protokolom Helsinskej deklarácie.

Imunofenotypová analýza. Po lýze erytrocytov s NH₄Cl pufrom v kostnej dreni boli leukocyty farbené špecifickými monoklonálnymi protilátkami CD45, CD38, CD19, CD3, CD4, CD8 a CD56 konjugovanými s fluorochrómami a analyzované prietokovým cytometrom Special FACS Aria™ UV laser (Becton Dickinson). Gatovacou stratégiou sme definovali populáciu CD19⁺ B lymfocytov, CD4⁺ pomocných T lymfocytov, CD8⁺ cytotoxických T lymfocytov, CD3-CD56⁺ NK buniek a taktiež malígne plazmatické bunky s CD45 nízkym a CD38⁺ fenotypom. Expresia imunitných kontrolných bodov bola stanovená monoklonálnymi protilátkami proti PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG-3, B a T lymfocytovému atenuátoru (BTLA), TIM-3, TIGIT, ICOS, členovi superrodiny receptora tumor nekrotizujúceho faktora 4 (OX40), 2B4, DNAX doplnkovej molekuly 1 (DNAM-1), CD27 a 4-1BB. Získané dáta boli vyhodnotené programom De Novo FCS Express 7 a štatisticky zhodnotené programom GraphPad Prism použitím neparametrického Mann-Whitney U testu.

Výsledky a diskusia

Profilovaním adaptívneho nádorového mikroprostredia sme na celkovej populácii T buniek analyzovali širokú škálu imunitných kontrolných bodov. Štatisticky vyššiu expresiu imunitných kontrolných bodov 2B4, TIGIT a PD-1 sme zaznamenali v aktívnom štádiu MM v porovnaní so štádiom MGUS. PD-1 je imunitný kontrolný bod, ktorý v aktívnom komplexe so svojimi ligandmi PD-L1 a PD-L2 znižuje proliferáciu a aktiváciu T buniek. Podobne zvýšené hladiny PD-1 boli detegované na T bunkách u novodiagnostikovaných MM pacientov oproti zdravým jedincom [5]. Naopak, signifikantne vyššiu expresiu CD27 sme pozorovali v MGUS oproti aktívnemu MM. Následne sme expresiu imunitných kontrolných bodov stanovili na podtypoch T buniek a to konkrétne na CD4⁺ pomocných T lymfocytoch, na ktorých sme pozorovali podobný expresný profil PD-1 a CD27 a aj vysoké hladiny aktivačných imunoreceptorov ICOS, OX40, DNAM-1. CD8⁺ T bunky v porovnaní s CD4⁺ T bunkami mali hladiny stimulačných receptorov znížené, pričom vykazovali vysokú expresiu inhibičných imunitných kontrolných bodov ako PD-1, 2B4 a TIGIT. TIGIT viaže 2 ligandy CD155 a CD112 a zistilo sa, že progresia myelómu je spojená práve s jeho vysokými hladinami na CD8⁺ T bunkách s dysfunkčným fenotypom a neschopnosťou produkovať cytokíny

[6]. Sumárne, vysoké hladiny ko-stimulačných imunoreceptorov boli zaznamenané na CD4+ T bunkách a naopak, expresia inhibičných imunitných kontrolných bodov bola vyššia na CD8+ T bunkách.

Prirodzené zabíjačské bunky (NK) sú bunky prirodzeného imunitného systému s priamou cytotoxickou a supresorovou aktivitou proti nádorovým bunkám. Analyzovaním NK buniek sme v porovnaní s T bunkami zaznamenali nízku expresiu imunitných kontrolných bodov PD-1 a CD27 so štatisticky významnou expresiou CTLA-4 v aktívnom myelóme v porovnaní so štádiom MGUS. Hladiny imunitných kontrolných bodov TIGIT, 2B4 a DNAM-1 boli na NK bunkách podobné ako aj na T lymfocytoch. Vyčerpaný fenotyp NK buniek pozorovaný vo vzorkách kostnej drene u pacientov s MGUS naznačuje dysfunkciu NK buniek už v skorom štádiu MM transformácie [7].

Na B bunkách sme zaznamenali vyššie hladiny inhibičného receptora TIGIT s jeho ligandom PVR a PD-1 s ligandmi PD-L1/PD-L2 a nízku expresiu CTLA-4, BTLA a 4-1BB, pričom ligand 4-1BB mal signifikantne vyššiu expresiu v aktívnom MM v porovnaní so štádiom MGUS. Spomedzi molekúl inhibičných imunitných kontrolných bodov je jedinečnou vlastnosťou inhibície TIGIT pomocou monoklonálnych protilátok zosilnenie nielen protinádorových efektorových odpovedí T buniek, ale aj NK bunkových odpovedí a tiež zníženie supresívnej aktivity T regulačných buniek [8]. Okrem toho, silný kostimulačný signál 4-1BB podporuje proliferáciu T buniek a tvorbu pamäťových buniek, a zároveň je pre svoju protinádorovú aktivitu v myelóme využívaný v CAR T bunkovej terapii druhej generácie [9].

Na populácii malígnych plazmatických buniek sme v MGUS a v aktívnom MM pozorovali vysokú expresiu inhibičných imunitných kontrolných bodov CTLA-4 a TIGIT spolu s vyššou expresiou TIM-3, PD-1, BTLA, DNAM-1, CD27 a ICOS. Malígne bunky taktiež vykazovali nízke hladiny receptorov LAG-3, 2B4, 4-1BB a OX40. BTLA je široko exprimovaný na povrchu nádorových buniek, kde zohráva dôležitú úlohu v protinádorovej aktivite a úniku buniek pred imunitným dohľadom [10]. Navyše, získanie nových údajov o účinkoch mutácií súvisiacich so stratou funkcie TIM-3 a výsledkov z prvých klinických štúdií s protilátkami blokujúcimi TIM-3 u pacientov s MM pomôže definovať TIM-3, buď ako kostimulačný alebo inhibičný receptor. Lepšie pochopenie expresie imunitných kontrolných bodov a komplexnosti imunitného mikroprostredia v MM môže viesť k vývoju nových imunoterapeutických stratégií.

Záver

V našej štúdií sme analyzovali niekoľko inhibičných a aktivačných imunitných kontrolných bodov. PD-1 bol vysoko exprimovaný na každej analyzovanej populácii okrem NK buniek v obidvoch MM štádiách. V premalígnom štádiu MGUS sme na CD3+ a CD4+ T lymfocytoch stanovili signifikantne vyššiu expresiu CD27, zatiaľ čo v aktívnom myelóme na T bunkách dochádzalo k zvýšenej expresii inhibičných imunitných kontrolných bodov 2B4, PD-1 a TIGIT, čo naznačuje, že práve tieto molekuly by mohli mať význam v transformácii ochorenia z MGUS do MM.

Pod'akovanie

Táto štúdia bola podporená grantmi 2019/14-BMCSAV-9, APVV-16-0484, APVV-20-0183, APVV-19-0212 a APVV-21-0215.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Cowan AJ, Allen C, Barac A, Basaleem H, Bensenot I et al. Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncol* 2015;4: 1221-1227. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2128>
- [2] Dhodapkar MV. MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood* 2016; 128: 2599-2606. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-692954>
- [3] Marhelava K, Pilch Z, Bajor M, Graczyk-Jarzynka A, Zagozdzon R. Targeting Negative and Positive Immune Checkpoints with Monoclonal Antibodies in Therapy of Cancer. *Cancers (Basel)* 2019; 11: 1756. <https://doi.org/10.3390/cancers11111756>
- [4] Díaz-Tejedor A, Lorenzo-Mohamed M, Puig N, Garscía-Sanz R, Mateos MV et al. Immune System Alterations in Multiple Myeloma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies to Reverse Immunosuppression. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 1353. <https://doi.org/10.3390/cancers13061353>
- [5] Danhof S, Schreder M, Knop S, Rasche L, Striffler S et al. Expression of programmed death-1 on lymphocytes in myeloma patients is lowered during lenalidomide maintenance. *Haematologica* 2018; 103: e126-e129. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.178947>
- [6] Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, Kassem S, Teo T et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8+ T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood* 2018; 132: 1689-1694. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-825265>
- [7] Costello RT, Boehrer A, Sanchez C, Mercier D, Baier C et al. Differential expression of natural killer cell activating receptors in blood versus bone marrow in patients with monoclonal gammopathy. *Immunology* 2013; 139: 338-341. <https://doi.org/10.1111/imm.12082>
- [8] Ge Z, Peppelenbosch MP, Sprengers D, Kwekkeboom J. TIGIT, the Next Step Towards Successful Combination Immune Checkpoint Therapy in Cancer. *Front Immunol* 2021; 12: 699895. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.699895>
- [9] Stoll A, Bruns H, Fuchs M, Völkl S, Nimmerjahn F et al. CD137 (4-1BB) stimulation leads to metabolic and functional reprogramming of human monocytes/macrophages enhancing their tumoricidal activity. *Leukemia* 2021; 35: 3482-3496. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01287-1>
- [10] Malissen N, Macagno N, Granjeaud S, Granier C, Moutardier V et al. HVEM has a broader expression than PD-L1 and constitutes a negative prognostic marker and potential treatment target for melanoma. *Oncoimmunology* 2019; 8: e1665976, Dec. 2019, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1665976>

