

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSEIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE
ÚSTAV HISTOLÓGIE A EMBRYOLÓGIE

NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII VII



MARTIN 2021

Nové trendy a perspektívy v histológii VII

Recenzovaný zborník prác

Editori: RNDr. Mária Kovalská, PhD.
prof. MUDr. Marian Adamkov, DrSc.

Recenzenti: prof. RNDr. Erika Halašová, PhD.
doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

Grafická úprava: RNDr. Mária Kovalská, PhD.

Obálka zborníka: RNDr. Mária Kovalská, PhD.

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou.

Za obsahovú, ako aj gramatickú stránku zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov.
Všetky práva vyhradené. Žiadna časť tohto zborníka nemôže byť reprodukováná bez súhlasu vydavateľa.

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martin 2021

Tlač: Tlačiareň P+M, s.r.o., Turany 2021

Dostupnosť on-line: <http://www.jfmed.uniba.sk>

ISBN 978-80-8187-104-7

EAN 9788081871047

NUMQUAM INVENIETUR, SI CONTENTI FUERIMUS INVENTIS

Lucius Annaeus Seneca

OBSAH		
	Predhovor	4
EXPERIMENTÁLNE ŠTÚDIE		
Báľentová S.	<i>Inhibícia neurogenézy v mozgu potkanov po expozícii frakcionovanou dávkou ionizujúceho žiarenia</i>	5
Oravcová B.	<i>Vplyv metionínovej diéty na objemové a histopatologické zmeny hipokampu potkanov v modeli globálnej mozgovej ischémie</i>	8
Adamčáková J.	<i>Porovnanie histopatologických zmien v závislosti od dávky podanej siliky v dvoch modeloch pľúcnej silikózy u potkanov</i>	13
Mikolka P.	<i>Histopatologický pohľad na terapiu syntetickým surfaktantom s peptidovými analógmi ľudských surfaktantových proteínov SP-B a SP-C pri experimentálneho syndrómu akútne respiračnej tiesne</i>	17
Pastornická A.	<i>Expresia βIII-tubulínu a survivínu v súvislosti s rezistenciou na cytostatickú liečbu v chemicky indukovanom karcinóme mliečnej žľazy potkana</i>	23
Koklesová L.	<i>Vplyv <i>Rhus coriaria</i> L. (Sumach garbiarsky) na posttranslačné modifikácie histónov v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy in vivo</i>	27
Kubatka P.	<i><i>Rhus coriaria</i> L. v chemoprevencii mamárnej karcinogenézy: analýza mechanizmu účinku</i>	31
Líšková A.	<i>Vplyv <i>Rhus coriaria</i> L. na modifikáciu metylačného profilu génov v chemicky indukovanej mamárnej karcinogenéze</i>	35
Samec M.	<i>Úloha Sumachu (<i>Rhus coriaria</i>) v regulácii expresie miRNA v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy</i>	39
KLINICKÉ A HISTOMORFOLOGICKÉ ŠTÚDIE		
Mešťanová V.	<i>Úloha galektínu-3 v cervikálnych léziách</i>	43
Csizmárová S.	<i>Imunohistochemická analýza fascínu a jeho funkcia v EMT v léziách krčka maternice</i>	47
Bartoš V.	<i>Imunohistochemická expresia cytokeratínu 17 v epiderme pri benígnych epidermálnych proliferatívnych léziách</i>	51
Péčová T.	<i>Paradoxná kožná reakcia u pacientky liečenej IL17 inhibítorom - klinický a histopatologický pohľad</i>	57
Lukáčová E.	<i>Zavedenie a optimalizácia metódy na detekciu hypermetylácie génu GRIA4 na komerčných kontrolách a kontrolných vzorkách z konvenčnej a tekutej biopsie</i>	61
PREHLADOVÉ PRÁCE		
Burjanivová T.	<i>Využitie cirkulujúcej nádorovej DNA pri monitorovaní onkologických ochorení</i>	67
Dušenka R.	<i>Molekulárne prognostické testy v diagnostike karcinómu prostaty</i>	70
Lasabová Z.	<i>Konsenzuálne molekulové subtypy pri kolorektálnom karcinóme a možnosti stratifikácie pacientov na základe analýzy DNA</i>	85
Parvanovová P.	<i>Amyotrofická laterálna skleróza</i>	90
Hanzel R.	<i>Intersomatické klieťky s integrovanou dlahou v liečbe degeneratívneho ochorenia krčnej chrbtice</i>	95
Adamkov M.	<i>Autofágia (Autofágová bunková smrť)</i>	101

Predhovor

Máme za sebou zvláštny rok, poznačený pandemickou situáciou, ktorá prakticky poznačila všetky oblasti nášho bytia. Pandémia negatívne zasiahla aj akademickú pôdu. Bolo nevyhnutné prejsť na on-line systém výuky, ktorý určite nespĺňa všetky potrebné kritériá medicínskeho vzdelávania a to i napriek sofistikovaným výukovým programom, ktoré boli / sú každému k dispozícii. V tejto súvislosti je možné použiť športovú terminológiu – štúdium medicíny si jednoznačne vyžaduje „kontaktný“ systém. Žiaľ, pandémia nasilu zahnila tak študentov ako aj učiteľov do nevyhovujúceho a šedým priemerom zaváňajúceho on-line priestoru. Zasiahnuté boli v určitej miere aj vedecko-výskumné aktivity na pracoviskách, ktoré sa nedajú nahradiť prácou typu tzv. „home office“. Vraj sa zhoršili aj medziludské vzťahy na pracoviskách, tvrdí psychológ, a to aj napriek tomu, že sme si to ešte nestačili všimnúť. A aby toho nebolo málo, akademickú obec sužujú navrhované kontroverzné zmeny v novele vysokoškolského zákona, ktoré sa zrejme snažia emocionálne spestriť pozadie vysokoškolského prostredia.

Avšak nás, radových vysokoškolských učiteľov nášho ústavu teší fakt, že napriek stručne hore načrtnutej atmosfére stále pretrváva živý záujem prispievať do zborníka „Nové trendy a perspektívy v histológii“. Tento rok ide o jeho siedmu edíciu. Zo zaslaných príspevkov sa môžeme dozvedieť a posúdiť výskumné aktivity najmä mladých vedeckých pracovníkov a učiteľov, čo určite ponúka príležitosť aj na vzájomnú diskusiu o tej ktorej predmetnej problematike.

Týmto chceme vyjadriť našu úprimnú vďaku všetkým prispievateľom a tiež zaďakovať za ich snahu podeliť sa o svoje aktivity so širšou akademickou komunitou, čo pokladáme za jeden z hlavných cieľov našej publikácie.

Marian Adamkov

Inhibícia neurogenézy v mozgu potkanov po expozícii frakcionovanou dávkou ionizujúceho žiarenia

Báľentová, S.¹, Kalenská, D.², Muríň, P.³, Hajtmanová, E.³, Adamkov, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³ Univerzitná nemocnica Martin, Onkologické centrum, Martin
sona.balentova@uniba.sk

Abstract

In the present study, we investigated the effect of ionizing radiation on the population of neurons inhabiting neurogenic zones in the rat brain. Adult male Wistar rats received fractionated whole-brain irradiation (fWBI) with a total dose of 32 Gy delivered in 4 fractions (dose 8 Gy per fraction) once a week on the same day for 4 consecutive weeks. We used immunofluorescence staining, confocal microscopy and image analysis of brain slides to determine neuronal changes in two neurogenic areas: the anterior subventricular zone (SVZa) in the wall of the lateral ventricles and hippocampal dentate gyrus (DG). After fWBI, young neurons were almost eliminated in both neurogenic regions. On the other hand, the level of neurodegeneration was low in the SVZa region, but increased significantly in the hippocampal DG. The results reflect subacute changes 9-11 weeks after fWBI, which were manifested by inhibition of neurogenesis and neurodegeneration in specific areas of the brain.

Keywords: rat brain, neurogenesis, fractionated irradiation

Úvod

V klinickej rádioterapii sa u pacientov s metastázujúcimi nádormi mozgu najviac používa kraniálne frakcionované ožiarovanie. Používanie modernej ožarovacej techniky zvyšuje konformitu ožarovacieho procesu a vedie k dlhšiemu mediánu prežívania pacientov [1]. Napriek tomu frakcionované ožarovanie spôsobuje závažné histopatologické a funkčné, kognitívne zmeny. Kognitívne dysfunkcie sa u pacientov prejavujú zmenami verbálnej a priestorovej pamäte, poruchami pozornosti, ktoré niekedy vedú až k demencii [2]. V predklinických štúdiách na animálnych modeloch boli zistené významné histopatologické zmeny, napr. poškodenie endotelu, narušenie hematoencefalickej bariéry, astroglióza, aktivácia mikroglie, apoptóza prekursorov oligodendrocytov a zápalová odpoveď [3, 4, 5].

Materiál a metodika

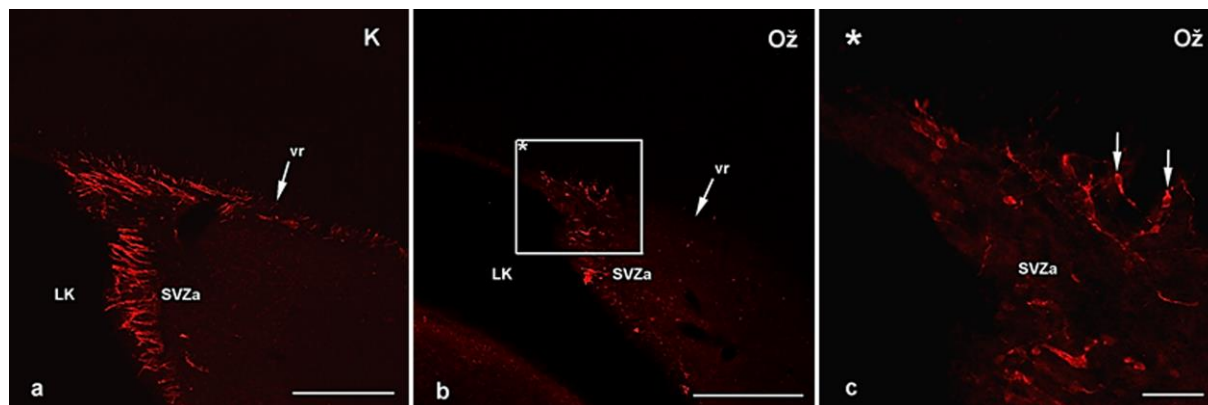
V experimente sme použili dospelé, biele samce potkanov, kmeň Wistar (n=20), ktoré mali na začiatku experimentu 3-4 mesiace. Potkany sme rozdelili na kontrolnú skupinu (n=10) a druhú skupinu (n=10) sme ožarovali frakcionovanou dávkou (cD=32 Gy, rozdelenou na 4 frakcie, 1 frakcia=8 Gy), 1-krát týždenne. Na ožarovanie sme použili lineárny urýchľovač Clinac iX (Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) s energiou 6 MeV. Ožarovaný objem predstavoval mozgové hemisféry, mozoček a časť miechy. Po 9-11 týždňoch sme u oboch skupín vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou fyziologického roztoku a následne 4% paraformaldehydu. Po dekapitácii a vybratí orgánov sme z mozgových hemisfér narezali sériové, sagitálne kryorezy. Pomocou imunofluorescenčného farbenia sme v preparátoch identifikovali marker neuroblastov – doublecortin (DCX). Neurodegeneratívne zmeny sme detegovali pomocou histochemického farbenia

Fluoro Jade-C. Preparáty sme fotili na fluorescenčnom konfokálnom mikroskope Olympus Fluoview FV10i (Olympus, Japonsko) a pomocou obrazovej analýzy (program Image J; NIH, Bethesda, MD, USA) sme hodnotili počet DCX-imunoreaktívnych (DCX-IR) a Fluoro Jade-C-pozitívnych buniek (FJ-C⁺) v neurogénnych oblastiach: GD hipokampu, prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa) a následne v jednotlivých oblastiach rostrálnej migračnej dráhy (RMS), t.j. vertikálnom ramene (vr), ohybe a horizontálnom ramene (hr) (celkový počet značených buniek/cm²).

Výsledky

Neurogénne oblasti, t.j. RMS a GD hipokampu v mozgu kontrolnej skupiny sa vyznačovali charakteristickým, rovnomerným zastúpením DCX-IR neuroblastov. Počet neuroblastov sa pozdĺž RMS postupne zvyšoval kaudo-rostrálnym smerom (SVZa: $438 \pm 31,89/\text{cm}^2$; vr: $394,52 \pm 36,34$; ohyb: $684,25 \pm 59$; hr: $943,75 \pm 112,81$). Počet neuroblastov v GD hipokampu bol v porovnaní s RMS pomerne nízky ($79,38 \pm 13,36$). Po ožiarení došlo k signifikantnému zníženiu neuroblastov v SVZa ($121,06 \pm 33,07$ verzus K; $p < 0,001$) a vr ($28,35 \pm 6,92$ vz. K; $p < 0,001$). V ďalších oblastiach RMS a hipokampe došlo k úplnej eliminácii DCX-IR neuroblastov (hr: žiadne bunky vz. K; $p < 0,001$; GD: žiadne bunky vz. K) (Obr. 1).

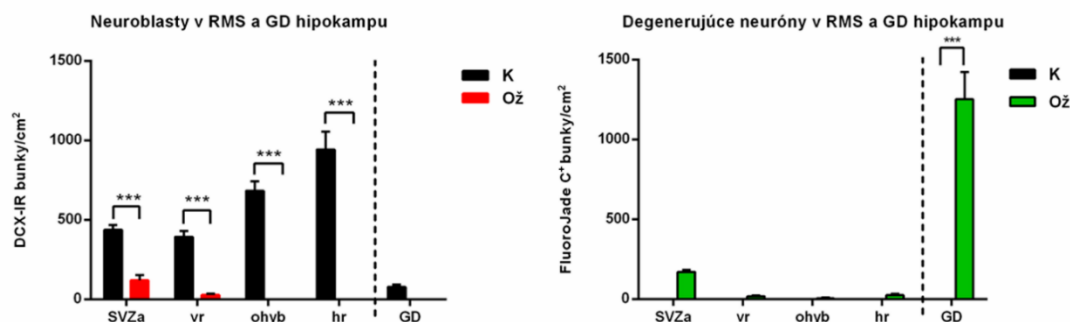
Po ofarbení metódou Fluoro Jade-C sme v mozgu ožiarených potkanov identifikovali FJ-C⁺ bunky nielen pozdĺž RMS, ale aj v príľahlých oblastiach, napr. corpus striatum a nucleus olfactorius anterior. Okrem neuroblastov a zrelých neurónov sme FJ-C pozitivitu zistili v ependýmových bunkách vystielajúcich stenu laterálnych mozgových komôr a taktiež v oligodendrocytoch. V mozgu potkanov nedošlo takmer ku žiadnym neurodegeneratívnym zmenám (vr, ohyb: žiadne bunky) s výnimkou SVZa ($172,26 \pm 12,71/\text{cm}^2$ vz. K: žiadne bunky) a GD ($1252,6 \pm 171,10$ vz. K: žiadne bunky) (Obr. 2).



Obr. 1 Mikrofotografie mozgu potkanov kontrolnej skupiny (K; a) a skupiny ožiarenej frakcionovanou dávkou 32 Gy ionizujúceho žiarenia (Ož; b, c) prežívajúcich 9-11 týždňov po poslednej dávke. V preparátoch sme pomocou imunofluorescenčného farbenia identifikovali marker neuroblastov – doublecortin (DCX; červená cytoplazma, šípky). V ožiarenej skupine došlo ku zníženiu počtu neuroblastov v SVZa. Vysvetlivky: LK – laterálna mozgová komora, SVZa – predná stena subventrikulárnej zóny, vr – vertikálne rameno. Mierky: a,b=200 μm ; c=50 μm

Diskusia

V mozgu potkanov prežívajúcich 9-11 týždňov po ožiarení došlo ku zreteľným kvantitatívnym zmenám v populácii neuroblastov (Obr. 2). Eliminácia neuroblastov v oboch neurogénnych oblastiach bola v súlade so závermi našich predchádzajúcich experimentov a zisteniami iných štúdií [6, 7, 8]. Zistili sme, že rádiosenzitivitu neuroblastov v neurogénnych oblastiach neoplyvňuje len cD, ale aj voľba



Obr. 2 Zastúpenie DCX-IR neuroblastov a FJ-C⁺ degenerujúcich neurónov v gyrus dentatus (GD) hipokampu a jednotlivých oblastiach rostrálnej migračnej dráhy (RMS), t.j. v prednej stene subvetrikulárnej zóny (SVZa), vertikálnom ramene (vr), ohybe a horizontálnom ramene (hr) v mozgu kontrolných (K) a ožiarených (OŽ) potkanov. Výsledky štatistickej analýzy (ANOVA) sú uvedené ako priemer ± štandardná odchýlka merania. *** $p < 0,001$

ožarovacieho prístroja, energia žiarenia a predovšetkým doba prežívania zvierat po frakcionovanom ožarení. Výsledky morfolologickej analýzy korešpondovali so závermi in vivo merania vybraných metabolitov v corpus striatum a GD pomocou protónovej magnetickej rezonančnej spektroskopie. Zistili sme signifikantný pokles koncentrácie markera neurónov spolu s poklesom hlavného inhibičného a excitačného neurotransmitera. Histologický nález a zmena metabolického profilu mohli byť prejavom reverzibilného poškodenia neurónov alebo ireverzibilnej straty spojenej s narušením neurotransmisie. Avšak nepatrné neurodegeneratívne zmeny v rámci RMS naznačovali, že SVZa má určitú schopnosť nahradzovať poškodené neuróny. Podľa záverov našich a iných štúdií však SVZa nie je schopná obnoviť pôvodné počty neurónov niekoľko mesiacov po frakcionovanom ožarení [6, 7, 8, 9].