EXPRESIA VYBRANÝCH ČLENOV TGF- β /SMAD SIGNÁLNEJ DRÁHY V PROGRESII A PREŽÍVANÍ PACIENTOV S KOLOREKTÁLNYM KARCINÓMOM



Ivana Večurkovská¹, Jana Mašlanková¹, Marek Stupák¹,
Jana Kaťuchová², Veronika Roškovičová², Peter Bohuš³

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Košice

²I. chirurgická klinika, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika a Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura, Lekárska fakulta, Košice

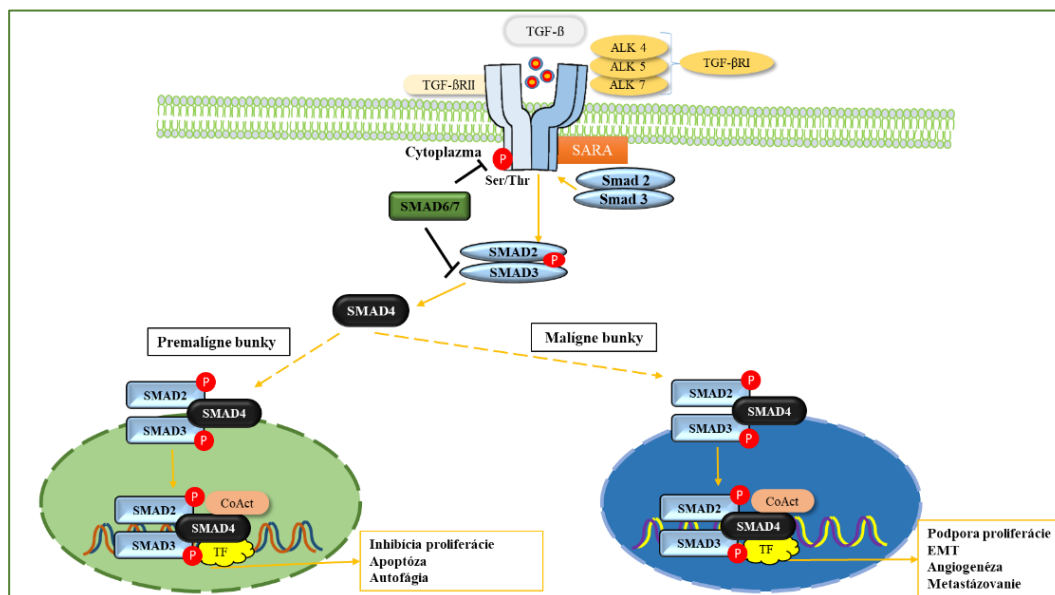
³Ústav patológie, Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura, Košice

Úvod

Kolorektálny karcinóm (CRC) je druhým najčastejším typom rakoviny u žien (9,2%) a tretím najčastejším u mužov (10%). V roku 2020 sa Slovensko umiestnilo na 2. mieste v rebríčku krajín s najvyššou incidenciou a mortalitou na CRC celosvetovo, pričom tento kritický trend u nás naďalej pretrváva [1, 2]. Štandardné liečebné postupy zahŕňajú chirurgické odstránenie tumor a chemoterapiu, ktorá môže byť neúspešná z dôvodu častých vedľajších účinkov a vzniku rezistencie na lieky. Na zlepšenie liečby ochorenia a klinických výsledkov sú preto potrebné nové terapeutické stratégie [3].

Kanonická SMAD-dependentná TGF- β signálna dráha využíva serín-treonínové kinázové receptory (TGF- β RI/II) na fosforyláciu SMAD2/3 cytoplazmatických efektorov. Fosforylovaný dimér SMAD2/3 tvorí heterométny komplex so SMAD4, ktorý sa dokáže translokovať do jadra a indukovať expresiu cieľových génov (Obr. 1) [4].

TGF- β signálna dráha hrá duálnu úlohu počas iniciácie a progresie rakoviny. Zatiaľ čo v premalígných bunkách pôsobí ako supresor (zastavenie bunkového delenia vo faze G1), v malígnych bunkách je promotórom (podpora proliferácie, invázie, EMT, tvorby metastáz) [5]. Podľa viacerých autorov sú mutácie génov jednotlivých členov TGF- β dráhy, najmä TGF- β R2 a SMAD4, najčastejšími mutáciami v CRC a sú zodpovedné za malígne vlastnosti buniek [4-8]. Cieľom tejto práce bolo získať proteínový profil CRC pacientov so zameraním na TGF- β receptor typu II (TGF- β R2), jednu z izoform ligandu TGF- β (TGF- β 1) a pomocného SMAD (SMAD4), ktoré by mohli byť využité ako prognostické markery CRC.



Obrázok 1. Kanonická SMAD-dependentná TGF-β signálna dráha

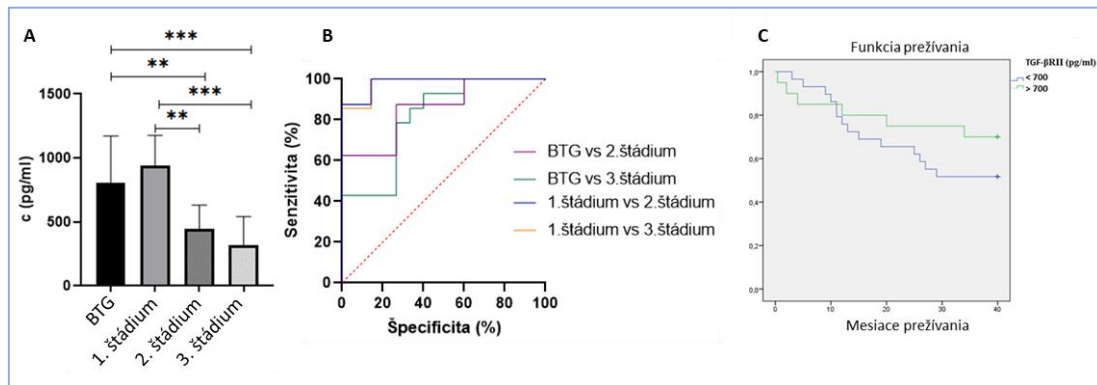
Materiál a metódy

V predkladanej štúdií boli analyzované tkanivé homogénaty a vzorky krvného séra od 103 pacientov operovaných kvôli nálezom v hrubom čreve a/alebo konečníku. Na základe histopatologických vyšetrení a TNM klasifikácie boli pacienti rozdelení do skupiny s benígnym nálezom (BTG; 28%; pacienti s divertikulitídou, hemoroidmi a adenómami) a skupiny s malígnym nálezom (MTG; 72%; pacienti s adenokarcinómom): 1. štádium (28,4%), 2. štádium (39,2%), 3. štádium (32,4%). Protokol štúdie schválila etická komisia 2020/EC/06042 a výskum sa uskutočnil v súlade s Helsinskou deklaráciou.

Na analýzu vybraných členov TGF-β dráhy boli použité komerčne dostupné ELISA kity (Human TGF beta R2: ab193715; Human TGF beta 1: ab100647; Human SMAD4: ab253211) a ELc808 Microplate Reader (Biotek, USA).

Výsledky

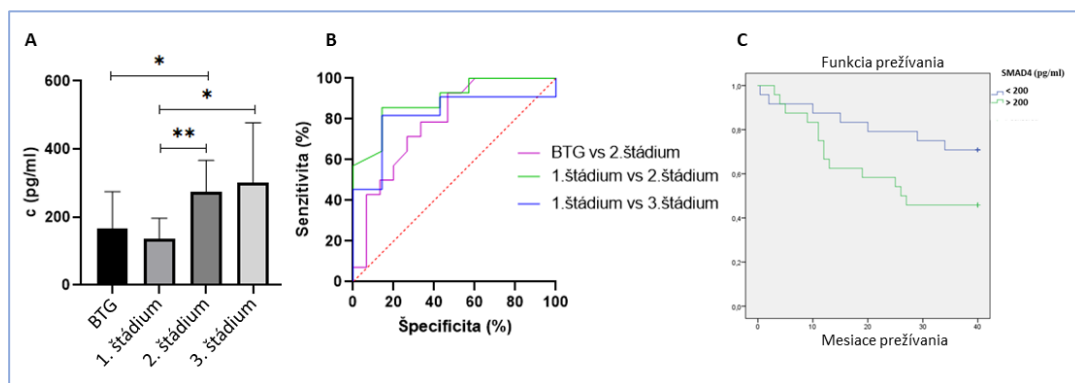
Analýza tkanivovej expresie TGF-βRII u CRC pacientov ukázala že najvyššie hodnoty mali pacienti v 1. štádiu (938,01 pg/ml; SD 216) a najnižšie pacienti v 3. štádiu CRC (405,59 pg/ml; SD 193; p=0,0005; Obr. 2A). Na základe ROC kriviek bolo dokázané, že najspoľahlivejšie bolo porovnanie 1. a 2. štádia (AUC 97.96%; 95% CI 0.9282 - 1.000; p=0.0005; Obr. 2B).



Obrázok 2. Tkanivové expresie TGF-βRII (A), ROC krivka (B), Kaplan-Meierov test prežívania (C)

Kaplan-Meier test ukázal, že pacienti s TGF-βRII < 700 pg/ml mali nižšiu dobu prežívania (28.1 mesiacov; 95% CI 0.231 – 0.330) v porovnaní s pacientami s vyššou expresiou (31.6 mesiacov; 95% CI 0.253 – 0.379; $p > 0.05$; Obr. 2C). Použitím vzoriek krvného séra boli pozorované veľmi podobné trendy v zmenách TGF-βRII expresie, avšak medzi skupinami pacientov neboli pozorované štatisticky významné rozdiely. Analýza tkanivových, ani sérových expresií TGF-β1 neprinesla žiadne podstatné rozdiely medzi BTG a MTG, jednotlivými CRC štádiami, ani rozdiely v prežívaní pacientov.

V prípade SMAD4 bolo pozorovaná korelácia expresie so stúpajúcim CRC štádiom (137,2 pg/ml; SD 56 v 1. štádiu a 310,3 pg/ml; SD 166 v 3. štádiu; $p = 0,0289$; Obr. 3A). Rovnako ako pri TGF-βRII, najspôľahlivejšie výsledky boli dosiahnuté porovnaním pacientov v 1. a 2. štádiu CRC (AUC 89.29%; 95% CI 0.7531 - 1.000; $p = 0.0041$; Obr. 3B). Pacienti s expresiou SMAD4 < 200 pg/ml mali vyššiu dobu prežívania (31 mesiacov; 95% CI 0.25974-0.35984) v porovnaní s pacientami s nižšou SMAD4 expresiou (26.3 mesiacov; 95% CI 0.19787-0.32845; $p > 0.05$; Obr. 3C). Použitím krvného séra bola potvrdená najvyššia SMAD4 expresia u pacientov v 3. štádiu CRC, avšak bez štatisticky významných rozdielov medzi skupinami.



Obrázok 3. Tkanivové expresie SMAD4 (A), ROC krivka (B), Kaplan-Meierov test prežívania (C)

Diskusia so závermi

Problematike kolorektálneho karcinómu na Slovensku je potrebné venovať patričnú pozornosť, nakoľko dlhodobo patríme medzi krajiny s najvyššou incidenciou a mortalitou na toto ochorenie [2]. Pri CRC je však v prípade skorej diagnostiky a vhodne stanovenej liečebnej stratégie šanca na vyliečenie pacienta vysoká. Dôležitým krokom vedúcim k nastaveniu vhodnej liečby by bolo objavenie senzitívnych a špecifických prognostických markerov. Táto práca analyzovala proteínové ciele z TGF- β signálnej dráhy, u ktorej sa už dlhšie predpokladá, že by sa mohla využiť nielen v súvislosti s prognostikou, ale aj samotnou liečbou [4].

Proteínovou analýzou tkanivových homogenátov CRC pacientov sme zistili, že so stúpajúcim klinickým štádiom sa expresie TGF- β RII signifikantne znižovali, expresie TGF- β 1 sa takmer nemenili a expresie SMAD4 sa u pacientov signifikantne zvyšovali. V prípade TGF- β RII a SMAD4 sme pomocou ROC kriviek dokázali veľmi spoľahlivo odlíšiť pacientov v jednotlivých štádiách, pričom najspoľahlivejšie výsledky sme dosiahli porovnaním pacientov v 1. a 2. štádiu. Navyše, na základe Kaplan-Meierových testov sme zistili, že pacienti s nízkou expresiou TGF- β RII a vysokou expresiou SMAD4 mali nižšiu dobu prežitia, aj keď v tejto oblasti ešte chýba zavedenie cut-off hodnoty. Tieto zistenia naznačujú sľubné využitie TGF- β RII a SMAD4 ako prognostických markerov v klinickej praxi. Práca zároveň vyzdvihuje dôležitosť proteínovej analýzy patientskych vzoriek, nakoľko v prípade SMAD4 nebol potvrdený klesajúci trend získaný z genetických analýz [6,7]. Zároveň je veľmi sľubné, že expresie týchto členov TGF- β /SMAD dráhy majú veľmi podobný trend aj pri použití krvného séra. V budúcnosti by sme tak po optimalizácii spracovania krvného séra a rozšírenia súboru pacientov mohli byť schopní prognostického hodnotenia aj z tohto biologického materiálu, čím by sme boli o ďalší krok bližšie k implementácii TGF- β RII a SMAD4 do praxe.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0435/23.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Pham PT, Pekarcikova J, Edelstein R, Majdan M. Joinpoint analysis of colorectal cancer trend in the Slovakia. *Bratisl Lek Listy* 2023; 124: 833-841. https://doi.org/10.4149/BLL_2023_128
- [3] Naeimi R, Najafi R, Molaei P, Amini R, Pecic S. Nanoparticles: The future of effective diagnosis and treatment of colorectal cancer? *E J Pharm* 2022; 936: 175350. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175350>
- [4] Maslankova J, Vecurkovska I, Rabajdova M, Katuchova J, Kicka M et al. Regulation of transforming growth factor- β signaling as a therapeutic approach to treating

- colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2022; 28: 4744-4761. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i33.4744>
- [5] Zhao H, Wei J, Sun J. Roles of TGF- β signaling pathway in tumor microenvironment and cancer therapy. *Int Immunopharmacol* 2020; 89: 107101. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107101>
- [6] Waldner MJ, Neurath MF. TGF β and the Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer. *Cells* 2023; 12: 1139. <https://doi.org/10.3390/cells12081139>
- [7] Principe DR, DeCant B, Staudacher J, Vitello D, Mangan RJ et al. Loss of TGF β signaling promotes colon cancer progression and tumor-associated inflammation. *Oncotarget* 2017; 8: 3826-3839. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9830>
- [8] Ding N, Luo H, Zhang T, Peng T, Yao Y et al. Correlation between SMADs and Colorectal Cancer Expression, Prognosis, and Immune Infiltrates. *Int J Anal Chem* 2023; 2023: 8414040. <https://doi.org/10.1155/2023/8414040>

SÚ NANOČASTICE VHODNÝM RIEŠENÍM PRE APLIKÁCIU HYDROFÓBNÝCH FOTOLENZIBILIZÁTOROV VO FOTODYNAMICKEJ TERAPII?



Martin Majerník¹, Lucia Hudáková¹, Iryna Antal²,
Martina Kubovčíková², Iryna Khmara², Vlasta
Závišová², Martina Koneracká², Rastislav
Jendželovský¹, Peter Fedoročko¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká
fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Košice, Slovensko

²Ústav experimentálnej fyziky SAV, v.v.i., Košice, Slovensko

Úvod

Podstata potreby výskumu nanočastíc (NPs) vo fotodynamickej terapii (PDT) pramení z toho, že väčšina fotosenzibilizátorov (PSs) je hydrofóbná, v dôsledku čoho dochádza k agregácii ich molekúl a strate fototoxických vlastností. Ďalšou dôležitou oblasťou je interakcia molekúl PS s efluxnými pumpami, čo môže mať za následok nedostatočnú akumuláciu PS v nádorových bunkách. Tieto, ale aj ďalšie dôvody kladú požiadavku na vývoj takých NPs, ktoré by dokázali spoľahlivo doručiť PS v monomérskej forme do cieľovej oblasti, a zároveň v čo najväčšej miere redukovať jeho interakciu s proteínmi zabezpečujúcimi eflux xenobiotík. Pre potreby našich experimentov sme využili biodegradovateľné polymérne NPs vytvorené na báze kyseliny mliečnej (PLA) [1]. PLA je alifatický polymér, ktorý sa pripravuje z netoxických obnoviteľných surovín. Z dôvodu biokompatibility, biodegradovateľnosti a nízkej toxicity má PLA a z nej vyrábané produkty využitie v oblasti medicíny, pričom existuje predpoklad aplikácie tohto materiálu práve v oblasti transportu liečiv. NPs pripravené na báze PLA (PLA-NPs) môžu spolu s PSs vytvárať nanosféry alebo nanokapsuly, pričom PS môže byť lokalizovaný na povrchu, alebo vo vnútornom priestore NP [2]. Počiatočné výsledky našich experimentov realizované s I. generáciou PLA-NPs ukázali, že voda použitá pri príprave NPs významne limituje fluorescenčné a fototoxické vlastnosti NPs s naviazaným HY. Z tohto dôvodu sme pristúpili k modifikácii protokolu syntézy PLA-NPs a pripravili sme II. generáciu NPs, ktorej vodnú fázu sme obohatili o hydrotropnú zložku, kromolyn (Krom).

Materiál a metódy

Reagencie. Hypericín (4,5,7,4',5',7'-hexahydroxy-2,2'-dimetylnaftodiantrón, CAS No.: 548-0409; HPLC grade, AppliChem GmbH, Darmstadt, Nemecko): Zásobný roztok hypericínu (HY) bol pripravený rozpustením v DMSO (dimetyl sulfoxid) na koncentráciu 2 mM. Zásobný roztok (uskladnený dlhodobo pri teplote -80°C v tme) bol upravený na požadovanú koncentráciu bezprostredne pred jeho aplikáciou k vybraným experimentálnym skupinám. Výsledná koncentrácia DMSO v pripravených vzorkách



Autorské práva © 2024 Autori

nepresiahla hranicu 0,1 %. Za kontrolu boli považované tie bunky, ku ktorým bolo aplikované iba médium obohatené o sérum. Aplikácia HY k bunkám, ich kultivácia s HY ako aj ich ďalšie spracovanie bolo realizované v prostredí s výrazne obmedzenými svetelnými podmienkami (okrem času určeného na samotnú aktiváciu HY, ak to bolo súčasťou experimentálnej schémy).

Kromolyn (Kromoglykát disodný, CAS no. 15826-37-6, $\geq 95\%$ čistota, Sigma Aldrich, USA) bol pripravený rozpustením v destilovanej vode na koncentráciu 128,6 mM a bol uskladnený pri 4 °C v tme.