Záver

Frakcionované ožarovanie zásadne ovplyvnilo zastúpenie neurónov v oboch neurogénnych oblastiach mozgu potkanov. V našej štúdii sme okrem histopatologických zmien identifikovali aj metabolické a volumetrické zmeny v neurogénnych oblastiach mozgu. Výsledky základného výskumu a skúsenosti z rádioterapie potvrdzujú, že histopatologické nálezy sú úzko spojené s funkčnými zmenami mozgu. Práve funkčné, kognitívne zmeny patria k najzávažnejším prejavom, ktoré výrazne zhoršujú kvalitu života onkologických pacientov.

Práca bola financovaná z prostriedkov grantu Vedeckej grantovej agentúry MŠVV a Š SR (VEGA č.1/0356/18) a projektu „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“ spolufinancovaným z prostriedkov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Moraes, *Appl Rad Oncol.* **2017**, 6(1):6–10.
- [2] Greene-Schloesser, *Front Oncol.* **2012**, 2:73.
- [3] Yuan, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2006**, 66:860–866.
- [4] Kalm, *Radiat Res.* **2009**, 171:66–76.
- [5] Lumniczky, *Front Immunol.* **2017**, 8:517.
- [6] Lee, *Biomol Ther. (Seoul)* **2012**, 20(4):357–370.
- [7] Bálintová, *Neurotoxicology* **2017**, 60:70–81.
- [8] Bálintová, *Brain Res.* **2019**, 1708:146–159.
- [9] Conner, *Radiat Res.* **2010**, 173:49–61.

Vplyv metionínovej diéty na objemové a histopatologické zmeny hipokampu potkanov v modeli globálnej mozgovej ischémie

Oravcová, B.¹, Kalenská, D.², Hnilicová, P.³, Adamkov, M.¹, Lehotský, J.^{3,4}, Kovalská, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
maria.kovalska@uniba.sk

Abstract

A methionine (Met)-rich diet leads to an elevated level of homocysteine (Hcy) in plasma and might cause pathological alterations across the brain. Hyperhomocysteinaemia (hHcy) is associated with both cardio- and cerebrovascular diseases with brain tissue damage. The hippocampus is constantly being studied for its selective vulnerability linked with neurodegeneration. This experiment is designed to demonstrate volume and histomorphological changes in the rat hippocampus after global brain ischemia with previous induction of hHcy using a combination of magnetic-resonance-volumetry as well as immunohistochemical analysis. After 4 weeks of a Met-enriched diet at a dose of 2 g/kg of animal weight/day, adult male Wistar rats underwent 4-vessel occlusion lasting for 15 min, followed by a reperfusion period varying of 7 days. Histomorphological analyses showed that the subsequent ischemia-reperfusion (IR) insult aggravates the extent of the sole hHcy-induced degeneration of the hippocampal neurons. Deeper alterations in the number and morphology of neurons, astrocytes and their processes and decreased volume in the grey matter were demonstrated in the hippocampus 7 days post-ischemia in the hHcy animals. Our results suggest that the combination of the two risk factors (hHcy and IR insult) endorses and exacerbates the rat hippocampal neurodegenerative processes.

Keywords: hippocampus, hyperhomocysteinemia, methionine diet, ischemia-reperfusion injury, neurodegeneration

Úvod

Metionín (Met) je esenciálna, proteinogénna aminokyselina prítomná v strave a tvorí výraznú časť *Západnej diéty* [1]. Zvýšená hladina Met v plazme, hypermetioninémia (hMet) a jej oxidačný produkt, Met sulfoxid, vedú v organizme k oxidačnému stresu a prispievajú k rozvoju/progresii patologických zmien v mozgu [2-4].

Zvýšený príjem živočíšnych proteínov, ktoré sú bohaté na Met alebo dysregulácia Met metabolismu môžu viesť k nárastu plazmatickej koncentrácie ďalšieho medziproduktu, homocysteínu (Hcy). Hcy je aminokyselina obsahujúca síru a vzniká pri konverzii Met na cysteín. Hyperhomocysteinémia (hHcy) je jeden zo známych rizikových faktorov pre rozvoj kardio- aj cerebrovaskulárnych ochorení [5]. S hHcy sa spájajú neurodegeneratívne ochorenia, ako akútne cievne mozgové príhody (CMP) a ateroskleróza, kognitívna deteriorácia či Alzheimerova choroba [1, 6]. Avšak presný mechanizmus, ako sa hHcy na rozvoji týchto ochorení podieľa, nie je úplne známy.

V súčasnosti existuje iba obmedzené množstvo experimentálnych prác zaoberajúcich sa vzájomným prepojením hHcy a IR poškodenia na nervové tkanivo centrálnej nervovej sústavy. Pri experimentoch s indukciou hHcy priamym podávaním Hcy

podkožne a následnou aplikáciou mozgovej ischémie sa ukázalo histologicky detegované urýchlenie dezintegrácie nervového tkaniva v oblasti hipokampu [7-10]. Preto sme v našej práci sledovali ako sa spolupôsobenie hHcy a IR inzultu podieľa na rozvoji a akcelerácii neurodegenerácie v mozgu potkanov, no hHcy bola v tomto prípade navodená diétou so stredne zvýšeným obsahom Met. Naše výsledky ukázali, že strava bohatá na Met v kombinácii s IR poškodením vedie k histomorfologickým a objemovým zmenám v hipokampe.

Prehľadovanie poznatkov o vplyve modifikovateľných rizikových faktorov na rozvoj neurodegenerácie, ako v tejto práci, by mohlo rozšíriť možnosti liečby neurologických pacientov s ischemickým poškodením mozgu, ktorého negatívne dôsledky môžu byť umocnené práve poruchou metabolizmu esenciálnych aminokyselín (hHcy).

Materiál a metódy

K získaniu vzoriek sme v tomto experimente použili samce potkanov kmeňa Wistar ($n=28$) vo veku 5 až 6 mesiacov, s priemernou hmotnosťou 332g, ktoré boli chované za štandardných podmienok v CZ JLF UK. Manipulácia s týmito zvieratami bola schválená Etickou komisiou JLF UK ako aj ŠVPS SR pod číslom 727/12-221. Zvieratá boli rozdelené do 4 skupín. Prvá skupina zvierat slúžila ako kontrola (K). Zvieratá druhej skupiny (IR7d) podstúpili štvorciovny podväz (4-VO podľa Kovalska et al. [8]) s následnou 15 minútovou mozgovou ischémiou a 7 dňovou reperfúziou. Tretej a štvrtej skupine bola počas 28 dní podávaná voda obohatená o Met v dávke 2 g/kg váhy zvierat, čím sa u nich vyvolala mierna hHcy. Tretia skupina slúžila ako hHcy kontrola (Met-K). Štvrtej skupine bola na 29. deň aplikovaná 15 minútová globálna mozgová ischémia so 7 dňovou reperfúziou (Met-IR7d). Potkany boli usmrtené dekapitáciou v hlbokoj anestézii v súlade s etickými zásadami práce s laboratórnymi zvieratami. Mozgy zvierat boli vypreparované, hlbokozmrazené, narezané na kryostate a nanesené na podložné sklá. Pre ďalšie spracovanie a vyhodnocovanie preparátov sme použili bunkovo špecifické primárne protilátky NeuN (neuróny) a GFAP (astrocyty). Vzorky sme podrobili imunohistochemickej analýze na konfokálnom mikroskope Olympus FluoView FV10i. Zamerali sme sa na oblasť *cornu ammonis 1* (CA1) hipokampu. Výsledky sme vyhodnotili v programe GrafPhad InStat V3.01 a pre vyjadrenie štatistickej významnosti sme použili Studentov *t*-test. Pri *in vivo* objemovej analýze hipokampu magnetickou rezonanciou (MR) s T2 vážením, za využitia prístroja 7 T Bruker Biotech MRI a *softwaru* ITK-SNAP, sme analyzovali potkany z K, Met-K a Met-IR7d skupiny. Objem hipokampov bol vypočítaný automaticky po manuálnom označení vybranej oblasti.

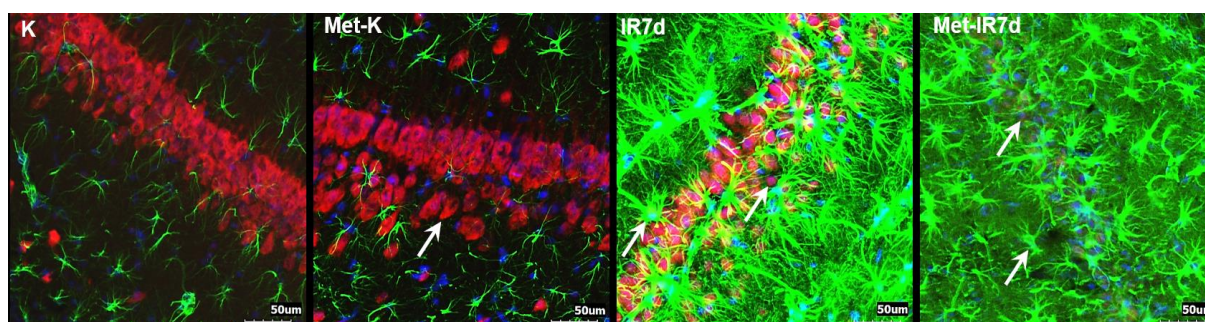
Výsledky

1. Výsledky imunofluorescenčnej analýzy

Pri imunohistofluorescenčnej analýze NeuN protilátka v naivnej kontrolnej skupine (K) značila jadrá, ako aj cytoplazmu väčšiny typov neurónov všetkých oblastí v mozgu (mozgová kôra, hipokampus a mozoček). V astrocytoch nebola pozorovaná žiadna imunoreaktivita. Prevalencia cytoplazmatickej positivity bola koncentrovaná v tele neurónov, siahajúca do krátkej vzdialenosti do výbežkov (hlavne odstupový kužeľ axónu). V CA1 oblasti hipokampu Met-K skupiny sme však detegovali morfológické zmeny neurónov. Sledovali sme opuchom tela aj jadier neurónov tejto skupiny. Štatisticky signifikantný rozdiel oproti kontrolnej skupine (K) sme však nezistili. Po 7 dňovej reperfúzii sa ukázal značný pokles počtu NeuN+ neurónov. U naivnej IR7d skupiny so znížením počtu o 39,2 % ($p<0,001$), tak aj Met-IR7d skupiny s 42,9 % poklesom ($p<0,001$) voči K skupine. Met diéta s následnou miernou hHcy spôsobila o

31,7% väčšiu stratu NeuN+ buniek v Met-IR7d ako u naivnej IR7d skupiny, ako aj výraznejšie morfológické zmeny s fokálnymi stratami neurónov a úbytkom ich fluorescenčnej intenzity.

GFAP protilátka v K skupine znázornila astrocyty vo všetkých vrstvách CA1 oblasti hipokampu. Ich výbežky boli tenké a radiálne usporiadané. V Met-K experimentálnej skupine sme zaznamenali nárast počtu GFAP+ buniek o 24,8 % ($p < 0,01$) voči K skupine, a to najmä v oblasti *stratum oriens*, *stratum radiatum* a *stratum lacunosum* hipokampu. Po 7 dňovej reperfúzií sme zaznamenali štatistický pokles astrocytov u Met-IR7d voči Met-K skupine o 15,4 % ($p < 0,05$). Po 7 dňovej reperfúzií sme zaznamenali iba nevýznamný rozdiel v počte GFAP+ buniek medzi skupinou s/bez indukovanej hHcy. Detegovali sme však výrazné histomorfologické zmeny astrocytov. V IR7d skupine sme sledovali hypertrofické telá astrocytov a ich výbežky boli viac vetvené a dlhšie (znaky reaktívnej astrogliózy). Naopak, hypotrofické astrocyty s krátkymi výbežkami sme sledovali v skupine Met-IR7d (obr. 1).



Obr. 1 Imunofluorescenčné mikrofotografie prekryvu NeuN a GFAP v CA1 oblasti hipokampu. Fluorescenčné mikrofotografie hipokampu potkanov u kontrolnej a ischemickej skupiny so 7 dňovou reperfúziou s/bez Met diéty. Na obrázku je zelenou fluorescenciou zobrazený GFAP a červenou NeuN. Jadrá všetkých buniek sú dofarbené DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole – modrá). Šípky označujú morfológicky zmenené bunky. Mierka na obrázkoch = 50 μm

2. MRI volumetrická analýza

MRI volumetrickou analýzou sme dokázali signifikantné rozdiely objemu hipokampu medzi K ($96,61 \pm 4,78 \text{ mm}^3$) a Met-K ($100,85 \pm 1,82 \text{ mm}^3$) skupinou s $p=0,031$. Po 7 dňovej reperfúzií u Met-IR7d skupiny došlo k zmenšeniu objemu hipokampu ($85,78 \pm 2,01 \text{ mm}^3$) s $p=0,001$ voči K a s $p < 0,001$ oproti Met-K skupine (tab. 1).

Tab. 1 MR-volumetria oblasti hipokampu potkanov. 1. stĺpec - Hodnota objemu tkanív (stredná hodnota \pm SD) hipokampu pre kontrolnú skupinu (K, n=8), pod tým skupina s Met diétou (Met-K, n=8) a Met-IR7d. 2. - 4. stĺpec- vyjadrená základná hodnota objemu tkaniva pre experimentálne skupiny a percentuálny nárast/pokles objemu hipokampu voči K a Met-K spolu so štatistickou signifikantnosťou rozdielu medzi skupinami a vypočítanými hodnotami

HIPOKAMPUS			
Objemové zmeny (priemer \pm SD)	K (objemové rozhranie) 91.7 mm ³	Met-K 10 \pm 2 %	Met-IR7d - 6 \pm 2 %
Objem tkaniva (priemer \pm SD)			
K 96.51 \pm 4.78 mm ³	-	Independent sample	
Met-K 100.85 \pm 1.82 mm ³	0.031	-	2-tailed t-test
Met-IR7d 85.78 \pm 2.01 mm ³	0.001	< 0.001	-

“-“ štatistická signifikantnosť medzi K/K, Met-K/Met-K a Met-IR7d/Met-IR7d

Diskusia

Vysoký príjem Met a/alebo dysregulácia Met metabolizmu môže viesť k hHcy, ktorá je známym rizikovým faktorom pre kardio- a cerebrovaskulárne ochorenia. hHcy je taktiež spájaná s rozvojom neurodegeneratívnych zmien [1, 5, 6]. Viaceré štúdie ukázali, že po ischemickej CMP dochádza v mozgu k časovo závislým, heterogénnym histopatologickým zmenám [7, 8, 11, 12]. Hipokampus predstavuje selektívne vulnérabilnú štruktúru mozgu a na inzul ako ischemické poškodenie reaguje včasným nástupom neurodegeneratívnych zmien [12, 13]. Len málo štúdií v laboratórnych podmienkach je zameraných na sledovanie spolupôsobenia hHcy a IR poškodenia, ktoré by imitovalo CMP s poruchou metabolizmu esenciálnych aminokyselín u pacientov [14].

V našej práci sme zvieratám indukovali miernu hHcy pomocou diéty so zvýšeným obsahom Met podávaným vo vode. Naše výsledky pri kombinácii hHcy a IR inzulitu ukázali výraznejšie degeneratívne zmeny v CA1 oblasti hipokampu. Zaznamenali sme zníženie počtu neurónov so súčasným výskytom zmien gliovej celularity v postischemickom období u skupín s navodenou hHcy. Pokles neurónov je zrejme spojený s oxidáciou bielkovín, či priamou stimuláciou N-metyl-D-aspartátového receptora (NMDAR) spôsobenou hHcy [9, 15]. Nárast počtu astrocytov u skupiny s hHcy bez ischemie bol spojený s hypertrofiou ich tiel a výraznejšou arborizáciou výbežkov. Tento histomorfologický fenomén možno popísať ako reaktívnu astrogliózu, ku ktorej zrejme došlo dynamickou odpoveďou astrocytov na glutamátotoxicitu a/alebo narušenie hematoencefalickej bariéry (HEB) v hHcy podmienkach [16]. Sedemdňová reperfúzia viedla k nápadnejšiemu poškodeniu astrocytov po predchádzajúcej indukcii hHcy, ktoré sa prejavilo kratšími a menej vetvenými výbežkami oproti naivnej IR7d skupine. Predpokladáme, že tento stav bol vyvolaný gliotoxicitou so stimuláciou NMDAR, influxom vápnika a cytoskeletovou prestavbou astrocytov, ako dôsledok spolupôsobenia hHcy a IR poškodenia [1, 8-10, 15-18].

Samotná hHcy navodená Met diétou je spojená s nárastom objemu hipokampu vďaka opuchu tkaniva/buniek, čo sme dokázali v predchádzajúcej práci [1]. Ischemický inzulit tento edém zvyrazňuje, a to pravdepodobne vďaka disrupciám HEB excitotoxickým vplyvom Hcy na astrocyty [16]. Po ischemii a následnej 7 dňovej reperfúzii sme v hHcy podmienkach detegovali zmenšenie objemu hipokampu, čo je možnou známku

progresívnej neurodegenerácie ako sa ukázalo vo viacerých podobných štúdiách [17, 18].

Na základe našich výsledkov usudzujeme, že mierna hHcy navodená zvýšeným príjmom Met vedie za experimentálnych podmienok v mozgu k vzniku toxického prostredia s poškodením CA1 oblasti hipokampu na mikro- aj makroskopickú úroveň. Dochádza k zmene objemu hipokampu, aktivácii a poškodeniu astrocytov, ako i zníženiu počtu neurónov.

Záver

Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť vzájomný vzťah hHcy a mozgovej ischémie na hipokampus so sledovaním nástupu a priebehu neurodegenerácie za využitia MRI volumetrie a imunofluorescenčnej analýzy. Hlbšie poznanie podstaty mechanizmov prebiehajúcich v bunkách pri IR poškodení mozgu v asociácii s hHcy by mohlo v budúcnosti prispieť k zefektívneniu terapie resp. prevencie u pacientov s CMP v spojitosti s neurodegeneratívnymi zmenami v mozgu ako i pri rozvoji demencie a pomôcť stanoviť mieru vplyvu týchto dvoch reverzibilných rizikových faktorov na relevantné neurologické ochorenia.

Práca bola podporená projektami VEGA 1/0230/20, APVV č. 15/0107 a z projektu „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“, kód: 26220220114, spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Kovalska, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20(24):6234.
- [2] Soares, *Amino Acids.* **2020**, 52:371–385.
- [3] Tarrago, *Nat Chem Biol.* **2015**, 11:332–338.
- [4] Soares, *Metab Brain Dis.* **2007**, 32:1693–1703.
- [5] Hainsworth, *Biochim Biophys Acta.* **2016**, 1862:1008–1017.
- [6] Liu, *Am J Transl Res.* **2016**, 8:117–124.
- [7] Kovalska, *Act Nerv Super Rediviva.* **2019**, 11:481–498.
- [8] Kovalska, *Neurochem Res.* **2018**, 43(9):1766–1778.
- [9] Lehotsky, *Front Neurosci.* **2016**, <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00538>.
- [10] Petras, *Cel Mol Neurobiol.* **2017**, 37(8):1417–1431.
- [11] Ding, *Bo Pu Xue Za Zhi*, **2014**, 31:116–132.
- [12] Pluta, *Mol Neurobiol.* **2020**, 57:1281–1290.
- [13] Newrezella, *BMC Genom.* **2007**, 8:370.
- [14] Stetler, *Prog Neurobiology.* **2014**, 114:58–83.
- [15] Kovalska, *J Phys Pharm.* **2015**, 66(6):887–897.
- [16] Weekman, *J Neuroinflamm.* **2019**, 16:284–296.
- [17] Harris, *Front Aging Neurosci.* **2015**, 7:202–210.
- [18] Huang, *Sci Rep.* **2019**, 9:2852–2870.

Porovnanie histopatologických zmien v závislosti od dávky podanej siliky v dvoch modeloch pľúcnej silikózy u potkanov

Adamčáková, J.¹, Báľentová, S.², Adamkov, M.², Mikolka, P.^{1,3}, Paľová, R.¹, Kalenská, D.⁴, Nová Z.¹, Kunertová, L.⁴, Mokrá, D.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav fyziológie, Martin;

² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie

a embryológie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Martinské centrum pre biomedicínu, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova

lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin

daniela.mokra@uniba.sk

Abstract

Silica (SiO₂) is a common mineral in the earth's crust and a major particulate matter in the environment. Prolonged and/or intensive inhalation of silica particles can cause lung silicosis, often leading to irreversible pulmonary fibrosis. The changes associated with the silicosis include accumulation of cells, particularly of lymphocytes and alveolar macrophages, in the interstitium, thickening of the pulmonary interstitium mass, formation of hyalinized fibrotic nodules, and deposition of collagen fibres. Due to a lack of effective therapy and poor understanding the pathomechanisms, silicosis remains a serious health problem. Therefore, exploring the molecular pathomechanisms of silicosis is needed for discovery of novel therapeutic strategies, particularly in the early stages of the disease. For this purpose, various animal models of the lung silicosis have been developed. In this study, an extent of histopathological changes evoked by two different doses of intratracheally delivered silica was compared.

Keywords: silica, lung silicosis, inflammation, fibrosis

Úvod

Pľúcna silikóza je ireverzibilné fibrotizujúce ochorenie pľúc, ktoré vzniká v dôsledku dlhodobej a/alebo intenzívnej inhalácie kremíkových častíc (siliky), najčastejšie ako profesionálna záťaž v baníctve alebo pri opracovávaní kameňa [1,2]. Patofyziológia ochorenia nie je úplne objasnená, predpokladá sa však výrazná interakcia viacerých mechanizmov vrátane zvýšenej tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS), aktivácie prozápalových a proapoptotických kaskád a stimulácie profibrotických procesov [3]. Pre štúdium zmien pri silikóze ako aj pre testovanie nových spôsobov liečby sa používajú viaceré animálne modely silikózy, v ktorých sa podávajú rôzne dávky a koncentrácie oxidu kremičitého (siliky), a to instiláciou do trachey priamou transmurálnou cestou alebo orofaryngeálnou cestou. V našom projekte sme na intratracheálne podanie siliky použili orofaryngeálnu cestu, ktorá v porovnaní s priamou transtracheálnou instiláciou umožňuje porovnateľnú distribúciu siliky v pľúcach, pričom nevyžaduje predchádzajúcu chirurgickú prípravu ani následnú pooperačnú fázu [4,5]. Na vyvolanie zápalových a následne fibrotických zmien sme použili dve rôzne dávkovania siliky a porovnali sme stupeň histopatologických zmien v týchto dvoch modeloch.

Materiál a metódy

V našich experimentoch sme použili samce potkanov SPF kmeňa Wistar s hmotnosťou 250-400 g, ktoré boli chované v štandardných podmienkach vo zverinci. Na vyvolanie modelu pľúcnej silikózy sme použili 2 koncentrácie siliky, t.j. 50 mg/ml/kg

hmotnosti pre model silikózy 1 alebo 50 mg/ml/zviera pre model silikózy 2. Modely silikózy sme vyvolali jednorazovým orotracheálnym podaním príslušnej dávky suspenzie siliky (oxidu kremičitého vo fyziologickom roztoku) v celkovej inhalačnej anestéze. Po 14 alebo 28 dňoch od podania siliky sme zvieratá usmrtili podaním letálnej dávky anestetík.

Vybrali sme pľúca a stredný lalok pravých pľúc sme fixovali v 4% formaldehyde. Po fixácii boli vzorky pľúc parafinizované, narezané a ofarbené hematoxylínom-eozínom. Morfometrickú analýzu vzoriek realizoval skúsený histológ a na základe prítomnosti a stupňa emfyzému, atelektázy, zhlukov lymfocytov v interstíciu a prítomnosti neutrofilov, lymfocytov, plazmatických buniek a eozinofilov (0=nepřítomné, 1=ojedinelé, 2=mierne, 3=zvýšené) sme určili bodové skóre pre jednotlivé zmeny. Časť rezov sme po opláchnutí tečúcou vodou farbili pomocou farbiva picro-sirius red (Millipore Sigma, USA) počas 1 h. Po dvojito oplachu kyslou destilovanou vodou a dehydratáciou v 100% etanole sme rezy montovali v Entellane (Millipore Sigma). Farbením sa vizualizovali červené kolagénové vlákna na bleďožltom pozadí. Hrúbku vrstvy spojivového tkaniva (lamina propria) steny bronchiolov a hrúbku tunica adventitia steny ciev mikroskopicky hodnotil skúsený histológ pomocou softvéru Quick Photo Micro, verzia 3.2 (Olympus) a údaje vyjadril v μm .

Výsledky

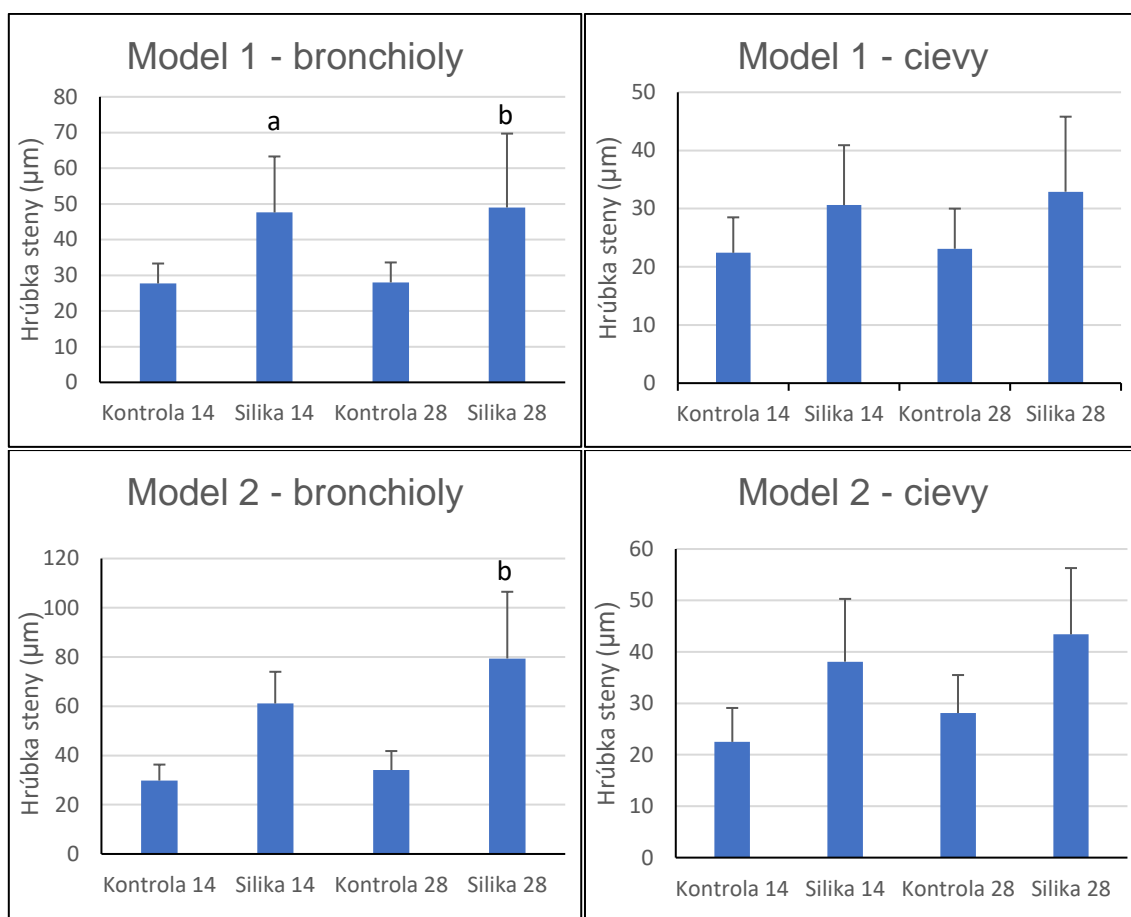
V oboch modeloch silikózy sme v skupinách so silikózou (Silika 14 resp. Silika 28) pozorovali zhoršenie nami sledovaných morfometrických parametrov v porovnaní s kontrolnými skupinami (Kontrola 14 resp. Kontrola 28), pričom niektoré rozdiely boli aj štatisticky významné (Tabuľka 1).

Tab. 1 Histopatologické parametre v modeli 1 a modeli 2 vyhodnotené skórovacím systémom

Model silikózy 1 (dávka siliky 50 mg/ml/kg hmot.)				
	Kontrola 14	Silika 14	Kontrola 28	Silika 28
Emfyzém	0,9 \pm 1,1	2,1 \pm 0,6	1,3 \pm 0,5	1,4 \pm 0,7
Atelektáza	0,6 \pm 1,1	0,9 \pm 1,0	0,1 \pm 0,4 ^c	0,6 \pm 0,9 ^b
Zhluky Ly v interstíciu	0,6 \pm 1,0	0,9 \pm 1,1	0,6 \pm 0,5	0,8 \pm 0,9
Ne v interstíciu	0,9 \pm 0,7	1,8 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5	1,8 \pm 0,5
Ly v interstíciu	0,9 \pm 0,7	1,8 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5	1,5 \pm 0,8
PC v interstíciu	0,9 \pm 0,7	1,8 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5	1,5 \pm 0,8
Eo v interstíciu	1,3 \pm 0,8	1,8 \pm 0,5	1,6 \pm 0,5	1,8 \pm 0,5
Model silikózy 2 (dávka siliky 50 mg/ml/zviera)				
	Kontrola 14	Silika 14	Kontrola 28	Silika 28
Emfyzém	1,6 \pm 1,1	1,6 \pm 0,5	0,8 \pm 0,9	1,1 \pm 1,0
Atelektáza	0,3 \pm 0,7	1,0 \pm 1,0	0,3 \pm 0,7	0,3 \pm 0,5
Zhluky Ly v interstíciu	2,5 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	1,1 \pm 0,8	1,1 \pm 1,0
Ne v interstíciu	1,4 \pm 0,7	1,6 \pm 0,5	1,5 \pm 0,5	1,0 \pm 0,5
Ly v interstíciu	0,1 \pm 0,4	0,9 \pm 0,9 ^a	0,8 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5
PC v interstíciu	0,3 \pm 0,5	0,9 \pm 0,9	0,8 \pm 0,5	1,0 \pm 0,5
Eo v interstíciu	1,3 \pm 0,7	1,1 \pm 0,7	1,5 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5

Skratky: Ly: lymfocyty, Ne: neutrofil, PC: plazmatické bunky, Eo: eozinofily. Pre porovnania medzi skupinami $p < 0,05$: ^aSilika 14 vs Kontrola 14, ^bSilika 28 vs Kontrola 28, ^cKontrola 28 vs Kontrola 14

Analýza prítomnosti spojivového tkaniva v stene bronchiolov a ciev ukázala výrazne zvýšenú akumuláciu kolagénových vlákien v stene bronchiolov a tiež mierne zvýšenú akumuláciu kolagénu v stene ciev (Obrázok 1).



Obr. 1 Hrúbka steny bronchiolov a ciev v modeli 1 (dávka siliky 50 mg/ml/kg hmot.) a modeli 2 (dávka siliky 50 mg/ml/zviera) (vyjadrené v µm). Pre porovnania medzi skupinami: ^aSilika 14 vs Kontrola 14 $p < 0,05$, ^bSilika 28 vs Kontrola 28 $p < 0,01$

Diskusia

Inhalácia kremíkových častíc do pľúc spúšťa výraznú zápalovú odpoveď, ktorá postupne prechádza do chronicity a ireverzibilnej fibrotizácie tkaniva. V animálnych modeloch silikózy sa zistilo, že v akútnej reakcii na intratracheálne podanie siliky sa výrazne aktivujú alveolárne makrofágy a ďalšie zápalové bunky, ktoré po inzulte vstupujú do pľúcneho interstícia. Aktivujú sa rôzne prozápalové a proapoptotické kaskády vrátane inflamazómu a zvyšuje sa tvorba prozápalových cytokínov (IL-1 β , TNF α , IL-6 atď.) a ROS [6,7]. Postupne sa zápalový proces stáva chronickým, dochádza k deštrukcii epitelových buniek a zvyšuje sa tvorba extracelulárnej matrix. V akútnej fáze (počas prvých 7-14 dní od podania siliky) dominuje hromadenie prozápalových buniek, predovšetkým neutrofilov, v bronchoalveolárnej lavážnej (BAL) tekutine, čo je spojené so zvýšením koncentrácií prozápalových cytokínov v BAL a plazme a tiež zvýšením prítomnosti tekutiny v pľúcach. Akútny zápal postupne prechádza do štádia včasnej fibrózy, s proliferáciou myofibroblastov, znmožením extracelulárnej matrix a ukladaním depozitov kolagénu v intersticiu. Zvýšenie celkového počtu buniek v BAL po približne 2 týždňoch od inzultu dosahuje vrchol, počet neutrofilov neskôr klesá a zvyšuje sa zastúpenie T-lymfocytov a alveolárnych makrofágov. Dochádza aj k zmenám niektorých biochemických markerov, napr. k zvýšeniu PDGF, TGF- β 1, IGF, endotelínu-1, fibronektínu a trombínu. Základnými regulátormi syntézy a degradácie extracelulárnej matrix sú matrix-metaloproteinázy (MMP) a ich tkanivový inhibítor (TIMP), ale v tkanive sú zvýšené aj koncentrácie

kolagénu a hydroxyprolínu, markera celkového obsahu kolagénu v pľúcach, a tiež aktínu hladkej svaloviny (SMA), markera diferenciácie pľúcnych myofibroblastov. Objavuje sa aj remodeling ciev. Naopak, znižujú sa niektoré anti-fibrotické faktory, napr. interferón- γ [8-11]. Naše výsledky sú v súlade s výsledkami iných autorov. Zistili sme, že kým v prvých 14 dňoch sa v interstíciu najvýraznejšie zvyšujú neutrofily, neskôr dominujú lymfocyty. Ďalej sme pozorovali, že stupeň atelektázy a emfyzému po podaní siliky je výraznejší počas akútnej fázy ochorenia. Zvýšenie akumulácie kolagénu sme zaznamenali už po 2 týždňoch od podania siliky, pričom sa tieto zmeny ešte zvýraznili po 28 dňoch od podania siliky. Dôležitým zistením je aj to, že okrem nahromadenia kolagénových vlákien v stene bronchiolov dochádza aj k zhrubnutiu steny ciev, a to už vo včasnej fáze ochorenia. Hoci sme porovnaním nami sledovaných histopatologických zmien v pľúcach nezistili významné rozdiely medzi dvomi modelmi silikózy a obe dávkovania siliky viedli k požadovaným zápalovým a fibrotickým zmenám pľúc, mierne výraznejší a stabilnejší efekt sme pozorovali v modeli silikózy 2.