Bunkové línie a kultivačné podmienky. Experimenty boli uskutočnené s využitím nádorovej bunkovej línie ľudského kolorektálneho adenokarcinómu HT-29 a ľudskej nenádorovej bunkovej línie fibroblastov hrubého čreva CCD-18Co (ATCC, Rockville, MD, USA). Bunková línia HT-29 bola kultivovaná v kompletnom médiu RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a bunková línia CCD-18Co v médiu MEM (Biosera, Nuaille, Francúzsko), pri teplote 37°C, vlhkosti 95% a 5 % CO₂ atmosfére. Obe médiá boli doplnené o 10 % fetálne bovinné sérum (FBS, Biosera, Francúzsko) a antibiotiká (Penicilín 100 U/ml, streptomycín 100 µg/ml a amfotericín 25 µg/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Metabolická aktivita buniek (MTT test). MTT (3-(4,5-dimetyltiazolyl)-2,5-difnyltetrazolium bromid; 0,5 µg/ml), ktorý živé bunky metabolizujú na kryštalický formazán sfarbený do fialova, bol k bunkám pridaný v časových intervaloch 24 a 48 hod. po PDT. Po štvorhodinovej inkubácii bol na zastavenie metabolizácie MTT a zároveň rozpustenie vzniknutých kryštálov formazánu pridaný 10 % roztok dodecylsulfátu sodného (SDS). Absorbancia rozpusteného formazánu bola zmeraná nasledujúci deň spektrofluoroluminometrom FluoStar Optima (BMG Labtech GmbH Offenburg, Nemecko) pri vlnovej dĺžke 585 nm.

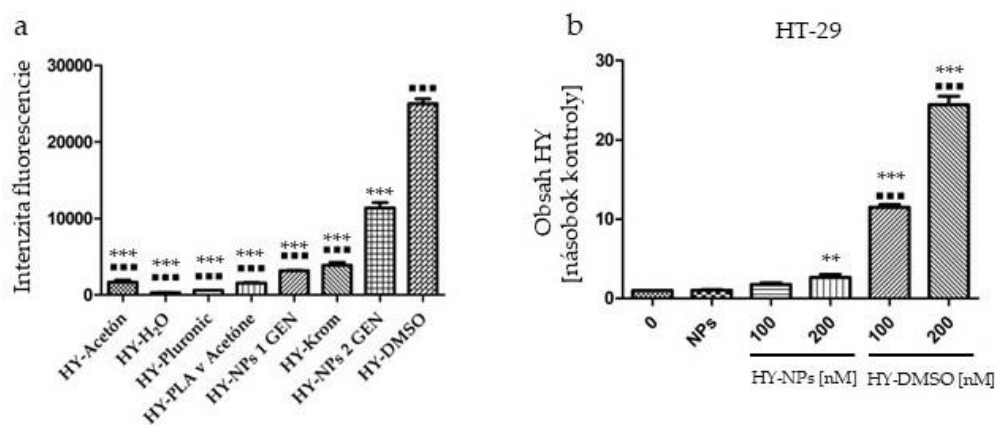
Analýza fluorescence HY. Intenzita fluorescence HY bola analyzovaná okamžite po príprave experimentálnych vzoriek spektrofluoroluminometrom FluoStar Optima (BMG Labtech GmbH Offenburg, Nemecko) pri excitačnej vlnovej dĺžke 544 nm a emisii 590 nm.

Vnútro bunkový obsah HY. Analýza vnútro bunkového obsahu HY bola uskutočnená 16 hod. po jeho aplikácii k bunkám. Po trypsinizácii boli bunky premyté v PBS a resuspendované v Hankovom tlmivom roztoku (HBSS, Sigma-Aldrich. ST. Louis, Missouri, USA). Pred meraním boli bunkové suspenzie uchovávané na ľade kvôli minimalizácii efluxu HY z buniek. Miera fluorescence HY v bunkách bola stanovená pomocou prietokového cytometra BD FACSAria II SORP (BD Biosciences), s využitím modrého lasera (488 nm) a emisii HY bola vyhodnotená v kanáli PE-Texas Red (DM600 LP-610/20). Pri analyzovaní bol vylúčený bunkový debris a zlepené bunky. Pre každú vzorku z oboch bunkových línií bolo analyzovaných 1×10^4 buniek. Na stanovenie intenzity fluorescence HY v bunkách bol využitý program FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA). Intracelulárny obsah bol vyjadrený ako pomer relatívnej fluorescence buniek ovplyvnených HY k relatívnej autofluorescencii neovplyvnených kontrolných buniek.

Štatistická analýza. Miera štatistickej významnosti bola vyrátaná prostredníctvom analýzy variancie (ANOVA) doplnenej Tukey post-testom. Hladina štatistickej významnosti bola zvolená nasledovne: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

Výsledky a diskusia

Počiatkové analýzy prvej generácie NPs ukázali, že ich zloženie značne limituje fluorescenčné a fototoxické vlastnosti naviazaného HY. Tieto závery je možné podprieť o výsledky analýzy metabolickej aktivity, ktoré ukázali, že v experimentálnej skupine nádorových buniek HT-29 ovplyvnených fotoaktivovaným HY naviazaným na NPs nedošlo k poklesu metabolickej aktivity ani pri aplikácii najvyššej koncentrácie HY (250 nM). Naopak v nádorových bunkách ovplyvnených HY rozpusteným v DMSO bol pozorovaný štatisticky významný pokles v porovnaní s kontrolnou skupinou buniek už v experimentálnej skupine ovplyvnenej 100 nM HY. Tieto pozorovania korelovali so zisteniami analýzy fluorescencie HY a analýzy akumulácie HY v nádorových bunkách HT-29 (Obr. 1), na základe ktorých predpokladáme, že majoritná časť HY nebola vo fototoxicky aktívnej monomérskej forme ale vytvárala terapeuticky neúčinné agregáty [3].

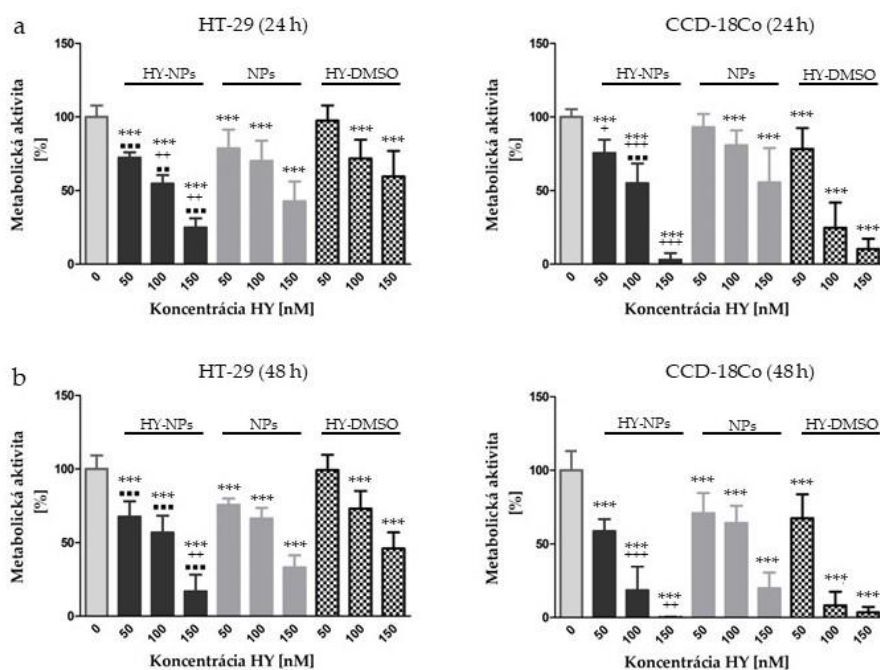


Obrázok 1. Analýza fluorescencie HY v NPs a ich jednotlivých zložkách (a) a analýza akumulácie HY v bunkách HT-29 s využitím prvej generácie NPs a DMSO.

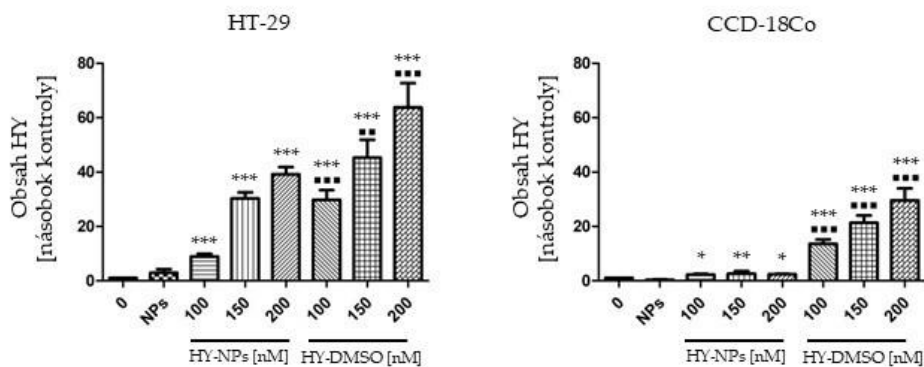
*Experimentálne skupiny boli porovnané s kontrolnou skupinou [obr. a, b] ■ Experimentálne skupiny boli porovnané s experimentálnou skupinou HY-NPs 2 GEN [obr. a]. ▣ Experimentálne skupiny HY-NPs a HY-DMSO boli porovnané medzi sebou [obr. b].