Záver

Oba nami použité modely silikózy viedli k požadovaným zápalovým a fibrotickým zmenám v pľúcach, pričom mierne výraznejší efekt sme pozorovali v modeli silikózy 2.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0356/18 a APVV-15-0075.

Literatúra

- [1] Greenberg, *Dis Mon.* **2007**, 53:394–416.
- [2] Barnes, *Respirology.* **2019**, 24:1165–1175.
- [3] Adamcakova and Mokra, *Int J Mol Sci.* **2021**, 22:4162.
- [4] Liu, *Biomed Environ Sci.* **2016**, 29:584–588.
- [5] Gharaee-Kermani, *Methods Mol Med.* **2005**, 117:251–259.
- [6] Øvrevik, *Biomolecules.* **2015**, 5:1399–1440.
- [7] Sayan and Mossman, *Part Fibre Toxicol.* **2016**, 13:51.
- [8] Izbicki, *Int J Exp Pathol.* **2002**, 83:111–119.
- [9] Larki, *Res Pharm Sci.* **2013**, 8:243–252.
- [10] Zhang, *Int J Occup Med Environ Health.* **2018**, 31:503–515.
- [11] Guo, *Toxicol Lett.* **2019**, 300:59–66.

Histopatologický pohľad na terapiu syntetickým surfaktantom s peptidovými analógmi ľudských surfaktantových proteínov SP-B a SP-C pri experimentálnom syndrómu akútne respiračnej tiesne

Mikolka, P.¹, Košútová, P.¹, Kolomazník, M.¹, Matéffy, S.²,
Čalkovská, A.¹, Mokrá, D.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu a Ústav fyziológie, Martin; ² Unilabs Slovakia, s.r.o., Laboratórium patologickej anatómie v Prešove, Martin

pavol.mikolka@uniba.sk

Abstract

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is associated with diffuse lung inflammation, damaged alveolar epithelium, leakage of plasma proteins into the alveoli and inactivation of pulmonary surfactant, which together lead to ventilation perfusion mismatch and respiratory failure. Lung function could potentially be restored with exogenous surfactant therapy, but clinical trials with natural derived or synthetic surfactants have so far been disappointing. These negative results may be explained by variability in surfactant biology, inactivation and/or dosage of drug. Synthetic surfactant CHF5633, containing analogues of SP-B and SP-C may be effective against inactivation in ARDS. In this study, the aim was to compare treatment effects of CHF5633 and animal-derived surfactant poractant alfa from biochemical and histopathological view in experimental model of ARDS. ARDS was induced in adult New Zealand white rabbits by intratracheal instillation of hydrochloric acid (pH 1.25, 4 mL/kg) followed by injurious ventilation (V_T 20 mL/kg) until respiratory failure (P/F ratio ≤ 10 kPa or 100 mm/Hg). The animals were treated with an intratracheal bolus of 2.5 mL/kg of CHF5633 or Poractant alfa (both surfactants containing 80 mg phospholipids/mL), or air as control. The animals were subsequently ventilated (V_T 6 mL/kg body weight) for an additional 4 h and were monitored regularly. *Post mortem*, histopathological appearance of the lungs, degree of lung oedema and levels of the cytokines TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 in bronchoalveolar lavage fluid were evaluated. Both surfactant preparations improved lung function, improved the deteriorative changes to the ARDS lung architecture, reduced the levels of pro-inflammatory cytokines, and degree of lung oedema to very similar degrees compared to controls. This study indicates that treatment of severe experimental ARDS with single dose of CHF5633 improves histopathological changes and attenuates inflammation in lung parenchyma.

Keywords: Acute respiratory distress syndrome (ARDS), Synthetic pulmonary surfactant, CHF5633, Inflammation, Histopathological analysis

Úvod

Syndróm akútnej respiračnej tiesne (acute respiratory distress syndrome, ARDS) predstavuje vážnu život ohrozujúcu situáciu, ktorá postihuje všetky vekové skupiny vrátane novorodencov; s mortalitou u detí 20-30% a u dospelých až 40% [1]. Iniciálne poškodenie pľúcneho tkaniva, napr. v dôsledku pneumónie, aspirácie žalúdočného obsahu, sepsy atď., vedie k narušeniu alveolo-kapilárnej bariéry, k apoptóze až nekróze alveolárnych epitelových buniek I. a II. typu a rozvoju alveolárneho edému spojeného s poklesom prevzdušnenia pľúcneho tkaniva [2]. Dôležitým aspektom patogenézy ARDS je migrácia neutrofilov do pľúc. Aktivované neutrofily uvoľňujú do

okolía toxické mediátory, proteázy, reaktívne formy kyslíka a dusíka a pro-zápalové cytokíny, čím prispievajú k ďalšiemu poškodzovaniu alveolo-kapilárnej membrány [3]. To vedie k inaktivácii pľúcneho surfaktantu, zmene ventilačno-perfúzných vzťahov a difúznej zápalovej reakcii, čo negatívne ovplyvňuje pľúcne funkcie a spôsobuje hypoxémiu [4]. Aj napriek pribúdajúcim znalostiam o ARDS je liečba tohto ochorenia iba podporná: protektívna mechanická ventilácia, pronačné polohovanie pacienta a snaha minimalizovať iatrogénne poškodenie pľúcneho parenchýmu [5]. Použitie exogénnych surfaktantov sa preto môže zdať ako účinná doplnková terapia, ktorá zvyšuje pľúcnu poddajnosť a zmierňuje zápal a edém v pľúcach [6]. Výsledky klinických štúdií, v ktorých sa testovala účinnosť surfaktantovej terapie pri ARDS, však boli protichodné. Môže to súvisieť s heterogénnosťou zloženia použitých surfaktantov, a teda ich rôznou biofyzikálnou aktivitou, ako aj s náchylnosťou k inaktivácii a s aplikovanou dávkou [7]. CHF5633 je plne syntetický surfaktant pozostávajúci z dipalmitoylfosfatidylcholínu a palmitoyl-oleoyl-fosfatidylglycerolu a peptidových analógov ľudských surfaktantových proteínov SP-B a SP-C [8]. Testovanie CHF5633 v experimentálnych [9, 10] aj klinických štúdiách [11, 12] vykázalo podobnú účinnosť a bezpečnosť ako Poractant alfa u predčasne narodených novorodencov so syndrómom respiračnej tiesne (RDS).

Na základe týchto výsledkov sme predpokladali, že CHF5633 bude účinný aj pri liečbe ARDS. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať zápalové a histopatologické zmeny pľúcneho parenchýmu a zhodnotiť terapeutický efekt syntetického surfaktantu CHF5633 v porovnaní s Poractantom alfa, surfaktantom živočíšneho pôvodu, v experimentálnom modeli ARDS. Priaznivé výsledky tejto štúdie môžu predstavovať predklinický podklad pre možné použitie syntetických surfaktantov aj u pacientov s ARDS.

Materiál a metodika

Experimentálny model ARDS

V štúdií schválenej Etickou komisiou JLF UK v Martine bolo použitých 21 dospelých novozélandských bielych králikov s hmotnosťou $2,2 \pm 0,3$ kg. Experimentálny postup na zvieratách bol v súlade s našou predchádzajúcou štúdiou [13]. Poškodenie pľúc, definované ako pomer parciálneho tlaku arteriálneho kyslíka k tlaku inšpirovaného kyslíka $P/F \leq 10$ kPa, bolo vyvolané dvojjitým inzultom: aspiráciou kyseliny chlorovodíkovej (HCl; pH 1,25; 4 mL/kg) a vysoko-objemovou ventiláciou spôsobujúcou ventilátorom indukované poškodenie pľúc (V_T 20 mL/kg, ZEEP) [14]. Následne boli zvieratá náhodne rozdelené do skupín na: neliečenú kontrolnú skupinu (Control, $n=7$) a skupiny so surfaktantovou terapiou (Poractant alfa a CHF5633, každá $n=7$). Modifikovaný prasací surfaktant Poractant alfa (Curosurf®) a syntetický CHF5633 (oba surfaktanty poskytl Chiesi Farmaceutici) boli podávané ako bolusová terapia (2,5 mL/kg, 200 mg fosfolipidov /kg) do priedušnice nad karinou. Následne boli zvieratá ventilované ďalšie 4 h (V_T 6 mL/kg, PEEP 5 cm H₂O, frekvencia ventilácie 30/min, FiO₂ 1.0).

Post mortem analýzy

Po usmrtení zvieraťa bola vykonaná bronchoalveolárna laváž (BAL) ľavých pľúc fyziologickým roztokom (2x 10 mL/kg) a odobraté natívne vzorky pravých pľúc na stanovenie stupňa pľúcneho edému a formalínovú fixáciu pre následnú histopatologickú analýzu. Hladiny cytokínov TNF α , IL-1 β , IL-6 a IL-8 boli stanovené v BAL pomocou špecifických ELISA kitov (Cloud-Clone). Formalínom fixované vzorky pľúc boli zaliate do parafínu, narezané a zafarbené hematoxylínom a eozínom.

Kvantitatívna morfometrická analýza prítomnosti neutrofilovej infiltrácie, intersticiálnej kongescie, pohárikovitých buniek, hyalínových membrán a celkového histologického skóre poškodenia pľúc bola vykonaná naslepo použitím skórovacieho systému [15]. Miera pľúcneho edému bola hodnotená ako pomer mokrej hmotnosti pľúc k suchej (wet/dry ratio, W/D).

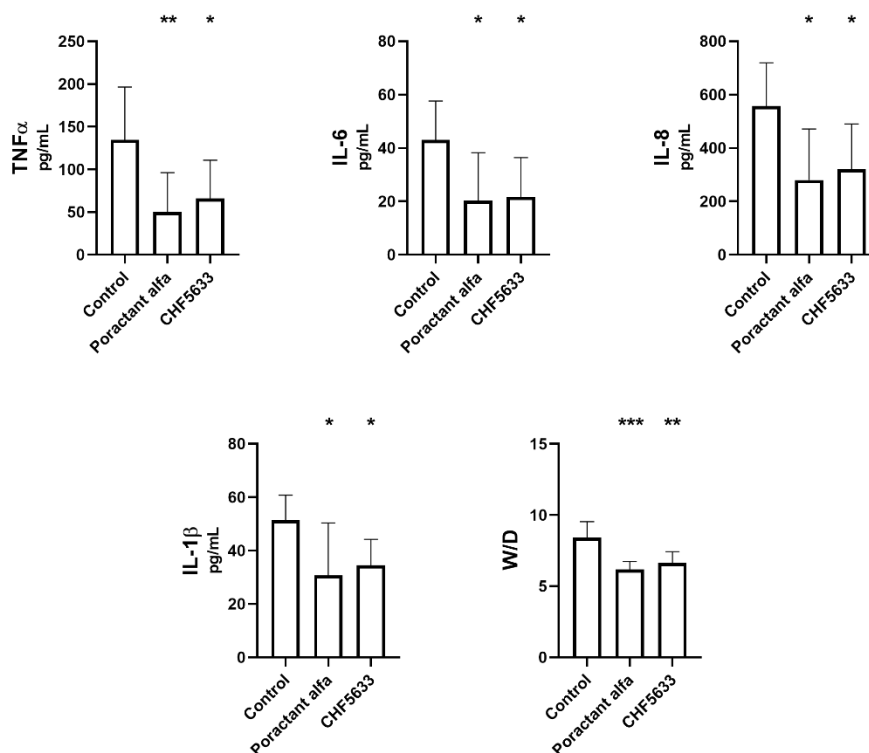
Dáta boli analyzované pomocou štatistického programu GraphPad Prism 8 (USA). Normálna distribúcia dát bola overená pomocou Shapiro-Wilkovým testom a rozdiely medzi jednotlivými skupinami boli testované pomocou jednocestnej ANOVY. Hodnota $p < 0,05$ predstavovala hranicu štatistickej významnosti.

Výsledky

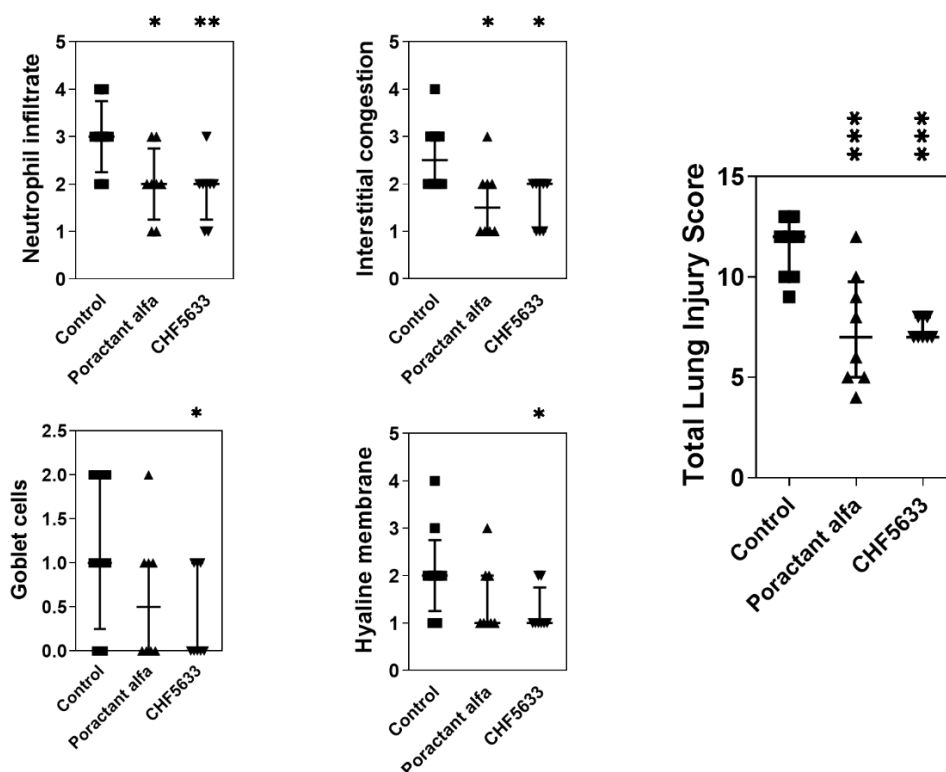
Podanie oboch surfaktantových preparátov viedlo k signifikantnému zníženiu hladín sledovaných pro-zápalových cytokínov v BAL tekutine, $p < 0,05$ pre všetko okrem $\text{TNF}\alpha$, kde pre Poractant alfa vs. kontrolná skupina $p < 0,01$ (Fig. 1). Tvorba pľúcneho edému (pomer W/D) sa signifikantne znížila po liečbe oboma surfaktantami: pre Poractant alfa $p = 0,0003$, CHF5633 $p = 0,0021$ vs. kontroly (Fig. 1).

Terapia oboma surfaktantami zmiernila poškodenie pľúc, výrazne znížila celkové histologické skóre poškodenia pľúc: pre Poractant alfa aj CHF5633 $p = 0,0009$ vs. kontrolná neliečená skupina (Fig 2) a znížilo sa skóre neutrofilovej infiltrácie a intersticiálnej kongescie. CHF5633 výrazne znížil aj prítomnosť pohárikovitých buniek ($p = 0,0471$) a hyalínových membrán ($p = 0,0332$) v porovnaní s kontrolou (Fig. 2).