Príprava NPs nie je možná bez použitia vody, ktorá tvorí jednu z ich hlavných zložiek a tak je nutné predpokladať, že práve voda predstavuje kľúčový faktor zodpovedný za nižší fluorescenčný výťažok NPs a s tým asociovaný znížený fotocytotoxický efekt. Na základe výsledkov analýz realizovaných na tejto prvej generácii NPs sme sa rozhodli modifikovať laboratórny protokol ich prípravy tak, že vodnú fázu sme obohatili o hydrotropnú zložku Krom. Krom vyniká svojou výbornou rozpustnosťou vo vode, pričom jeho hydrotropné charakteristiky 100-1000 násobne prevyšujú vlastnosti iných známych hydrotrópov [4]. Výsledky najnovších štúdií ukazujú, že Krom má v PDT potenciál substituovať využitie DMSO v pozícii rozpúšťadla HY, čo možno podložiť skutočnosťou, že Krom v porovnaní s DMSO

zvyšuje cytotoxicitu fotoaktivovaného HY [5]. Tak ako sme uviedli, bázou pre prípravu druhej generácie NPs bola prvá generácia, pričom podstatný rozdiel druhej generácie oproti prvej generácii je prítomnosť Krom v jej vodnej zložke. Už prvotné analýzy zamerané na intenzitu fluorescence HY ukázali, že Krom signifikantne zvýšil fluorescenciu HY, čo s najväčšou pravdepodobnosťou súvisí s redukciami tvorby nefotoaktívnych agregátov HY a jeho monomerizáciou. Druhá generácia NPs s HY (HY-NPs 2 GEN) vykazovala v porovnaní s prvou generáciou NPs s HY (HY-NPs 1 GEN) signifikantný nárast fluorescence HY, čo možno hodnotiť veľmi pozitívne (Obr. 1). Napriek tomuto nárastu fluorescence bola naďalej najvyššia miera intenzity fluorescence pozorovaná vo vzorke, kde bolo ako rozpúšťadlo HY použité DMSO (HY-DMSO). Zvýšená fluorescencia druhej generácie NPs pozitívne korelovala s výsledkami vplyvu HY-NPs na metabolickú aktivitu nádorových, ale aj nenádorových buniek (Obr. 2). Špecificky pri bunkách HT-29 sme pozorovali signifikantný pokles metabolickej aktivity už v experimentálnej skupine ovplyvnenej najnižšou analyzovanou koncentráciou fotoaktivovaného HY (50 nM), pričom pokles metabolickej aktivity bol aj v porovnaní s experimentálnymi skupinami HY-DMSO. Z hľadiska účinku na nenádorové bunky bol účinok HY-NPs analogický s účinkom HY-DMSO. Tento výsledok je zaujímavý najmä v kontexte analýzy zameranej na akumuláciu HY, pri ktorej sme síce pozorovali signifikantný nárast akumulácie v týchto bunkách avšak v porovnaní s experimentálnymi skupinami ovplyvnenými HY-DMSO bola hladina akumulácie násobne nižšia (Obr. 3).



Obrázok 2. Analýza metabolickej aktivity buniek HT-29 a CCD-18Co po aplikácii HY-PDT s využitím druhej generácie NPs a HY-DMSO. *Experimentálne skupiny boli porovnané s kontrolnou skupinou ■Experimentálne skupiny HY-NPs a HY-DMSO boli porovnané medzi sebou. + Experimentálne skupiny HY-NPs a NPs boli porovnané medzi sebou.



Obrázok 3. Analýza intracelulárnej akumulácie HY v bunkách HT-29 a CCD-18Co s využitím druhej generácie NPs a HY-DMSO. *Experimentálne skupiny boli porovnané s kontrolnou skupinou ■Experimentálne skupiny HY-NPs a HY-DMSO boli porovnané medzi sebou.

Je dôležité upozorniť aj na to, že samotné NPs bez HY aplikované v ekvivalentnej denzite k NPs obohateným o HY indukovali pokles metabolickej aktivity v oboch bunkových líniiach, čo môže poukazovať na ich potenciálny cytotoxický efekt. Pozitívne možno hodnotiť aj výsledky získané z analýz zameraných na akumuláciu HY a to najmä s ohľadom na akumuláciu v experimentálnych bunkách HT-29, kde možno sledovať významný nárast akumulácie HY v porovnaní s kontrolnou skupinou. Aj napriek skutočnosti, že najvyššia akumulácia bola pozorovaná v experimentálnej skupine ovplyvnenej HY-DMSO výsledky akumulačných analýz považujeme za veľmi významné a to najmä preto, že využitie NPs má potenciál vďaka novej eliminácii vplyvu ABC transportných proteínov na samotné PSs, z dôvodu že samotné NPs obmedzujú interakciu PSs s proteínmi zabezpečujúcimi eflux xenobiótik [6].

Pod'akovanie

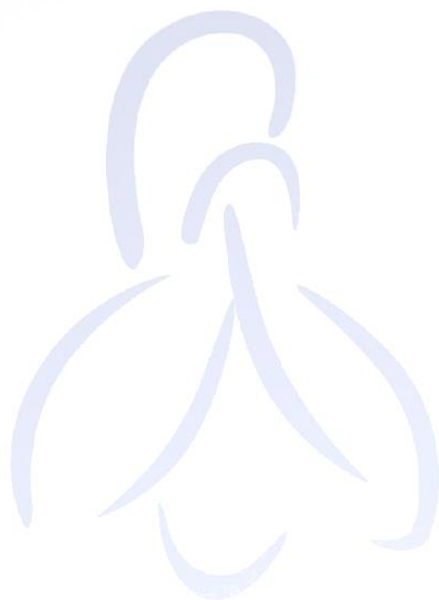
Táto práca vznikla za podpory projektov: VEGA 2/0049/23; OPENMED, ITMS2014+: 313011V455; APVV DS-FR-22-0037; VVGS-2023-2708; ITMS2014+: 313011AUW7 "NANOVIR" and 313011AVG3 "BIOVID".

Zoznam použitej literatúry

- [1] Singhvi MS, Zinjarde SS, Gokhale DV. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol* 2019; 127: 1612-1626. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>
- [2] Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. *Int J Pharm* 2006; 326: 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.012>

- [3] Bánó G, Staničová J, Jancura D, Marek J, Bánó M et al. On the diffusion of hypericin in dimethylsulfoxide/water mixtures - the effect of aggregation. *J Phys Chem B* 2011; 115: 2417-2423. <https://doi.org/10.1021/jp109661c>
- [4] Dhapte V, Mehta P. Advances in hydrotropic solutions: An updated review. *St Petersburg Polytech Univ J Phys Math* 2015; 1: 424-435. <https://doi.org/10.1016/j.spjpm.2015.12.006>
- [5] Suváková M, Majerník M, Jendželovský R, Hovan A, Bánó G et al.. In vitro study of disodium cromoglicate as a novel effective hydrotrope solvent for hypericin utilisation in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2020; 206: 111855. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111855>
- [6] Majerník M, Jendželovský R, Vargová J, Jendželovská Z, Fedoročko P. Multifunctional Nanoplatfoms as a Novel Effective Approach in Photodynamic Therapy and Chemotherapy, to Overcome Multidrug Resistance in Cancer. *Pharmaceutics* 2022; 14: 1075. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051075>

ABSTRAKTY
SÚŤAŽNÝCH PRÁC



ÚLOHA ČREVNÉHO MIKROBIÓMU V ÚČINNOSTI PROTINÁDOROVEJ TERAPIE A TOXICITE ASOCIOVANEJ S LIEČBOU

Jozef Masarovič¹, Soňa Čierniková²

¹Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice, ²Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

Náš každodenný životný štýl, výber potravy, ktorú prijímame a tiež užívanie antibiotickej a inej liečby, hrajú dôležitú úlohu pri formovaní črevného mikrobiómu. Tento jedinečný komplexný ekosystém, ktorý tvorí súbor všetkých mikroorganizmov osídľujúcich gastrointestinálny trakt spolu s ich génmi a metabolickým potenciálom, je rozhodujúci pre náš imunitný systém aj pre naše celkové zdravie. Rozvoj sekvenčných metód a bioinformatických analýz umožnil vznik vednej oblasti nazývanej metagenomika, ktorá umožňuje výskum mikrobiálnych spoločenstiev in situ. Mikrobiómové prístupy sú založené najmä na sekvenovaní génu pre 16S ribozomálnu RNA, ktorý slúži ako fylogenetický a taxonomický marker pre identifikáciu členov mikrobiálnej komunity. Výskumy z posledných rokov odhalili množstvo prepojení medzi črevným mikrobiómom a orgánmi gastrointestinálneho traktu, ale aj distálnymi orgánmi, ako sú napr. mozog, srdce, pľúca, urogenitálna sústava a iné.