Surfaktantové terapie Poractantom alfa aj CHF5633 zlepšili architektúru pľúcneho tkaniva a zmiernili akútne zápalové procesy charakteristické pre ARDS (Fig. 3)



Obr. 1 Zápalové interleukíny a tvorba pľúcneho edému. Koncentrácia pro-zápalových cytokínov $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 a IL-8 (všetko v pg/mL) v bronchoalveolárnej lavážnej tekutine a stanovenie stupňa pľúcneho edému (wet/dry ratio, W/D) v neliečenej kontrolnej skupine (Control) a skupinách liečených surfaktantom (Poractant alfa alebo CHF5633). Dáta sú prezentované ako priemer \pm SD. Štatistické porovnanie: Poractant alfa a CHF5633 vs. Control * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

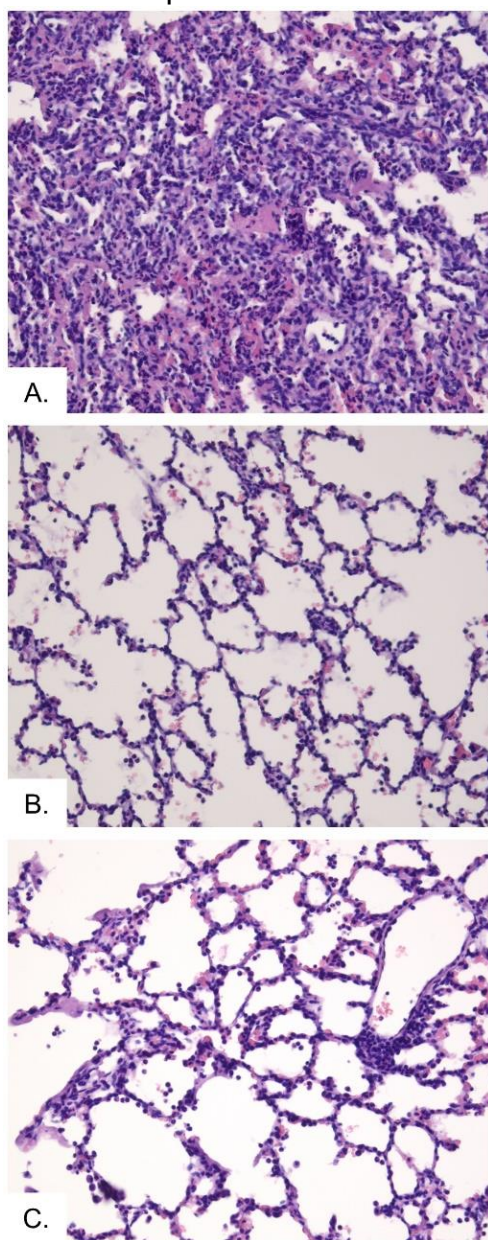


Obr. 2 Histopatologická analýza. Histopatologické skóre prítomnosti neutrofilovej infiltrácie, intersticiálnej kongescie, pohárikovitých buniek, hyalínových membrán a celkové histologické skóre poškodenia pľúc v neliečenej kontrolnej skupine (Control) a skupinách liečených surfaktantom (Poractant alfa alebo CHF5633). Dáta sú prezentované ako medián \pm medzikvartilový rozsah. Štatistické porovnanie: Poractant alfa a CHF5633 vs. Control * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001

Diskusia

Syndróm akútnej respiračnej tiesne (ARDS) je spojený s difúznym poškodením alveolárneho epitelu a zápalovou reakciou, čo má za následok zvýšenú priepustnosť alveolo-kapilárnej membrány a tvorbu pľúcneho edému, čo vedie až k hypoxii [16]. V prítomnosti zápalových mediátorov a plazmatických proteínov v alveolách môže dochádzať k dysfunkcii surfaktantu a k respiračnému zlyhaniu [17, 18]. Základom liečby ARDS sú podporné terapie, ktorých cieľom je zlepšenie oxygenácie a minimalizácia iatrogénneho poškodenia pľúc [19]. V uplynulých rokoch sa uskutočnilo niekoľko randomizovaných klinických [7, 20, 21] a predklinických štúdií [4, 14, 22], kde sa exogénny surfaktant použil ako liečba ARDS, no bez výraznejších terapeutických benefitov hlavne u pacientov. Medzi možnými dôvodmi zlyhania surfaktantovej liečby u pacientov s ARDS sú rozdiely v zložení exogénnych surfaktantov, spôsoboch podávania a tiež variabilita surfaktantovej biológie v populácii [20]. V tejto štúdií sme použili klinicky relevantný experimentálny model ARDS založený na aspirácii HCl a škodlivej ventilácii. Po vytvorení modelu ochorenia sme podobne ako iní autori [7, 13, 22] pozorovali zhoršenie respiračných parametrov a významnú lokálnu zápalovú reakciu s masívnym prílevom leukocytov, hlavne granulocytov do pľúc. Tento nález potvrdila aj histopatologická analýza, kde sa v alveolách a interstíciu potvrdila prítomnosť infiltrátov neutrofilov a makrofágov (Fig. 3). Aktivácia migrovaných leukocytov je spojená so zvýšenou produkciou pro-zápalových cytokínov [23, 24]. Zápalový proces a nadmerná tvorba pro-zápalových látok prispievajú k difúznemu poškodeniu alveol a endotelu pľúcnych kapilár, čo vedie k tvorbe pľúcneho edému [25].

Oba surfaktantové preparáty, Poractant alfa a CHF5633, utlmili zápalové procesy v pľúcach. Pozorovali sme znížené skóre poškodenia pľúc, neutrofilovej infiltrácie a intersticiálnej kongescie a znížené hladiny sledovaných cytokínov. To mohlo viesť aj k menšej tvorbe pľúcneho edému po terapii exogénnymi surfaktantami v porovnaní s neliečenou kontrolnou skupinou (Fig. 1, 2). V súlade s naším pozorovaním sú aj predtým publikované štúdie [4, 14]. Z dôvodu heterogénnej patofyziológie ARDS by bolo veľkou výhodou, keby surfaktanty používané na liečbu ARDS boli schopné odolávať inaktivácii rôznymi látkami prítomným v alveolách, vrátane plazmatických proteínov prítomných v edémovej tekutine či pro-zápalových mediátorov. Odolnosť exogénneho surfaktantu voči inaktivácii môže závisieť aj od prítomnosti hydrofóbných surfaktantových proteínov SP-B a SP-C (alebo ich analógov), ktoré významne zlepšujú funkciu surfaktantu [8, 26]. Bežne používané exogénne surfaktanty pochádzajúce zo zvierat tieto proteíny prirodzene obsahujú [27]. Syntetický surfaktant CHF5633 obsahuje ich ľudské analógy, 1,5% SP-C a 0,2% SP-B, vďaka čomu preukázal vyššiu rezistenciu proti inaktivácii albumínom ako prasací surfaktant Poractant alfa [28, 29].



Obr. 3 Histopatologické pozorovanie. Kvalitatívna histopatologická analýza 200x zväčšených rezov neliečenej kontrolnej skupiny (A.) a skupín liečených surfaktantom: Poractant alfa (B.) a CHF5633 (C.). V kontrolnej skupine bolo pozorované pľúcne tkanivo s čiastočne narušenou architektúrou, skolabovanými alveolami a zmiešaným zápalovým infiltrátom. V alveolárnych priestoroch boli prítomné polynukleáry, plazmatické bunky s mierne aktivovanými pneumocytmí a početnými voľnými erytrocytmí. Na alveolárny povrch miestami nasadali mohutnejšie hyalínne membrány a proteínový detritus (A.). V skupine liečenej Poractantom alfa boli prítomné mierne zhrubnuté alveolárne septá s riedkym chronickým zápalovým infiltrátom a nasadajúcimi nenápadnými hyalínovými membránami. Alveolárne priestory boli vzdušné s malým zachytom proteínového detritu a prítomnosťou ojedinelých neutrofilov, plazmocytov a erytrocytov. V peribronchiálnom priestore v okolí terminálnych bronchov boli prítomné nenápadné lymfocytárne agregáty (B.). Skupina liečená syntetickým surfaktantom CHF5633 vykazovala mierne zhrubnuté alveolárne septá s riedkym zápalovým infiltrátom a s formujúcimi sa nenápadnými hyalínovými membránami. Alveolárne priestory boli vzdušné s nenápadným proteínovým detritom, ojedinelými neutrofilmi, plazmocytmi a skupinami nepočetných erytrocytov. V peribronchiálnom priestore v okolí terminálnych bronchov neboli zachytené lymfocytárne agregáty (C.)

Záver

Použitie syntetického surfaktantu môže predstavovať plnohodnotnú alternatívu k surfaktantovým preparátom pochádzajúcich zo zvierat. Potvrdzujú to aj výsledky z tejto štúdie, kde sme v experimentálnom modeli ARDS porovnávali efekt syntetického a prasacieho surfaktantu. Použitie syntetického surfaktantu CHF5633 zmiernilo zápalové procesy, prispelo k zlepšeniu architektúry pľúcneho parenchýmu a znížilo tvorbu pľúcneho edému porovnateľne s prasacím surfaktantom Poractant alfa. Tieto výsledky naznačujú výhody a možné perspektívy budúceho použitia syntetických surfaktantov aj v liečbe pacientov s ARDS.

Práca bola podporená projektami VEGA 1/0004/21, APVV-15-0075. Surfaktanty Poractant alfa a CHF5633 použité v tejto štúdii poskytla spoločnosť Chiesi Farmaceutici S.p.A, Parma, Taliansko.

Literatúra

- [1] De Luca, *Lancet Respir Med.* **2019**, 7:100–101.
- [2] Fanelli, *J Thorac Dis.* **2013**, 5:326–334.
- [3] Matthay and Zemans, *Annu Rev Pathol.* **2011**, 6:147–163.
- [4] Mikolka, *Physiol Rep.* **2021**, 9:e14700
- [5] Silva, *Expert Opin Investig Drugs.* **2020**, 29:49–61.
- [6] Davidson, *Crit Care.* **2006**, 10:R41.
- [7] Meng, *J Cardiothorac Vasc Anesth.* **2012**, 26:849–856.
- [8] Johansson and Curstedt, *J Intern Med.* **2019**, 285:165–186.
- [9] Ricci, *Pediatr Res.* **2017**, 81:369–375.
- [10] Rey-Santano, *Pediatr Pulm.* **2017**, 52:929–938.
- [11] Ramanathan, *J Pediatr.* **2020**, S0022–3476:30725–30733.
- [12] Sweet, *J Matern Fetal Neonatal Med.* **2020**, 20:1–5.
- [13] Mikolka, *Physiol Res.* **2019**, 68:S253–S263.
- [14] Zebialowicz Ahlstrom, *Respir Res.* **2019**, 20:245.
- [15] Hoegl, *Physiol Rep.* **2018**, 6:e13648.
- [16] Villar, *Curr Opin Crit Care.* **2014**, 20:3–9.
- [17] Krafft, *Soft Matter.* **2015**, 11:5982–5994.
- [18] Seeds *Am J Med Sci.* **2012**, 343:446–451.
- [19] Griffiths, *BMJ Open Respir Res.* **2019**, 6:e000420.
- [20] Dushianthan, *Crit Care.* **2012**, 16:238.
- [21] Ardell, *Cochrane Database Syst Rev.* **2015**, 8:CD000144.
- [22] Kopincova, *Life Sci.* **2018**, 203:121–128.
- [23] Kalk, *Can J Physiol Pharmacol.* **2008**, 86:511–515.
- [24] Kamiyama, *BMC Anesthesiol.* **2015**, 15:73
- [25] Cutts, *Ann R Coll Surg Engl.* **2017**, 99:12–16.
- [26] Schurch, *Biophys J.* **2010**, 99:3290–3299.
- [27] Walsh, *Respir Care.* **2013**, 58:367–375.
- [28] Ricci, *Pediatr Res.* **2017**, 81:369–375.
- [29] Seehase, *PLoS One.* **2012**, 7:e47631.

Expresia β III-tubulínu a survivínu v súvislosti s rezistenciou na cytostatickú liečbu v chemicky indukovanom karcinóme mliečnej žľazy potkana

Pastornická, A.¹, Rybárová, S.¹, Hodorová, I.¹, Mihalik, J.¹

¹ Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav anatómie, Košice
alena.pastornicka@student.upjs.sk

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of paclitaxel (PTX) and doxorubicin (DOX) therapy on the β III-tubulin and survivin expression in chemically-induced rat mammary tumors. Animals were randomly divided into treatment groups and the control group (untreated group). Animals were treated with PTX, in the first phase of the experiment, while in the second phase, DOX was used. Total proportion of tumors, proportion of carcinoma *in situ* (CIS) and invasive carcinoma (IC) were evaluated. Protein expression in tumor tissue was determined by IHC. The expression of proteins increased significantly after treatment with both cytostatics (PTX and DOX). Depending on the type of tumor, a significant increase was observed in IC samples after PTX treatment, and in CIS samples after DOX treatment. The results suggest that β III-tubulin and survivin may be a significant drug resistance markers and clinical regulation of its activity may be an effective means of reversing this resistance.

Keywords: β III-tubulin, Breast cancer, Doxorubicin, Paclitaxel, Survivin, Resistance

Úvod

Taxány (paklitaxel a docetaxel), spolu s antracyklínmi (doxorubicín) sú štandardnou súčasťou liečby včasného aj pokročilého karcinómu prsníka. Rezistencia na spomínané chemoterapeutiká je primárnou prekážkou účinnej liečby. Mnoho štúdií to pripisuje nadmernej expresii špecifických β -tubulínových izotypov. β III-tubulín je normálne exprimovaný vo vysokých hladinách v bunkách neurónového pôvodu, ale príležitostne bol nájdený aj v niekoľkých extraneurónových tkanivách [1]. Vo všeobecnosti má rozhodujúcu úlohu v bunkovom cykle, proliferácii buniek, diferenciácii a tumorigenéze vďaka svojej jedinečnej depolymerizačnej aktivite mikrotubulov. Navyše, môže riadiť bunkový cyklus a tým meniť proliferáciu buniek, diferenciáciu a iné biologické správanie [2]. Nadmerne exprimovaný je pri mnohých agresívnych a metastatických nádoroch, preto by mohol slúžiť ako prognostický marker v určitých typoch nádorových ochorení. Rovnaký potenciál má aj survivín, ktorý má dvojitú funkciu. Pôsobí ako supresor apoptózy a tiež plní dôležitú úlohu pri proliferácii buniek. Dysfunkcia survivínu vedie k defektom bunkového cyklu, vrátane narušenia cytokinézy, dysregulácie centrozómu a tvorby viacjadrových buniek [3]. Okrem toho má dôležitú úlohu aj v procese angiogenézy, čo bolo dokázané *in vitro*. Význam spočíva v jeho schopnosti ochraňovať endotelové bunky pred apoptózou. Prostredníctvom tejto ochrany novovytvorených krvných ciev môže nepriamo podporovať rast nádoru [4]. Jeho vysoká expresia bola potvrdená v mnohých typoch zhubných buniek kde sa akumuluje a lokalizuje v cytoplazme, jadre aj v mitochondriách. Jeho prítomnosť v extracelulárnom prostredí môže zvyšovať agresivitu nádoru a znižovať alebo inhibovať účinnosť liečby [5].

Materiál a metódy

Počas experimentu bolo použitých 44 ks samíc potkanov línie Sprague-Dawley (SD) vo veku 5 týždňov. Mamárna karcinogenéza bola indukovaná prostredníctvom DMBA (D3254 Sigma – Aldrich, Nemecko), podávaným priamo do žalúdka sondou v celkovej dávke 30 mg, rozdelenej na tri dávky. Zvieratá boli náhodne rozdelené do liečenej a do neliečenej (kontrolnej) skupiny. V prvej fáze experimentu bol k liečbe použitý PTX, v druhej fáze DOX. Obe cytostatiká boli podávané i.p. v 6 dávkach (5mg/kg). Prvá dávka bola aplikovaná v deň objavenia prvého nádoru, ďalšie dávky každé 3-4 dni. V kontrolnej skupine boli cytostatiká substituované fyziologickým roztokom. Štyri dni po podaní poslednej dávky boli zvieratá usmrtené predávkovaním anestetika (Zoletil inj.) letálnou dávkou 10 mg/kg. Rezy získaných karcinómov boli ofarbené základnou histologickou farbiacou metódou hematoxylín & eozín (H&E), a následne klasifikované podľa kritérií pre klasifikáciu mamárnych nádorov u potkanov a rozčlenené na karcinómy in situ (CIS) a invazívne karcinómy (IC). Pre detekciu expresie proteínov v nádorových tkanivách bolo použité IHC farbenie za využitia primárnej polyklónovej protilátky (β III-tubulin polyclonal antibody - BIOS Antibodies, USA) a monoklónovej protilátky (survivin monoclonal antibody, clone 12C4, Dako). Pre výpočet štatistickej významnosti bol využívaný „Pearsonov chi – kvadrát“ (χ^2) test.

Výsledky

Imunohistochemická analýza β III-tubulínu preukázala významne zvýšenie jeho expresie vo vzorkách karcinómov po podaní PTX ($p < 0,05$; 83,7% vs. 53,8%) a tiež po podaní DOX ($p < 0,05$; 94,1% vs. 48,3%) v porovnaní s kontrolami (Tabuľka 2). Významné zvýšenie expresie bolo pozorované aj v prípade IC po ošetrení PTX ($p < 0,05$; 88% vs. 20%) a v prípade CIS po ošetrení DOX ($p < 0,05$; 96% vs. 44,4%).

Tab. 1 Expresia β III-tubulínu a survivínu v nádoroch mliečnej žľazy neliečených zvierat a zvierat liečených PTX a DOX, * $p < 0,05$

	βIII-TUBULÍN				SURVIVÍN			
	PTX		DOX		PTX		DOX	
	Negat.	Pozit. (%)	Negat.	Pozit. (%)	Negat.	Pozit. (%)	Negat.	Pozit. (%)
	0/1+	2+/3+	0/1+	2+/3+	0/1+	2+/3+	0/1+	2+/3+
Neliečená skupina								
IC (n = 16)	4	1 (20,0)	5	6 (54,5)	4	1 (20,0)	4	7 (63,6)
CIS (n = 26)	2	6 (75,0)	10	8 (44,4)	5	3 (37,5)	11	7 (38,9)
Liečená skupina								
IC (n = 34)	3	22 (88,0)*	1	8 (88,9)	6	19 (76,0)*	1	8 (88,9)
CIS (n = 49)	5	19 (79,2)	1	24 (96,0)*	10	14 (58,3)	2	23 (92,0)*

Rovnako ako v prípade β III-tubulínu, aj expresia survivínu sa významne zvýšila po podaní oboch cytostatík (Tabuľka 2), či už PTX ($p < 0,05$; 67,3% vs. 30,8%) alebo DOX ($p < 0,05$; 91,2% vs. 48,3%). Štatistická analýza tiež potvrdila významný rozdiel v expresii survivínu v IC medzi PTX liečenými vzorkami a vzorkami neliečenými ($p < 0,05$; 76% vs. 20%) a vo vzorkách CIS liečených DOX v porovnaní s kontrolou ($p < 0,05$; 92% vs. 38,9%). Podrobnejšie výsledky sumarizuje Tabuľka 1.