Črevný mikrobióm plní ochranu pred patogénnymi mikroorganizmami, napomáha udržiavať kompaktnosť intestinálnej bariéry a jeho dôležitou funkciou je fermentácia nestráviteľných zvyškov potravy a tvorba mastných kyselín s krátkym reťazcom, ako sú butyrát, acetát a propionát. Intestinálna dysbióza, pri ktorej dochádza k abnormalitám v druhoch a počte mikroorganizmov prítomných v prirodzenej mikrobiote hostiteľa, je asociovaná s metabolickými, neurologickými, kardiologickými, respiračnými a inými ochoreniami, nevynímajúc nádorové ochorenia. Výsledky predklinických a klinických štúdií potvrdili úlohu špecifických bakteriálnych a vírusových mikroorganizmov v onkogenéze viacerých druhov malignít. Neustále však pribúdajú poznatky o tom, že črevná mikrobiota môže ovplyvňovať účinnosť protinádorovej terapie, najmä chemoterapie a imunoterapie pomocou inhibítorov imunitných kontrolných bodov (ICIs). Súčasné chemoterapeutické režimy nerozlišujú medzi nádorovými a fyziologickými bunkami, ako sú bunky vystielajúce epitel gastrointestinálneho traktu. U 40 % pacientov, ktorí dostávajú štandardnú dávku chemoterapie, sa vyskytuje gastrointestinálna toxicita. Akútne prejavy sa zvyčajne prejavujú nevoľnosťou, zápchou, vracaním, hnačkou, bolesťami brucha a úbytkom hmotnosti. Nepostačujúca špecifita chemoterapie má tiež za následok vyvolanie neskorej toxicity protinádorovej liečby, ktorá je spojená s výpadkami pamäte, problémami so sústredením, mikrobiálnou disharmóniou, či neurologickými, pneumologickými a kardiovaskulárnymi komplikáciami. Jednou z možností modifikácie zloženia črevnej mikrobioty a obnovy mikrobiálnej rovnováhy je podávanie probiotík, prebiotík či synbiotík. V súčasnosti sa



ako perspektívny trend pre zvýšenie odpovede na protinádorovú terapiu javí fekálna transplantácia mikrobioty (FMT), ktorá kvantitatívne aj kvalitatívne prevyšuje probiotickú suplementáciu. Jedná sa o prenos spracovanej stolice od darcov, po ktorom dochádza k obnoveniu zdravej črevnej mikrobioty u príjemcov. Pokračujúci výskum môže objasniť možnosti využitia modifikácií črevnej mikrobioty v klinickej praxi.

Pod'akovanie: Práca vznikla s podporou agentúry VEGA, č. projektov 2/0069/22 a 1/0071/24.

SALVIA OFFICINALIS L. V CHEMOPREVENCII EXPERIMENTÁLNEHO KARCINÓMU PRSNÍKA SAMÍC POTKANOV

Adrián Beľa, Alena Mazuráková, Lenka Lacková, Marek Samec, Karol Kajo¹, Dana Dvorská, Dušan Braný, Vladimíra Sadloňová, Marián Adamkov, Peter Kubatka

Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

¹*Ústav patológie, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava*

Na základe početných dát z onkologického výskumu sa používanie fytochemikálií alebo nutraceutík na rastlinnej báze považuje za inovatívny nástroj manažmentu nádorových ochorení. Náš výskum bol zameraný na analýzu onkostatických vlastností *Salvia officinalis* L. použitím chemopreventívneho modelu karcinómu prsníka samíc potkanov. Účinky *S. officinalis* podávanej v diéte v dvoch koncentráciách (0,1 % a 1 %) boli hodnotené v modeli chemicky indukovanej karcinogenézy. *S. officinalis* vo vyššej dávke významne predĺžila latenciu nádorov o 8,5 dňa a významne zlepšila pomer slabo/dobre diferencovaných karcinómov v porovnaní s kontrolami v oboch dávkach. Analýzy mechanizmov protirakovinových aktivít *S. officinalis* zahŕňali dobre validované prognostické, prediktívne a diagnostické biomarkery, ktoré sa aplikujú v onkologickej praxi aj v predklinickom výskume. V tomto ohľade sme zistili zvýšenú expresiu kaspázy-3, zvýšený pomer Bax/Bcl-2 a zníženie expresie MDA, ALDH1 a EpCam. Okrem toho šalvia znížila hladiny TGF- β v sére u potkanov (zníženie hladín IL-6 a TNF- β bolo s hranične nesignifikantým rozdielom). Vyhodnotenie epigenetických modifikácií vo vzorkách rakoviny potkanov odhalilo pokles metylácií lyzínu v H3K4m3 a zvýšenie acetylácie lyzínu (H4K16ac) v liečených skupinách. Šalvia zmenila relatívne hladiny miR21 a miR145 (miR210, miR22, miR34a a miR155 sa významne nezmenili). Metylácia promótorov tumor-supresorových génov *ATM* a *PTEN* sa po liečbe *S. officinalis* znížila (promótory *PITX2*, *RASSF1* a *TIMP3* neboli zmenené). Naša štúdia demonštruje významné chemopreventívne účinky *S. officinalis* v modeli experimentálneho karcinómu prsníka *in vivo*, ktoré boli dokumentované proapoptotickými, antioxidantnými, protizápalovými a epigenetickými účinkami reguláciami parametrov nádorových kmeňových buniek.

Pod'akovanie: Štúdia bola podporená projektom VEGA 1/0045/23.



METHYLATION ARRAY IN THE DIAGNOSIS OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM TUMORS

Matus Durdik^{1,2}, Veronika Krajcovicova¹, Andrej Hrasko^{1,2}, Ester Bublakova³, Boris Rychly⁴, Dominika Kochanova², Stanislava Hederova³, Katarina Skalicka¹, Alexandra Kolenova³

¹Laboratory of Molecular Genetics, Children Hospital, National Institute for Children Disease, Faculty of Medicine, Comenius University

²Department of Radiobiology, Cancer Research Institute, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences,

³Department of Pediatric Oncology and Hematology, National Institute for Children Disease, Faculty of Medicine, Comenius University

⁴Diagnostic Center of Pathology, Unilabs Ltd.

Tumors of CNS are the 2nd most frequent type of pediatric tumors and harbor the risk for dismal outcome and relapse. Successful treatment with chemotherapy and radiotherapy is aggressive and may cause life-long side effects. DNA expression is controlled not only by DNA sequence, but also by epigenetic modifications, which include DNA methylation that mainly occurs in regions of the genome called CpG islands. DNA methylation is able to regulate gene expression depending on promotor methylation state. This process is very often deregulated in tumor cells. In the last decade, a microarray-based technique was introduced to analyze the individual methylation profile. Using this method, an online classifier (www.moleculareuropathology.com) was created in the clinical center in Heidelberg, which, together with histopathological and molecular-genetic analysis, can serve as a tool for precise risk assessment and diagnosis. In addition to evaluating the methylation profile, this classifier can also analyze the profile of the copy number variations (amplifications, deletions) of chromosomal regions and entire chromosomes. The general consensus, even considering WHO recommendations, is to investigate methylation in all childhood and diagnostically challenging adult CNS tumors.

As a first group in Slovakia we have introduced this technique of DNA methylation profiling of CNS tumors. So far, we have analyzed 52 patients with tumors of CNS. Our group consisted of 27 pediatric and 25 adult samples and we observed the difference between the histopathological and methylation diagnosis, that lead to the complete change of diagnosis in 4 pediatric and 2 adult patients. Methylation profiling was also beneficial in molecular refinement of diagnosis of 8 pediatric patients (mostly medulloblastomas and ependymomas) and classification of adult glioblastoma into different subgroups. In 7 patients methylation analysis was not successful, mainly due to low amount of DNA obtained from FFPE tissue. In the rest of patients, we confirmed the diagnosis set up by pathologist.



We conclude that we have successfully adopted technique for DNA methylaton-based profiling of CNS tumors. In future we plan to introduce this technique into Slovak clinical diagnostic guidelines as it is widely used abroad and could help, together with histopathological and molecular-genetic testing, in precise diagnosis of CNS tumors for both pediatric and adult patients.

Acknowledgment: This study was supported by Združenie na pomoc detskej onkológii o.z. a Deťom s rakovinou o.z.

MALÉ EXTRACELULÁRNE VEZIKULY ODVODENÉ ZO ZUBNÝCH MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK NAPLNENÉ GEMCITABÍNOM INHIBUJÚ RAST ĽUDSKÝCH PANKREATICKÝCH NÁDOROVÝCH BUNIEK *IN VITRO*

Daniela Klimová¹, Čestmír Altaner², Vanda Repiská¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a FNsP Bratislava

²Oddelenie prípravy kmeňových buniek, Onkologický Ústav sv. Alžbety, Bratislava

Extracelulárne vezikuly (EV) sú v súčasnosti cieľom záujmu v terapii nádorových ochorení ako úspešný nástroj na dodávanie liečiv. Vďaka ich mnohým prospešným biokompatibilným vlastnostiam sú využívané na transport nukleových kyselín, proteínov, signálnych molekúl, nanomateriálov či chemoterapeutík. Extracelulárne vezikuly odvodené z mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek (MSC) si zo svojich parentálnych buniek zachovávajú schopnosť migrácie k poškodenému tkanivu, kde patrí aj nádorové ložisko. To nás inšpirovalo k tomu, aby sme skonštruovali systém použitia EV z MSC tak, aby v sebe niesli chemoterapeutické liečivo gemcitabín (GCB) a doručili ho ako Trójsky kôň priamo do nádorových buniek. V našej štúdií sa MSC ľudskej zubnej drene (DP-MSC) kultivovali s gemcitabínom, čo viedlo k jeho absorpcii bunkami a následnej sekrécii liečiva v EV do kondicionovaného média. Koncentrované kondicionované médiá obsahujúce malé EV (potenciálne exozómy) významne inhibovali rast ľudských pankreatických nádorových bunkových línií *in vitro*. DP-MSC boli súčasne skonštruované tak, aby exprimovali samovražedný gén-kvasinkovú cytozín-deaminázu: uracilfosforibozyltransferázu (yCD::UPRT). Produkt samovražedného génu premieňa netoxické preliečivo 5-fluorcytozín (5-FC) na vysoko cytotoxický chemoterapeutický agens 5-fluoruracil (5-FU) priamo v nádorových bunkách. Konverzia 5-FC na 5-FU mala aditívny účinok na inhibíciu rastu ľudských pankreatických nádorových buniek. Naše výsledky ukázali terapeutický potenciál extracelulárnych vezikul z DP-MSC, ktoré sú navrhnuté na ciele dodávanie chemoterapeutických liečiv spolu so systémom samovražednej génovej terapie.

Pod'akovanie: Úprimné poďakovanie patrí všetkým kolegom Oddelenia Prípravy Kmeňových Buniek na Onkologickom Ústave sv. Alžbety v Bratislave.



ELECTROMAGNETISM AND CANCER CELLS

Marek Bajtoš^{1,2,3}, Ladislav Janoušek¹, Olga Kocikowska^{2,3}, Sebastian Student², Hakki Gurhan⁴, Nhat Dang⁴, Frank Stephenson Barnes⁴

¹*Department of Electromagnetic and Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, University of Zilina, Univerzitna 8215, 010 26, Zilina, Slovakia*

²*Department of Electrical, Computer and Energy Engineering, University of Colorado, Boulder, Boulder 80309, Colorado, USA*

³*Department of Systems Biology and Engineering, Faculty of Automatic Control, Electronics and Computer Science, Silesian University of Technology, Akademicka 16, 44-100, Gliwice, Poland*

⁴*Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Silesian University of Medicine, Katowice, Medykow 18, 40-752, Katowice*

The debate over thermal versus non-thermal health impacts of radar has roots dating back to at least the 1960s. This debate extends to technologies like cell phones, and Wi-Fi, where transitioning from the physics to chemistry to biology to potential health effects presents challenges. The human body, composed of approximately 100 trillion cells, functions as an electrochemical system, with well-studied effects of temperature, diffusion, and mechanical contact, but limited understanding of the impacts of RF and LF magnetic fields. From the theoretical background, radical pairs offer a mechanism for these fields to convert signals into changes in the concentrations of chemical signaling molecules like hydrogen peroxide (H₂O₂), nitric oxide (NO), and calcium. The coupling between magnetic fields and chemically active electrons (protons) results in energy levels corresponding to RF (LF) frequencies or hyperfine transitions. External magnetic fields can alter some of these energy levels through the Zeeman effect. Energy levels for electron and nuclear spin states depend on the magnetic moments of electrons and nuclei, external magnetic fields, and alignment of angular momentum along the net field. Reactive Oxygen Species encompass radicals such as O₂⁻, OH⁻, NO, and the non-radical H₂O₂, generated as part of metabolic processes. They may function as signaling molecules, triggering cascades of events that amplify the signal. At high concentrations, they can cause damage. Growth rate variations with changes in frequency, AC magnitude and cell parameters as Mitochondrial Calcium and Mitochondrial Superoxide when cells are exposed to MF are presented. Usage of these fields might play an important role in the healthcare industry, aerospace engineering, biofilms treatment or defensive military usage. The present study specifically examines how variations in magnetic field characteristics affect HT-1080 Fibrosarcoma, Fibroblast cells, HeLa cervical cancer cells with potential implications for cancer treatment and other diseases where changes in cell growth rates and signaling molecule concentrations are beneficial. The frequencies and magnetic field strengths used in this study fall well below ionizing frequencies and are insufficient to break chemical bonds.

Acknowledgment: This study is supported by all affiliation-mentioned friends and supervisors from all around the world where I have conducted my research stays.



EXPRESIA MITOCHONDRIÁLNYCH KARBOXYLÁZ V NÁDOROVÝCH BUNKOYCH LÍNIACH MOZGU A V ĽUDSKÝCH MOZGOVÝCH NÁDOROV

Eduard Gondáš^{1,2}, Jakub Šofranko¹, Radovan Murín¹

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského Bratislava

²Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského Bratislava

Pozmenený metabolizmus nádorových buniek je charakterizovaný zvýšenou rýchlosťou anaeróbnej glykolýzy spolu so zvýšeným anabolizmom, ktoré sú potrebné pre rýchly rast a delenie nádorových buniek. Nutrične obmedzené prostredie nádorov a strata atómov uhlíka odvodených od glukózy vo forme laktátu si vyžaduje prispôbenie biosyntetických dráh tak, aby využívali aj atómy uhlíka odvodené z alternatívnych substrátov. Z tohto dôvodu sme sa zamerali na úlohu a expresiu mitochondriálnych karboxyláz, a to: pyruvát karboxylázy (PC), propionyl-CoA karboxylázy (PCC) a 3-metyl-krotonyl-CoA karboxylázy (MCC) v glioblastómových, astrocytómových a neuroblastómových ľudských nádorových bunkách mozgu. Nami namerané výsledky preukázali zvýšené vychytávanie aminokyseliny s rozvetveným reťazcom (BCAA) z kultivačného média a ich katabolizmus. Podstatná časť katabolizmu BCAA prebieha v mitochondriách a všetko závisí od expresie PCC a MCC. Zatiaľ čo MCC podporuje bunkový metabolizmus buď molekulami acetoacetátu alebo acetyl-CoA, PCC a PC majú anaplerotickú úlohu tým, že prispievajú k procesu tvorby sukcinyl-CoA pomocou PCC a oxaloacetátu pomocou PC.

Odstránenie BCAA z kultivačných médií ľudských neuroblastómových, glioblastómových alebo astrocytómových buniek bolo kvantifikované metódami LC-MS a 1H-NMR a schopnosť buniek využívať uhlíkový skelet BCAA bola preukázaná zvýšeným izotopovým množstvom citrátu, v dôsledku inkorporácie ¹³C atómov spôsobujúcich katabolizmus leucínu-¹³C6 na acetyl-CoA. Expresia karboxyláz, MCC a PC bola hodnotená imunodetekciami buď na kultivovaných nádorových bunkách mozgu alebo nádorových lyzátoch odvodených z ľudských mozgových nádorov po ich chirurgickom odstránení.

Okrem preukázania významnosti MCC v nádorových bunkách mozgu sme potvrdili dôležitosť PC pre prežitie buniek astrocytómu pridaním inhibítorov PC do kultivačného média a návratom prežitia pri kombinácii inhibítorov PC s metabolitmi Krebsovho cyklu.

Tieto výsledky zdôrazňujú funkčnú dôležitosť mitochondriálnych karboxyláz pri zabezpečovaní mitochondriálneho metabolizmu nádorových buniek so schopnosťou využívať alternatívne substráty na katabolizmus, ako sú napr. BCAA, a navyše podporovať tvorbu medziproduktov Krebsovho cyklu anaplerotickou funkciou. Okrem toho poznatky o expresii nami spomínaných karboxyláz v konkrétnych typoch nádoroch by mohli prispieť k navrhnutiu terapeutických prístupov ovplyvňujúcich charakteristické metabolické zmeny nádorových buniek.

PodĎakovanie: Práca bola podporená grantami APVV-19-0033 a VEGA 1/0042/24.



Autorské práva © 2024 Autori

PROGNOSTICKÝ VÝZNAM EXPRESIE FAKTOROV NUKLEOTIDOVEJ EXCÍZNEJ OPRAVY A TRANSLÉZNEJ SYNTÉZY DNA U PACIENTOV SO SVALOVINU- INFILTRUJÚCIM KARCINÓMOM MOČOVÉHO MECHÚRA

Andrea Holíčková¹, Patrik Palacka^{1,2}, Jan Roška¹, Peter Makovický¹,
Miroslava Vallová³, Csaba Biró³, Eveline Órásová¹, Jana Obertová², Jozef
Mardiak², Vladimíra Bruderová¹, Dana Jurkovičová¹, Karol Kajo³, Miroslav
Chovanec¹

¹Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie,
Oddelenie genetiky, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

²II. Onkologická klinika LF UK a NOÚ, Klenova 1, 833 10 Bratislava, Slovenská republika

³Ústav patológie SZU a OÚSA, s. r. o., Heydukova 10, 812 50 Bratislava, Slovenská republika

Svalovinu-infiltrujúci karcinóm močového mechúra (MIBC) stále predstavuje v mnohých prípadoch smrteľné ochorenie s päťročným celkovým prežívaním (OS) u približne 50 % pacientov a v prípade lokálne pokročilého alebo metastatického ochorenia dokonca len u 10 – 15 % pacientov. Bez ohľadu na štádium ochorenia je chemoterapia na báze cisplatiny (CDDP) štandardnou starostlivosťou v neoadjuvantných aj metastatických podmienkach. Hlavným farmakologickým cieľom CDDP je DNA, a preto poškodenie DNA predstavuje kľúčový faktor určujúci toxicitu tejto látky. Poškodenie DNA vyvolané CDDP, najmä krížne väzby, aktivuje dráhy reakcie na poškodenie DNA zahŕňajúce komplexnú koordináciu niekoľkých mechanizmov opravy DNA, vrátane nukleotidovej excíznej opravy (NER) a transléznejsyntézy DNA (TLS). Najskôr sme na modeli bunkových línií MIBC s rôznym stupňom rezistencie voči CDDP skúmali expresiu niektorých hlavných faktorov NER a TLS. Získané dáta naznačovali určitú mieru asociácie expresie týchto faktorov s rezistenciou voči CDDP. Naším následným cieľom bolo preskúmať prognostickú hodnotu týchto faktorov NER a TLS u pacientov s MIBC. Retrospektívne sme analyzovali expresiu proteínov XPA, XPF, XPG, ERCC1, POLI, POLH a REV3L v primárnych nádoroch močového mechúra 86 pacientov s týmto ochorením. Hladiny proteínov sme analyzovali v celej kohorte pacientov, ako aj v kohorte jedincov s metastatickým ochorením (mUC), pričom všetci pacienti podstúpili prvolíniovú chemoterapiu na báze CDDP. Obe kohorty boli rozdelené podľa percenta pozitivity nádorových buniek na expresiu jednotlivých proteínov do podskupín s vysokou a nízkou expresiou. Úmrtnosť pacientov bola 89,5 % pri mediáne sledovania 120,2 mesiacov. V celkovej kohorte mali pacienti s vyššou expresiou XPA ($p = 0,0354$; HR 0,60), XPG ($p = 0,0472$; HR 0,62) a POLI ($p = 0,0066$; HR 0,53) signifikantne horšie OS ako pacienti s nízkymi hladinami expresie týchto proteínov. XPG a POLI boli nezávislé prognostické faktory v multivariačných analýzach (MVA). V kohorte mUC bola vysoká expresia POLI spojená s významne zhoršeným OS ($p = 0,0472$; HR 0,56) v univariantných analýzach a jej nezávislá prognostická



hodnota sa ukázala v MVA. Naše výsledky naznačujú, že XPG a POLI by mohli pri MIBC slúžiť ako užitočné prognostické biomarkery.