Tab. 2: Celková expresia proteínov v nádoroch mliečnej žľazy neliečených zvierat (NS) a zvierat liečených (LS) PTX a DOX

	PTX			DOX		
	n	Pozit. n (%)	<i>p</i> hodnota*	n	Pozit. n (%)	<i>p</i> hodnota*
βIII-tubulín						
NS	13	7 (53,8)	<i>p</i> <0,05	29	14 (48,3)	<i>p</i> <0,05
LS	49	41 (83,7)		34	32 (94,1)	
Survivín						
NS	13	4 (30,8)	<i>p</i> <0,05	29	14 (48,3)	<i>p</i> <0,05
LS	49	33 (67,3)		34	31 (91,2)	

Diskusia

Expresia βIII-tubulínu mení vlastnosti endogénnych mikrotubulov v nádorových bunkách. Tieto zmeny spôsobujú zníženú citlivosť väzby medzi dimérom liečiva a βIII-tubulínom. Jeho vysoká expresia znižuje rýchlosť polymerizácie mikrotubulov čo je vlastnosť, ktorá by mohla zodpovedať za rezistenciu na taxány [6]. Naša práca preukázala, že βIII-tubulín je nadmerne exprimovaný v karcinóme mliečnej žľazy po liečbe PTX aj DOX (*p*<0,05). Významný rozdiel v expresii sme preukázali aj v prípade IC po liečbe PTX a tiež v prípade CIS po liečbe DOX (*p*<0,05) v porovnaní s kontrolnými skupinami. Tieto výsledky nie sú v súlade so štúdiou Yuan a kol. [7], ktorí pozorovali len 38,1% pozitívnych prípadov (32/84) po liečbe. Naproti tomu Im a kol. [8] preukázali 60,7% (111/183) pozitívnych prípadov, avšak strata expresie βIII-tubulínu súvisela s agresívnym správaním nádorového tkaniva, ktoré bolo ovplyvnené chemoterapiou obsahujúcou taxány. Výsledkom analýzy autorov Wang a kol. [9] bolo v súlade s našimi výsledkami, zvýšenie expresie βIII-tubulínu po liečbe doxorubicínom. Vysoká expresia však významne korelovala s vyššou pravdepodobnosťou dosiahnutia dobrej odpovede na chemoterapiu. Naopak Xiang a kol. [6] pozorovali celkovú mieru odpovede na liečbu 31,8% v skupine s vysokou expresiou, zatiaľ čo v skupine s nízkou expresiou βIII-tubulínu až 84,6%. Všetkých 8 pacientov s úplnou remisiou patrilo do skupiny, v ktorej bola preukázaná nízka expresia βIII-tubulínu. Na základe týchto výsledkov autori považujú βIII-tubulín za vhodný prediktor chemosenzitivity taxánov a tiež predpokladajú, že zmeny v hladinách expresie počas chemoterapie môžu byť účinné pri rezistencii. Ako už bolo uvedené vyššie, naše výsledky získané v tejto práci poukazujú na to, že βIII-tubulín je po cytostatickej liečbe v nádorovom tkanive nadmerne exprimovaný. Rovnaký výsledok sme pozorovali aj v prípade expresie survivínu. Jeho potenciálnej úlohe pri vzniku rezistencie nádorových buniek karcinómu prsníka na liečbu PTX sa venovalo viacero štúdií. Príkladom je práca zameraná na rýchlosť inhibície rastu MCF-7 po podaní PTX [10], ktorá stúpala v závislosti od koncentrácie a času. Výsledky naznačujú, že nádorové bunky sa môžu vyhnúť zastaveniu bunkového cyklu a apoptóze indukovanej paklitaxelom, práve zvýšením hladiny survivínu v počiatočnom štádiu liečby. Kreger a kol. [11] na základe svojej štúdie na bunkovej línii MDA-MB-231 predpokladajú, že lieky, ktoré narúšajú normálnu dynamiku mikrotubulov podporujú tvorbu exozómov jedinečne obohatených o survivín. Tie sa potom môžu preniesť do iných nádorových alebo normálnych buniek, ktoré tvoria mikroprostredie nádoru a tak podporujú ich prežitie. Po štatistickom zhodnotení výsledkov v našej práci, bola v kategórii IC liečenej skupiny pozorovaná signifikantne vyššia expresia survivínu oproti kontrolnej skupine (*p* < 0,05). V kategórii CIS bola taktiež pozorovaná zvýšená expresia, išlo však o rozdiel bez štatistickej významnosti (*p* > 0,05). Štatisticky významný je aj celkový rozdiel medzi neliečenou skupinou a skupinou liečenou PTX (*p* < 0,05). Z týchto výsledkov je možné dedukovať, že zvýšenie expresie survivínu je odpoveďou na liečbu PTX. Získaná

chemorezistencia je prekážkou aj pri liečbe doxorubicínom. Chang a kol. [12] skúmali expresiu survivínu v prípadoch cholangiokarcinómu. Pozitívna imunoreakcia bola pozorovaná v 24/33 (72,7%). Spomínaní autori použili aj bunkovú líniu QBC939, kde pozorovali vyššiu expresiu survivínu indukovanú doxorubicínom. K rozdielnemu výsledku sa dopracovali Nestal de Moraes a kol. [13], ktorí pozorovali zníženie hladiny survivínu v bunkových líniiach MCF-7 a MDA-MB-231 po expozícii doxorubicínom. Zároveň nepozorovali žiaden vplyv na citlivosť buniek voči DOX po inhibícii survivínu. Naopak v bunkovej línii osteosarkómu MG63 Zhang a kol. [14] preukázali zvyšovanie expresie survivínu v bunkách, ktoré boli rezistentné na DOX. Zároveň zistili, že kombinovaná liečba inhibítorom survivínu YM155 a DOX významne inhibovala bunkovú proliferáciu indukovaním apoptózy.

Záver

Záverom môžeme konštatovať, že sme zistili významné rozdiely v expresii survivínu v karcinóme *in situ* pred a po liečbe DOX a tiež pri celkovom porovnaní karcinómov liečenej a neliečenej skupiny ($p < 0,05$). Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že β III-tubulín a survivín môžu predstavovať významný marker vzniknutej rezistencie na lieky a klinická regulácia ich aktivity môže byť účinným prostriedkom ako túto rezistenciu zvrátiť. Zároveň je potrebné zvážiť aj ich potencionálnu úlohu ako prediktívnych markerov v určitých typoch karcinómov prsníka.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0173/19.

Literatúra

- [1] Person, *Tumour Biol.* **2017**, 39(10):1010428317712166.
- [2] Mariani, *Gene.* **2015**, 563(2):109–14.
- [3] Shojaei, *Eur J Cancer Prev.* **2019**, 28(4):365–372.
- [4] Mahmoudian-Sani, *Pathol Res Pract.* **2019**, 215(4):619–625.
- [5] Khan, *Biologics.* **2015**, 9:57–67.
- [6] Xiang, *Clin Exp Med.* **2016**, 16(3):391–7.
- [7] Yuan, *Asian Pac J Cancer Prev.* **2012**, 13(1):361–5.
- [8] Im, *Korean J Pathol.* **2013**, 47(6):534–40.
- [9] Wang, *Clin Breast Cancer.* **2013**, 13(2):103–8.
- [10] Xiong, *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* **2007**, 27(1):65–7.
- [11] Kreger, *Cancers (Basel).* **2016**, 8(12):111.
- [12] Chang, *World J Gastroenterol.* **2004**, 10(3):415–8.
- [13] Nestal de Moraes, *Eur J Cell Biol.* **2013**, 92(8-9):247–56.
- [14] Zhang, *Int J Clin Exp Med.* **2015**, 8(10):18032–40.

Vplyv *Rhus coriaria* L. na posttranslačné modifikácie histónov v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy *in vivo*

Koklesová, L.¹, Samec, M.¹, Líšková, A.¹, Výbohová, D.², Péč, M.³, Adamkov, M.⁴, Kubatka, P.³

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
koklesova5@uniba.sk; peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

Diet rich in various phytochemicals exerts anti-cancer and/or preventive properties in different cancer types. Therefore, in this study, we focused on the evaluation of potential chemopreventive and anti-cancer effects of *Rhus coriaria* L. (sumac) on posttranslational modifications of histones in a chemically-induced rat model of mammary carcinoma. Chemoprevention by sumac was achieved by dietary administration in two groups at concentration of 0.1 % and 1 %. Chemoprevention was not administered in the control group. The evaluation of histone modifications in rat tumor cells *in vivo* revealed significant decrease in lysine methylation status of H3K4me3 and H3K9me3 after administration of both lower and higher doses of sumac. Moreover, dose-dependent increase in lysine acetylation status of H4K16ac was observed; however, the methylation status of H4K20me3 was not changed. Our data demonstrated that sumac exerts chemopreventive and anti-cancer effects mediated by epigenetic alterations, including posttranslational histone modifications, in rat mammary carcinoma cells *in vivo*.

Keywords: histone modifications, sumac, mammary carcinoma, chemoprevention

Úvod

Mamárny karcinóm prsných žliaz predstavuje u žien celosvetový zdravotnícky problém, pretože aj napriek pokrokom v diagnostike je mortalita tohto ochorenia stále vysoká [1]. Rastlinné funkčné potraviny bohaté na fytochemikálie vykazujú chemopreventívny a protinádorový potenciál, a to prostredníctvom anti-oxidačných, protizápalových a imunomodulačných účinkov [2]. Okrem toho, fytochemikálie dokážu modifikovať epigenetické mechanizmy ako histónové modifikácie, metyláciu DNA a reguláciu expresie malých nekódujúcich miRNA, čím dochádza k regulácii rakoviny [3]. V tradičnej medicíne sa rastlina *R. coriaria* L. s vysokou anti-oxidačnou aktivitou používa už stovky rokov [4]. Táto rastlina je bohatá na fytochemikálie ako sú flavonoidy a hydrolyzovateľné taníny, predovšetkým deriváty kyseliny gallovej [5]. Mnohé *in vitro* štúdie mamárneho karcinómu preukázali, že sumak má schopnosť inhibovať proliferáciu buniek, metastázovanie a neovaskularizáciu a tiež indukovať apoptózu, autofágiu a senscenciu nádorových buniek [6-8]. Chemopreventívny a protinádorový účinok sumaku nebol doposiaľ skúmaný v modeli mamárneho karcinómu *in vivo*, a preto cieľom našej štúdie bolo sledovať histónové posttranslačné modifikácie histónov, metylácie a acetylácie, v bunkách mamárneho karcinómu samíc potkanov po dlhodobom podávaní *R. coriaria* L. v diéte.

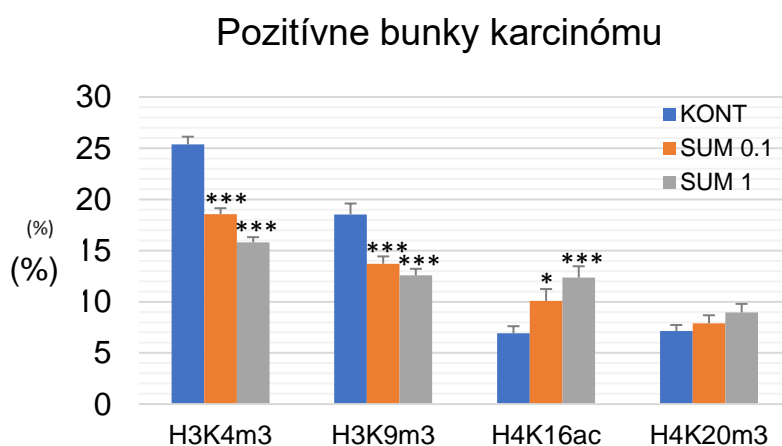
Materiál a metódy

V experimente sme použili samice potkanov Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Nemecko) vo veku 5 týždňov. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca pri teplote 23 ± 2 °C, relatívnej vlhkosti 40-60 % a umelom svetelnom režime svetlo/tma 12:12 h). Karcinogénu sme u potkanov indukovali intraperitoneálne s jednorazovou dávkou (50 mg/kg telesnej hmotnosti v 42. deň postnatálneho vývoja) N-nitroso-N-methylurey (NMU, Sigma, Deisenhofen, Nemecko). Uvedený animálny model samíc potkanov imituje premenopauzálnu obdobie žien s vysokým rizikom rozvoja rakoviny prsníka. Chemoprevencia so sumakom (*R. coriaria* L.), ktorá bola aplikovaná v diéte (Ssniff, Soest, Nemecko) začala týždeň pred podaním karcinogénu a trvala 14 týždňov. Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín: kontrolná skupina bez aplikácie fytozložky (KONT), skupina s obsahom sumaku v potrave s nižšou koncentráciou (1 g/kg) (SUM 0.1) a skupina so sumakom v potrave s vyššou koncentráciou (10 g/kg) (SUM 1). Raz týždenne boli zvieratá vážené a palpované za účelom zistenia výskytu, lokalizácie a frekvencie nádorov mliečnej žľazy. Posledný týždeň experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Odobrané nádorové tkanivo sme zafixovali formalínom a zaliali do parafínu.

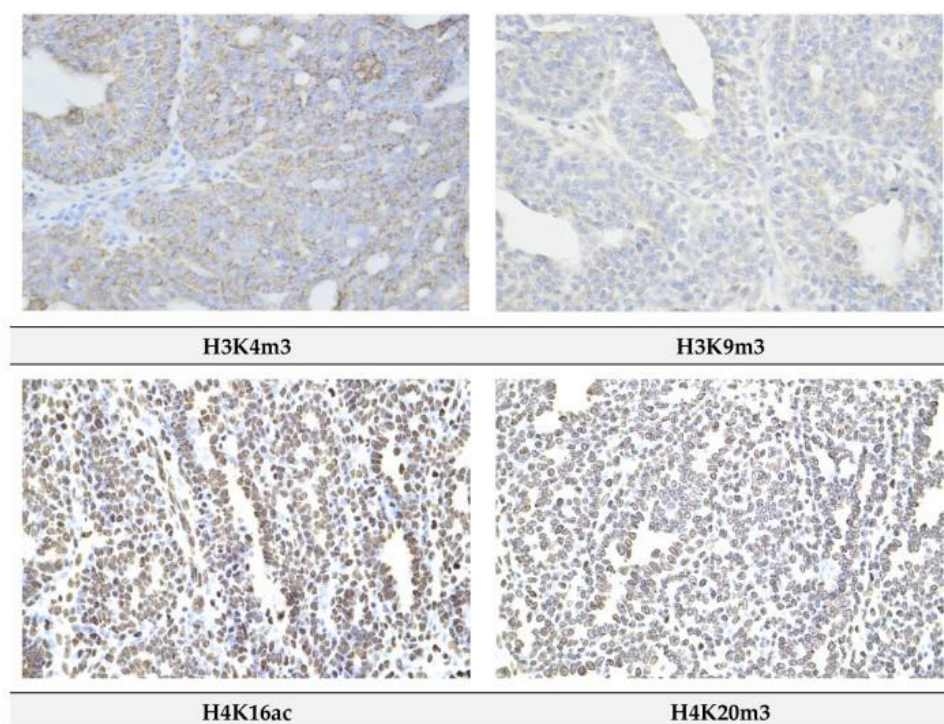
Pre imunohistochemickú analýzu sme vybrali najvýznamnejšiu časť nádoru prsníka potkana v parafínovom bloku (ktorý zahŕňa typizačné charakteristiky a najväčšie zastúpenie vitálnej epitelovej zložky nádoru, t.j. bez regresívnych zmien, ako je rozsiahla nekróza). Nepriamu imunohistochemickú metódu sme použili pre detekciu vybraných markerov pre mechanistickú štúdiu na celých parafínových rezoch s použitím komerčne dostupných protilátok špecifických pre potkany. Imunohistochemické farbenie (Autostainer Link 48 /Hermes/) sme vykonali podľa odporúčania výrobcov a koncentrácia použitá pre každú primárnu protilátku bola nasledujúca: H3K4m3 1:500, H3K9m3 1:400, H4K20m3 1:300, H4K16ac 1:200. Primárne protilátky sme vizualizovali sekundárnym farbením (EnVision, Dual Link System-HRP, kat. č. K060911, Dako North America, Carpinteria, CA, USA) s použitím substrátu (diaminobenzidín tetrahydrochlorid). U negatívnych kontrol sme vynechali farbenie primárnymi protilátkami. Morfometrickú metódu sme použili na vyhodnotenie imunohistochemickej expresie antigénu. Digitálne obrázky sme pozorovali mikroskopicky (Olympus BX41N, Tokio, Japonsko) pri zväčšení 400x a ich morfometrická analýza bola vykonaná pomocou softvéru QuickPHOTO MICRO, verzia 3.1 (Promicra, Praha, Česká republika). Hodnoty sme porovnávali medzi ošetrovanými (SUM 0,1 a SUM 1) a neošetrovanými (KONT) vzorkami nádorových tkanív samíc potkanov, pričom sme analyzovali najmenej 60 vzoriek nádoru na jeden marker.

Výsledky

Posttranslačné chemické modifikácie histónov 3 a 4 v bunkách karcinómu prsníka potkanov ovplyvnené sumakom v nižšej dávke (SUM 0,1) preukázali pokles metylácie H3K4m3 o 27 % ($p < 0,001$) a H3K9m3 o 26 % ($p < 0,001$) a zvýšenie acetylácie H4K16ac o 46 % ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou (KONT). Vyššia dávka sumaku (SUM 1) znížila rovnaké parametre chemických modulácií H3 o 38 % a 32 % (obe hladiny $p < 0,001$) a zvýšila H4K16ac o 79 % ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolnou skupinou (KONT). Zmeny hladín metylácie H4K20m3 v liečených skupinách neboli významné v porovnaní s neošetrovanou skupinou (KONT). Zaznamenané hodnoty sú graficky znázornené na Obrázku 1. Obrázok 2 sumarizuje reprezentatívne zábery uvedených štyroch markerov posttranslačnej modifikácie histónov v nádorových bunkách mliečnej žľazy potkanov.



Obr. 1 Imunoexpresia markerov chemickej modifikácie (metylácie a acetylácie) histónov v bunkách karcinómu prsníka potkana po liečbe *R. coriaria*. Dáta sú vyjadrené ako priemer \pm SEM. Významný rozdiel: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ v porovnaní s KONT. Hodnoty proteínovej expresie sa porovnali medzi ošetrovanými (SUM 0,1 a SUM 1) a neošetrovanými (KONT) karcinómovými bunkami samíc potkanov, pričom sme analyzovali najmenej 60 obrázkov na jeden marker



Obr. 2 Reprezentatívne zábery expresie markerov chemickej modifikácie histónov (H3K4m3, H3K9m3, H4K20m3, H4K16ac) v tkanive karcinómu prsníka mliečnej žľazy

Diskusia

Celistvé rastlinné potraviny alebo fytochemikálie a ich deriváty predstavujú v klinickej praxi sľubnú stratégiu na zlepšenie účinnosti liečby u pacientov s rakovinou, na potlačenie nežiaducich reakcií vyvolaných konvenčnou terapiou a na zníženie rizika rakoviny u vysoko-rizikových osôb [9-10]. Progresívny medicínsky prístup ponúkajú analýzy zmien v posttranslačných modifikáciách histónov, ktoré sú spojené s rôznymi typmi chronických chorôb (vrátane rakoviny) a ktoré je možné použiť ako prediktívne a prognostické markery [11]. V tejto štúdii sumak v závislosti od dávky významne znížil

hladiny metylácie H3K4m3 a H3K9m3 a zvýšil hladiny acetylácie H4K16ac vo vzorkách nádorov potkanov. Na rovnakom animálnom modeli sme zistili pozitívne zmeny v modifikáciách histónov po liečbe škoricou [12], púčikmi klinčeka [13] a tymiánom [14]. Iní autori opísali zníženie metylácie H4R3me2s a H3K27me3 a zvýšenie hladín acetylácie H3K9ac a H3K27ac po liečbe resveratrolom v MCF-7 a MDA-MB-231 bunkách rakoviny prsníka [15]. Tento výsledok koreloval s cytotoxickými aktivitami a zvýšenou expresiou TSG promótoru, ako sú BRCA1, p53 a p21, po použití resveratrolu [15]. V inej *in vitro* štúdii boli u MCF-7 a MDA-MD-231 nádorových buniek rakoviny prsníka pozorované znížené hladiny histón-deacetylázy vyvolané kombinovanou liečbou sulforafánom a aferínom A. Účinky boli spojené s cytotoxickými a pro-apoptotickými účinkami a potlačením progresie bunkového cyklu [16]. Napriek tomu, že presné mechanizmy, ktorými fytochemikálie ovplyvňujú posttranslačné modifikácie histónov, nie sú úplne objasnené, početné údaje z onkologického výskumu ukazujú, že izolované fytochemikálie alebo celistvé rastlinné potraviny predstavujú perspektívny nástroj v boji proti rakovine [17]. Lepšie pochopenie posttranslačných modifikácií histónov so špecifickými dôsledkami pre štruktúru a aktivitu nukleárneho chromatinu po použití fytochemikálií obsiahnutých v potrave môže odhaliť nové molekulárne ciele v rámci progresívnych protirakovinových terapií.

Záver

Účinky fytochemikálií prítomných v rastline *R. coriaria* L. v našej štúdii mamárneho karcinómu samíc potkanov odhalili významný protinádorový a chemopreventívny účinok, a to prostredníctvom epigenetických zmien, akými sú postranslačné modifikácie histónov. Protinádorový a chemopreventívny účinok sumaku pravdepodobne spočíva v aditívnych alebo synergických účinkoch kombinácie viacerých fytochemikálií prítomných v celistvej rastline *R. coriaria* L., pretože sumak v nižšej (0,1 %) aj vyššej (1 %) koncentrácii aplikovaný v diéte dokázal znížiť metylačný status v H3K4m3 a H3K9m3 a zvýšiť acetylačný status v H4K16ac.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Integrovaná stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života, kód ITMS: 313011V446, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Azamjah, *Asian Pac J Cancer Prev.* **2019**, 20(7):2015–2020.
- [2] Chen, *Int J Mol Sci.* **2018**, 19(9):2729.
- [3] Arora, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20(18):4567.
- [4] Apak, *Pure Appl. Chem.* **2013**, 85:957–998.
- [5] Abu-Reidah, *Food Chem.* **2015**, 166:179–191.
- [6] El Hasasna, *Sci Rep.* **2015**, 5:13013.
- [7] Ghorbani, *IET Nanobiotechnol.* **2018**, 12(5):600–603.
- [8] Mirian, *Res Pharm Sci.* **2015**, 10(3):233–40.
- [9] Kessler, *Integr Cancer Ther.* **2018**, 17(4):1103–1108.
- [10] Lesinski, *Cancer Prev Res (Phila).* **2015**, 8(11):1036–44.
- [11] Romanowska a Joshi, *Genes (Basel).* **2019**, 10(2).
- [12] Kubatka, *Molecules.* **2020**, 25(6).
- [13] Kubatka, *J Cell Mol Med.* **2017**, 21:2837–51.
- [14] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20:1749.
- [15] Chatterjee, *Biofactors.* **2019**, 45(5):818–829.
- [16] Royston, *Int J Mol Sci.* **2017**, 19; 18(5).
- [17] Samec M, *Biomolecules.* **2019**, 5; 9(12).

***Rhus coriaria* L. v chemoprevencii mamárnej karcinogenézy: analýza mechanizmu účinku**

Kubatka, P.¹, Líšková, A.², Samec, M.², Koklesová, L.², Výbohová, D.³, Péč, M.¹, Kajo, K.⁴, Adamkov, M.⁵

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodníctva, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁴ Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave, Ústav patológie, Bratislava; ⁵ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

Numerous scientific reports provide evidence that whole plant foods or isolated phytochemicals may beneficially modify carcinogenesis. The aim of this study was to evaluate the antineoplastic activities of *Rhus coriaria* L. (sumac) using rat model of breast carcinoma chemoprevention. *R. coriaria* (as a powder) was administered through the diet at two concentrations of 0.1% (w/w) and 1% (w/w) for the duration of the experiment in a chemically-induced rat mammary carcinogenesis. After autopsy, histopathological and immunohistochemical analyses of tumor samples were evaluated.

R. coriaria demonstrated significant chemopreventive activities in female Sprague-Dawley rats in a model of breast carcinoma. Histopathological analysis of treated tumor specimens showed dose-dependent decrease in the ratio of high-/low-grade carcinomas compared to controls. In treated rat carcinomas, we found significant increases of caspase-3, Bax, and Bax/Bcl-2 expression, on the other side, a significant down-regulation of Bcl-2, Ki67 expressions and MDA levels.

Sumac demonstrated significant chemopreventive effects in rat model of breast carcinoma that was associated with apoptosis, anti-proliferative and anti-oxidant activities in cancer cells *in vivo*.

Keywords: *Rhus coriaria*, breast cancer, apoptosis, proliferation, angiogenesis, oxidative stress

Úvod

Predklinický výskum, ktorý trvá niekoľko desaťročí, priniesol mnoho dôkazov týkajúcich sa prospešného pôsobenia fytochemikálií a či celých rastlinných potravín na bunkové signalizácie spojené s rakovinou [1]. *Rhus coriaria* L. sa v tradičnej medicíne sa používa už stovky rokov, hojne využíva aj v stredomorskej kuchyni. *R. coriaria* (sumach) predstavuje superpotravinu, ktorá vykazuje vysokú antioxidačnú aktivitu [2]. Sumach si navyše získal pozornosť vďaka svojmu terapeutickému potenciálu pri mnohých civilizačných chorobách, vrátane rakoviny. Plody tejto rastliny sú bohaté na fytochemikálie akými sú flavonoidy a hydrolyzovateľné taníny - hlavne deriváty kyseliny gallovej [3].

Chemopreventívny potenciál *R. coriaria* v modeli karcinómu prsníka doteraz skúmaný. Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť onkostatickú účinnosť diétne podávaného *R. coriaria* v modeli chemicky vyvolaného mamárneho adenokarcinómu u samíc potkanov. Zdôvodnenie tejto štúdie bolo postavené na výsledkoch našich predchádzajúcich zistení, kde sme preukázali významné onkostatické účinky prírodných zmesí fytochemikálií na *in vivo* a *in vitro* modeloch rakoviny prsníka

hlodavcov [4-7]. Na definovanie poklesu rizika rakoviny (incidencia, frekvencia a latencia nádorov) po dlhodobej aplikácii *R. coriaria* bol použitý dobre zavedený model chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy. Ďalším cieľom bolo vyhodnotiť mechanizmus účinku, kde sme použili validované klinické markery apoptózy, proliferácie, angiogenézy, či oxidačného poškodenia v nádorových bunkách.

Materiál a metódy

Experiment bol schválený Etickou komisiou JLF UK (No. EK1860/2016) a ŠVPS SR (No. Ro-3239/15-221 a Ro-1640/17-221). V experimente sme použili panenské samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Charles River) vo veku 32-36 dní. Mamárnu karcinogenézu sme vyvolali intraperitoneálnou aplikáciou N-metyl-N-nitrozourey (Sigma, Deisenhofen, Nemecko) medzi 40. - 46. postnatálnym dňom v dávke 50 mg/kg hmotnosti zvieratá. Fytosubstanciu sme aplikovali v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko) počas celej doby štúdie (15 týždňov). Zvieratá v počte 75 kusov boli rozdelené do 3 skupín: 1. kontrolná skupina bez chemoprevencie, 2. skupina s fytosubstanciou v nižšej koncentrácii (0.1%), 3. skupina s fytosubstanciou vo vyššej koncentrácii (1%). Pri dávkovaní sumachu sme vychádzali z našich skúseností v predchádzajúcom období, kedy sme úspešne analyzovali viaceré rastlinné potraviny (škorica, chlorella, mladý jačmeň, oregano, klinček, či tymián). Pri definovaní dávky fytosubstancie primárne vychádzame z klinického dávkovania.

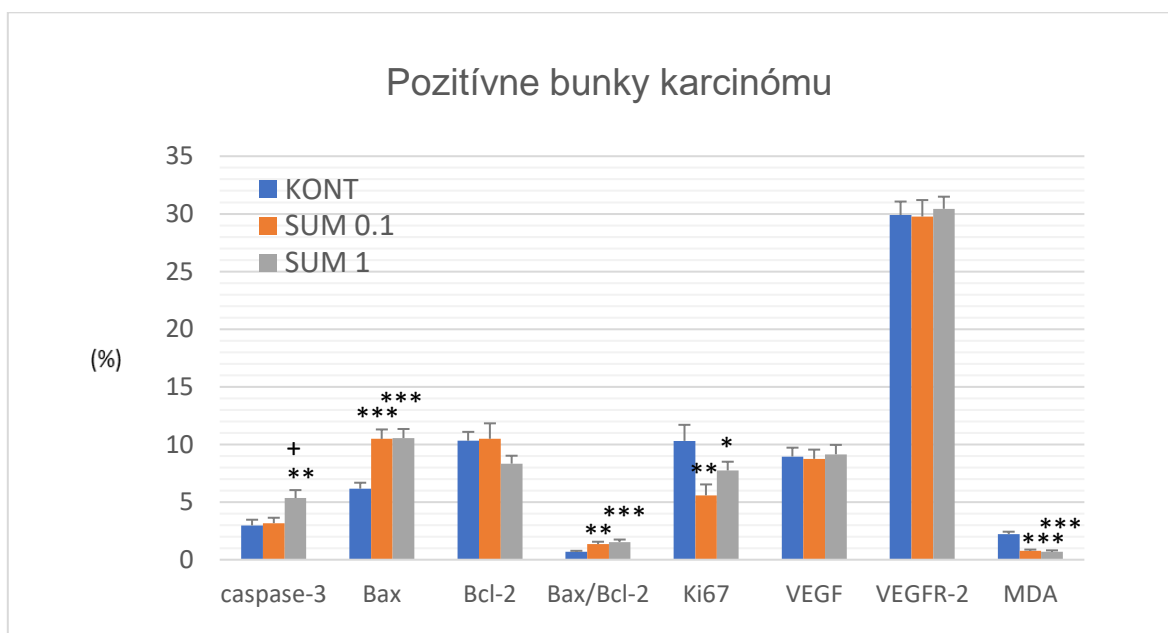
Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Pri pitve sme zhodnotili makroskopické zmeny na vybraných orgánoch. Mamárne nádory boli vypitvané a zaznamenali sme ich rozmery. Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov bola zafixovaná v 10 %-nom roztoku pufrovaného formalínu a následne technikou parafínových rezov pripravená na histologické a imunohistochemické vyšetrenie. Nádory boli klasifikované podľa kritérií pre klasifikáciu mamárnych nádorov potkanov [3-7]. Kritériá pre kategorizáciu gradingu (solidizácia, atypia buniek, index mitotickej aktivity a nekróza) boli definované podľa štandardnej diagnostickej metódy. HG (high grade) karcinómy sa považovali za nádory s ≥ 2 pozitívnymi kritériami a LG (low grade) karcinómy boli nádory s ≤ 1 pozitívnymi kritériami. Histologická analýza a grading tkaniva poskytuje informáciu o stupni diferenciácie, prognóze mamárneho nádoru a účinnosti liečby/chemoprevencie.

Pri hodnotení protinádorového účinku *R. coriaria* u samíc potkanov sme sa zamerali na imunohistochemické stanovenie vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek (kaspáza-3, bax, Bcl-2, Ki67, VEGF, VEGFR2, MDA) v rámci reprezentatívnych oblastí nádorového tkaniva parafínových bločkov. Detekcia vybraných proteínov bola zrealizovaná nepriamou imunohistochemickou metódou pomocou komerčne dostupných protilátok. Imunohistochemické farbenie (Autostainer Link 48/Hermes/) prebehlo podľa odporúčaní výrobcu. Vizualizácia primárnych protilátok bola uskutočnená prostredníctvom sekundárneho detekčného systému (EnVision, Dual Link System-HRP, USA) s použitím diaminobenzidín tetrahydrochloridu ako substrátu. Reprezentatívne oblasti rezov tkaniva boli nasnímané a analyzované pri 400-násobnom zväčšení (Olympus BX41N). Expresia proteínov bola kvantifikovaná ako priemerná percentuálna hodnota antigén pozitívnych oblastí v štandardných poliach (0,5655 mm²) nádorových "hot spot" oblastí. Morfometrická analýza digitálnych záberov bola uskutočnená za použitia softvéru QuickPhoto Micro, verzie 3.1 (Promicra, Praha). Antigén pozitívne oblasti boli vyhodnotené prostredníctvom fázovej analýzy so štandardnými prahovými hodnotami pre miernu a silnú intenzitu imunoreaktivity. Analyzovaných bolo minimálne 60 záberov na jeden skúmaný

parameter. V štatistickom hodnotení získaných dát sme použili Mann-Whitneyho test, ANOVA a Kruskal-Wallisov test.

Výsledky

R. coriaria vo vyššej dávke významne znížil incidencia nádorov o 20%, pri nižšej dávke nevýznamne znížil frekvenciu nádorov o 29% v porovnaní s kontrolami. Histopatologická analýza liečených nádorov ukázala robustné dávkovo-závislé zníženie pomeru HG/LG karcinómov o 66% a 73% v porovnaní s kontrolami. Obr. 1 sumarizuje hodnotenie apoptózy (expresia cytoplazmatickej kaspázy-3, Bax a Bcl-2), proliferácie (expresia Ki67), markerov angiogenézy (expresia VEGF a receptora VEGFR-2) a antioxidačnej aktivity (hladiny malondialdehydu /MDA/) v bunkách karcinómu mliečnej žľazy potkanov *in vivo* po aplikácii *R. coriaria*. Sumach vo vyššej dávke zvýšil expresiu kaspázy-3 o 80% ($p < 0,05$) a spôsobom závislým od dávky sa výrazne zvýšil pomer expresie Bax/Bcl-2 o 98,5% ($p < 0,01$) a 125% ($p < 0,001$) oproti kontrolám. Okrem toho sumach nezávisle na dávke znížil expresiu Ki67 o 46% ($p < 0,01$) a 25% ($p < 0,05$) a v závislosti od dávky znížil hladiny MDA o 65% ($p < 0,001$) a 69% ($p < 0,001$) voči kontrolám. Sledované parametre angiogenézy sa po chemoprevencii sumachom významne nezmenili.