Pod'akovanie: Táto práca bola finančne podporená grantami VEGA 2/0075/23, APVV-17-0384 a APVV-19-0286.

THE EFFECT OF HYPOXIA AND EPIGENETIC MODULATION ON THE MECHANISMS INVOLVED IN CHEMORESISTANCE OF TESTICULAR TUMORS

Danica Ivovič, Jan Roška, Ivana Petrová, Pavlína Kabelíková, Sachin Gulati, Dana Jurkovičová

Cancer Research Institute, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, v.v.i., Dúbravská cesta 9, 84104, Bratislava, Slovak Republic

Testicular germ cell tumors (TGCTs) are frequent malignancies in men. Our research project focuses on investigating the role of hypoxia and related epigenetic modulation in signaling pathways associated with cisplatin (CDDP) resistance, poor prognosis, and early recurrence in TGCT patients. Our hypotheses and experimental strategies are built on preliminary data, where miRNA microarrays identified miR-218 as significantly upregulated in resistant TGCT cell lines, targeting PP2A and PPP2R5A. To validate the involvement of this regulatory axis in CDDP resistance, we inhibited miR-218 and utilized hypoxia cultivation to analyze resulting expression changes.

Comparing the basal expression of key components, we confirmed that miR-218-5p expression is significantly higher in all resistant TGCT cell lines, attributed to increased expression of its host genes SLIT2/3. Notably, resistant TGCT lines exhibited elevated expression of the HIF1 α and HIF2 α transcription factor even in normoxic conditions. The expected negative correlation between miR-218-5p and the expression of PP2A and PPP2R5A was observed. Inhibition of miR-218-5p led to increased expression of both phosphatases, especially in resistant TGCT cell lines. Further analyses involved characterizing the methylation profiles of the promoter region of both phosphatases in resistant and sensitive TGCT lines using pyrosequencing. The low rate of methylation, around 3%, affirmed that post-transcriptional regulation by miR-218-5p likely contributes to the downregulation of gene expression for both phosphatases. Additionally, a retrospective analysis of patient samples with known clinico-pathological characteristics revealed higher miR-218-5p expression in tumor and metastases tissues compared to healthy controls. Elevated miR-218-5p levels were also observed in the plasma of TGCT patients compared to healthy subjects.

In conclusion, our findings propose miR-218-5p as a potential novel chemoresistance biomarker and predictor of a more aggressive phenotype in TGCTs and a regulatory axis: hypoxia - miR-218 - phosphatase as a potential driver behind CDDP-resistance in TGCTs.

Acknowledgement: This work was supported by the Slovak Research and Development Agency (grant No. APVV-19-0286) and the Grants Agency of the Slovak Republic (grant No. VEGA-2/0056/21).



CHEMOTERAPIOU INDUKOVANÁ PERIFÉRNA NEUROPATIA (CIPN) AKO PREDIKTOR ZNÍŽENEJ KVALITY ŽIVOTA U PACIENTOV VYLIEČENÝCH Z GERMINATÍVNYCH NÁDOROV TESTIS

Zuzana Országhová¹, Dominika Gáliková¹, Peter Leško¹, Jana Obertová¹,
Katarína Rejleková¹, Zuzana Syčová-Milá¹, Patrik Palacka¹, Katarína
Kaľavská², Daniela Světlovská², Beata Mladosičová³, Jozef Mardiak¹,
Michal Mego¹, Michal Chovanec¹

¹II. Onkologická klinika LFUK a NOÚ, Bratislava

²Jednotka translačného výskumu LFUK a NOÚ, Bratislava

³Oddelenie klinickej patofyziológie LFUK, Bratislava

Chemoterapiou indukovaná periférna neuropatia (CIPN) je známym dlhodobým nežiaducim účinkom po kuratívnej liečbe testikulárných nádorov z germinatívnych buniek (GCT). CIPN môže prispieť k zhoršeniu kvality života pacientov vyliečených z GCT. V predkladanej práci sme sa zamerali na hodnotenie CIPN v spojení s kvalitou života v tejto populácii preživších. Pacienti vyliečení z GCT v Národnom onkologickom ústave v Bratislave (N = 151) prospektívne vyplnili dotazníky Európskej organizácie pre výskum a liečbu rakoviny (EORTC) zamerané na CIPN (dotazník QLQ-CIPN20) a na kvalitu života (dotazník QLQ-C30) počas ich každoročnej kontroly v ambulancii dlhodobého sledovania preživších s GCT. Medián sledovania pacientov bol 10 rokov (rozsah 4 - 30). Po získaní skóre z oboch dotazníkov bolo každé skóre z QLQ-C30 korelované s QLQ-CIPN20 skóre definovaným ako vysoké alebo nízke (nad a pod mediánom). Na štatistické spracovanie údajov sme použili štatistický program NCSS 2022. Preživší s vysokým celkovým CIPN20 skóre mali zhoršenú kvalitu života v QLQ-C30. Celkové zdravie bolo hodnotené ako horšie u preživších s vysokým CIPN20 v porovnaní s preživšími s nízkym CIPN20 (priemerné skóre \pm SEM: 67,17 \pm 2,00 vs. 86,18 \pm 1,76, $p < 0,00001$). Preživší s vysokým CIPN20 hlásili horšie fyzické, pracovné, emocionálne, kognitívne a sociálne fungovanie v porovnaní s preživšími s nízkym CIPN20 (všetky $p < 0,00001$). Preživší s vysokým CIPN20 častejšie pociťovali únavu, nauzeu, bolesť, dyspnoe, častejšie mali poruchy spánku a stratu chuti do jedla v porovnaní s preživšími s nízkym CIPN20 (všetky $p < 0,004$). Okrem toho bola v tejto populácii preživších vysoká CIPN záťaž spojená s väčšími finančnými problémami v porovnaní s nízkou CIPN záťažou (priemerné skóre \pm SEM: 19,70 \pm 2,64 vs. 6,67 \pm 2,32, $p = 0,00025$). Spearmanova analýza potvrdila negatívnu koreláciu celkového skóre CIPN20 so skóre celkového zdravia v QLQ-C30 ($R = - 0,53$, $p < 0,0001$).

CIPN je silným prediktorom zhoršenej kvality života u pacientov vyliečených z GCT. Molekulárne mechanizmy neurotoxicity v tejto populácii preživších by mali byť intenzívne skúmané za účelom vytvorenia vhodných preventívnych a terapeutických stratégií.



METABOLISM OF EXTRACELLULAR PROTEINS BY BRAIN CANCER CELLS

Jakub Šofranko¹, Eduard Gondáš^{1,2}, Radovan Murín¹

¹*Department of Medical Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Comenius University in Bratislava, Martin*

²*Department of Pharmacology, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Comenius University in Bratislava, Martin*

The heightened metabolic demands of brain cancer cells necessitate a robust supply of substrates, including amino acids. However, the availability of free amino acids within the microenvironment of brain cancer cells is often compromised. This limitation arises from restricted import through the blood-brain barrier and increased intracellular depletion due to the growing tumor's heightened demands. Herein, we propose that extracellular proteins may serve as an alternative reservoir of amino acids for cancer cells. To investigate the extent to which cancer cells utilize extracellular protein metabolism, we conducted experiments utilizing fluorescently labeled albumin with fluorescein isothiocyanate (FITC). The uptake of this labelled albumin was quantified in cultured astrocytoma, glioblastoma, and neuroblastoma cells via fluorescence measurements and microscopy visualization. Our findings demonstrate an exceptionally high import capacity of cancer cells compared to cultured astrocytes. Furthermore, the imported fluorescently labelled albumin accumulates within lysosomes and undergoes intracellular hydrolysis. Complementing these results, LC-MS analysis reveals a significant increase in essential amino acid levels, such as phenylalanine and methionine, within the culture media. These findings suggest that brain cancer cells can efficiently utilize extracellular proteins as an alternative amino acid source for their metabolic needs. Given the tumor cells' dependency on amino acid supply and the potential for pharmacological intervention to induce tumor cell death, a comprehensive investigation into the molecular mechanisms of protein and amino acid metabolism in tumor cells holds promise for expanding diagnostic and therapeutic strategies in clinical oncology research.