Obr. 1 Imunohistochemické hodnotenie aktívnej kaspázy-3 (cytoplazmatickej), Bax, Bcl-2, Ki67, VEGFA, VEGFR-2 a MDA v bunkách karcinómu mliečnej žľazy potkana po podaní sumachu v dvoch dávkach. Údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SEM. Významný rozdiel, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. KONT, + $p < 0.05$ vs. SUM 0.1. Hodnoty expresie jednotlivých proteínov sa porovnali medzi liečenými (SUM 0.1, SUM 1) a neliečenými (kontrolnými) bunkami karcinómu samíc potkanov; analyzovaných bolo min. 60 obrázkov pre jeden marker

Diskusia

Predpokladali sme, že tumorsupresívne aktivity sumachu pozorované v tejto štúdii sú založené na proapoptotickom, antiproliferatívnom, antiangiogénnom alebo antioxidačnom pôsobení vyvolaného špecifickou zmesou rastlinných sekundárnych metabolitov. Apoptózu ako programovanú bunkovú smrť je možné iniciovať jednou z dvoch ciest - vnútornou alebo vonkajšou. V tejto štúdii sme hodnotili vnútorné mechanizmy aktivácie apoptózy pomocou modelu *in vivo*. Táto dráha je modulovaná

dvoma skupinami molekúl, Bcl-2 a Bax. Zvýšený pomer Bax/Bcl-2 zvyšuje aktivitu kaspázy-3 a následne spúšťa programovanú bunkovú smrť v rakovinových bunkách [8]. Početná literatúra dokumentuje dôležitú regulačnú úlohu fytochemikálií pri signalizácii Bax/Bcl-2/kaspáza-3 v karcinogénze prsníka [9,10]. Tento experiment jasne preukázal významné, dávkovo závislé zvýšenie pomeru Bax/Bcl-2 v mamárnych nádoroch potkanov liečených sumachom, ktoré korelovalo so zvýšením expresie kaspázy-3 v skupine liečenej vyššou dávkou sumachu.

V modulácii proliferácie rakoviny je zahrnutých niekoľko signálnych dráh akými sú COX-2, Nrf2, poly-ADP-ribozylácia, Hedgehog, Wnt, Plk1, STAT3, NF- κ B, PI3 kináza alebo epigenetické modulácie [11]. Ki67 je známy ako dôležitý proliferatívny biomarker. Imunohistochemické vyhodnotenie hladín expresie tohto markera v bunkách karcinómu prsníka potkana *in vivo* preukázalo významný pokles jeho expresie v oboch liečených skupinách. Naša skupina v predchádzajúcich experimentoch analyzovala v nádoroch bunkové hladiny MDA, ktorý predstavuje dobre validovaný a často používaný biomarker oxidačného poškodenia lipidov voľnými radikálmi [12]. Výsledky tejto štúdie preukázali významné zníženie hladín MDA v rakovinových bunkách potkanov, čo poukazuje na antioxidačnú aktivitu *R. coriaria* a jeho genoprotektívne účinky v bunke.

Záver

Mechanické analýzy buniek karcinómu mliečnej žľazy potkana *in vivo* preukázali významné proapoptotické, antiproliferatívne a antioxidačné účinky po liečbe sumachom. Všetky vedené účinky *R. coriaria* ohľadom jednotlivých nádorových biomarkerov zistené v tejto štúdii sa týkajú aktivácie nešpecifických bunkových signálnych dráh spojených s jeho onkostatickou aktivitou v preventívnom modeli karcinómu prsníka. Je potrebná ďalšia systematická hĺbková analýza týchto signálnych ciest v rámci predklinickej a klinickej onkológie. Nové liečebné stratégie či chemoprevenca karcinómu prsníka s použitím celých rastlinných potravín alebo izolovaných fytochemikálií si vyžadujú realizácie dobre dizajnovaných a kontrolovaných klinických štúdií.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Integrovaná stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života, kód ITMS: 313011V446, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Kapinova, *Biomed Pharmacother.* **2017**, 96:1465–1477.
- [2] Apak, *Pure Appl. Chem.* **2013**, 85:957–998
- [3] Kubatka, *Int J Mol Sci.* **2020**, 22:183.
- [4] Kubatka, *Molecules.* **2020**, 25:1399.
- [5] Kubatka, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20:1749.
- [6] Kubatka, *J Cell Mol Med.* **2017**, 21:2837–2851.
- [7] Kubatka, *Eur J Nutr.* **2017**, 56:1303–1316.
- [8] Hou, *Mol Ther Oncolytics.* **2020**, 19:67–78.
- [9] Abotaleb, *Cancers (Basel).* **2018**, 11:28.
- [10] Hodro, *Nutrients.* **2020**, 12:2629.
- [11] Wang, *Anticancer Agents Med Chem.* **2012**, 12:1281–305.
- [12] Sevastre-Berghian, *Front Pharmacol.* **2020**, 11:581470.

Vplyv *Rhus coriaria* L. na modifikáciu metylačného profilu génov v chemicky indukovanej mamárnej karcinogéníze

Líšková, A.¹, Samec, M.¹, Koklesová, L.¹, Výbohová, D.², Péč, M.³, Adamkov, M.⁴, Kubatka, P.³

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
liskova80@uniba.sk; peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

The whole plant food exerts significant anti-cancer efficacy due to the content of biological active phytochemicals. The significant anti-neoplastic potential of phytochemicals is based on their capacity to modulate multiple cancer-associated pathways. Hypermethylation of tumor-suppressor gene promoters are closely associated with the processes of carcinogenesis. Our experiment deals with the antineoplastic effects of *Rhus coriaria* L. (sumac) evaluated through the analysis of the methylation status of five tumor-suppressor (ATM, PITX2, RASSF1, PTEN, and TIMP3) gene promoters in the chemopreventive model of experimental mammary carcinogenesis in female rats. Experimental animals were divided into three groups: control group without chemoprevention, chemoprevention at a concentration of 0.1 % (SUM 0.1), and chemoprevention at a concentration of 1 % (SUM 1). *R. coriaria* L. administered at a lower dose (SUM 0.1) significantly reduced the methylation status of ATM gene promoter by 46 % ($p < 0.001$), PTEN gene promoter by 48.5 % ($p < 0.01$), and TIMP3 gene promoter by 60% ($p < 0.001$) when compared to the control and also significantly decreased the methylation of ATM gene promoter by 39 % ($p < 0.001$) and PTEN gene promoter by 47.5% ($p < 0.01$) when compared to the SUM 1 group. In conclusion, our results show a potential of *R. coriaria*, presumably based on synergic or additive effects of the phytochemicals of the whole plant foods, to affect the multistep process of mammary carcinogenesis via the modulation of gene promoter methylation.

Key words: mammary carcinoma, rat, chemoprevention, phytochemicals, sumac, gene promoter methylation.

Úvod

Napriek významnému pokroku v onkologickom výskume predstavujú nádorové ochorenia závažný celospoločenský problém. V roku 2018 sa rakovina prsníka v rámci ženskej populácie celosvetovo umiestnila na prvom mieste v incidencii ako aj v mortalite [1,2]. Epigenetické modifikácie zohrávajú v procese karcinogenézy významnú úlohu. Metylácia DNA je definovaná ako postreplikačná modifikácia cytozínu v rámci dinukleotidovej sekvencie cytozínfosfátguanín (CpG) prostredníctvom DNA metyltransferáz [3]. CpG dinukleotidy sú v genóme rozmiestnené nerovnomerne pričom sa často nachádzajú v tzv. CpG ostrovčekoch v oblastiach promótorov kontrolujúcich génovú expresiu [4]. Hypermetylácia promótorových oblastí tumor supresorových génov významným spôsobom prispieva k procesu tumorigenézy [5,6]. Zníženie metylácie promótorov génov spravidla zodpovedá zvýšeniu génovej expresie. Expresia tumor supresorových génov zahŕňajúcich ATM, PITX2, RASSF1A, PTEN a TIMP3 je často asociovaná s mamárnou karcinogénizou [7–9]. Významná

protirakovinová aktivita celistvých rastlinných potravín je sprostredkovaná obsahom širokého spektra bioaktívnych látok [10,11] a ich pleiotropných účinkov zahŕňajúcich špecifickú moduláciu aberantných epigenetických modifikácií [12]. *Rhus coriaria* L. (sumak) je rastlina z čeľade *Anacardiaceae* pôvodom zo stredomorskej oblasti. *R. coriaria* je všeobecne známy svojimi antioxidačnými a protirakovinovými účinkami [13–15]. Na základe uvedeného sme sa rozhodli zhodnotiť vplyv *R. coriaria* L. na modifikáciu metylačného profilu vybraných génov v chemopreventívnom modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy samíc potkanov *in vivo*.

Materiál a metódy

Samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Charles River Germany) vo veku 32 - 36 dní v celkovom počte 75 ks boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca (teplota 23 ± 2 °C, relatívna vlhkosť 40 – 60 %, umelý svetelný režim svetlo/tma 12 : 12 h). Mamárna karcinogenéza bola indukovaná intraperitoneálnou aplikáciou chemokarcinogénu N-nitroso-N-methylurea (NMU, Sigma, Deisenhofen, Germany) v jednorazovej dávke 50 mg/kg hmotnosti zvieratá v priemere v 42. postnatálnom dni. Chemoprevencia *R. coriaria* začala týždeň pred podaním karcinogénu a trvala 14 týždňov po podaní NMU. Fytosubstancia bola zapracovaná v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko). Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín: kontrolná skupina bez aplikácie fytosubstancie (KONT), skupina s obsahom *R. coriaria* v potrave v nižšej koncentrácii (1 g/kg) (SUM 0.1) a skupina s *R. coriaria* v potrave vo vyššej koncentrácii (10 g/kg) (SUM 1). V závere experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou a boli odobrané vzorky mamárnych nádorov. Izolácii DNA z odobratých nádorov predchádzala homogenizácia tkaniva pomocou TissueLyser LT (Qiagen, Germany). Po rozrušení kompaktnosti tkaniva sa k homogenátu pridalo 20 µl proteínázy K pričom následne prebehla inkubácia pri 56°C v trvaní 4 dni. Genomická DNA bola izolovaná s použitím komerčného kitu DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany) podľa priloženého protokolu. Po extrakcii DNA bola zmeraná jej koncentrácia s využitím Qubit™ 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Pre bisulfidovú konverziu bola použitá DNA s koncentráciou 50 ng/µl. Kvantitatívna analýza metylačného statusu promótorových oblastí vybraných génov bola zrealizovaná pyrosekvenovaním s použitím komerčného kitu PyroMark PCR (Qiagen, Germany). Použili sme navrhnuté metylačné eseje na stanovenie metylačného statusu piatich génových promótorov (RASSF1, TIMP3, PITX2, ATM, PTEN) (PyroMark CpG assay, Qiagen, Germany). Samotná analýza prebiehala na zariadení PyroMark Q96 ID System (Qiagen, Germany) s použitím PyroMark Gold Q96 Reagents. Metylácia bola meraná komerčným softvérom (PyroMark Q96 software version 2.5.8; Qiagen, Germany).

Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK1860/2016) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-3239/15-221 a Ro-1640/17-221).

Výsledky

Účinok *R. coriaria* v chemopreventívnom modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy bol hodnotený prostredníctvom analýzy metylačného profilu vybraných CpG úsekov piatich tumor supresorových génov: ATM (CpG 1 – 4), PITX2 (CpG 1 – 5), RASSF1 (CpG 1 – 3), PTEN (CpG 1 – 6) a TIMP3 (CpG 1 – 6). *R. coriaria* aplikovaný v nižšej dávke významne znížil metyláciu promótoru génu ATM o 46 % ($p < 0,001$), PTEN o 48,5 % ($p < 0,01$) a TIMP3 o 60 % ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zároveň sme v prípade nižšej dávky *R. coriaria* pozorovali signifikantný

pokles metylácie promótoru génu ATM o 39 % ($p < 0,001$) a PTEN o 47,5 % ($p < 0,01$) v porovnaní so skupinou s vyššou dávkou (Obrázok 1).

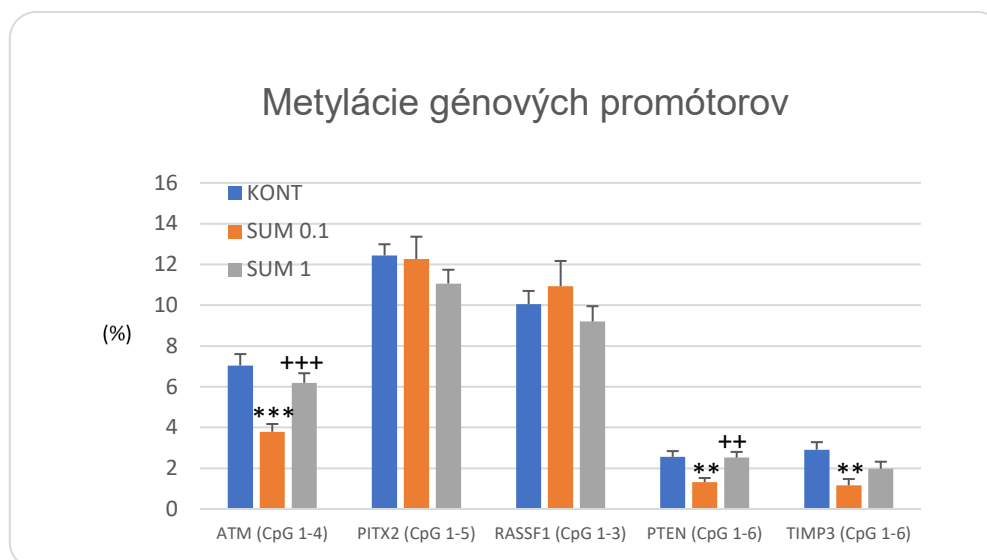
Diskusia a záver

Hodnotenie metylačného profilu v mamárnom nádorovom tkanive preukázalo signifikantné zníženie metylácie promótorov tumor supresorových génov ATM, PTEN a TIMP3 po podaní *R. coriaria*. Naše výsledky poukazujú na signifikantné zníženie metylačného stavu promótorov iba v prípade fytozložtiny aplikovanej v nižšej dávke. Vyššiu účinnosť nižšej dávky sumaku v chemopreventívnej štúdii je možné vysvetliť potencionálnou asociáciou nadmernej dávky a zvýšeného oxidačného stresu v normálnych bunkách a následnej všeobecnej toxicite pre zvieratá. Naše predchádzajúce experimenty s využitím rovnakého modelu experimentálnej mamárnej karcinogenézy *in vivo* preukázali signifikantné zníženie metylačného statusu promótorov génov po aplikácii *Cinnamomum zeylanicum* L. (ATM, TIMP3), *Thymus vulgaris* L. (ATM, RASSF1, PTEN a TIMP3) a *Syzygium aromaticum* L. (RASSF1) [9,16,17]. Pozitívne účinky rastlinných potravín na metylačný status tumor supresorových génov boli dokumentované aj inými výskumnými skupinami. Diétne podávanie čiernych malín viedlo k demetylácii WIF1, SOX17 a GKI v modeloch rakoviny hrubého čreva *in vivo* [18]. Čierne maliny boli taktiež asociované s demetyláciou promótoru génu Sfr4 v modeli karcinómu pažeráka potkanov [19]. Významné protirakovinové účinky celistvých rastlinných potravín sú sprostredkované obsahom širokého spektra bioaktívnych fytochemikálií a ich aditívnymi a synergickými účinkami.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Integrovaná stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života, kód ITMS: 313011V446, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Bray, *CA Cancer J Clin.* **2018**, 68:394–424.
- [2] Armstrong, *BMJ.* **2014**, 348:g2756.
- [3] Jin, *Human Diseases. Genes Dis* **2018**, 5:1–8.
- [4] Chovanec, *Onkológia.* **2015**, 10:14–18.
- [5] Yadav, *Asian Pac J Cancer Prev.* **2018**, 19:443–448.
- [6] Jasek, *Biomolecules.* **2019**, 9.
- [7] Rodríguez-Miguel, *PLOS ONE.* **2015**, 10:e0138980.
- [8] Ng, *Int J Mol Sci* **2015**, 16:2472–2496.
- [9] Kubatka, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20.
- [10] Kapinova, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 96:1465–1477.
- [11] Liskova, *Molecules* **2019**, 24.
- [12] Khan, *Expert Opin Ther Targets.* **2016**, 20:689–703.
- [13] Anwar, *Front Pharmacol.* **2018**, 9.
- [14] El Hasasna, *Sci Rep.* **2016**, 6.
- [15] Mirian, *Res Pharm Sci.* **2015**, 10:233–240.
- [16] Kubatka, *Molecules.* **2020**, 25:1399.
- [17] Kubatka, *J Cell Mol Med.* **2017**, 21:2837–2851.
- [18] Wang, *Cancer Prev Res (Phila).* **2013**, 6:1317–1327.
- [19] Huang, *Mol Carcinog.* **2016**, 55:1867–1875.



Obr. 1 Metylácia promótorovej oblasti génov ATM, PITX2, RASSF1A, PTEN a TIMP3 vo vzorkách mamárnych nádorov potkanov. V rámci každého analyzovaného génu (ATM, PITX2, RASSF1, PTEN a TIMP3) bola kvantifikovaná úroveň metylácie CpG ostrovčekov v kontrolnej skupine a v skupinách s aplikovanou fyto-substanciou. Signifikantné rozdiely, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs KONT a ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ vs SUM 0,1

Úloha Sumachu (*Rhus coriaria*) v regulácii expresie miRNA v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy

Samec, M.^{1,2}, Líšková, A.¹, Koklesová, L.¹, Výbohová, D.⁴, Pěč, M.³, Adamkov, M.⁴, Kubatka, P.^{2,3}

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
marek.samec@uniba.sk; peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

Phytochemicals represent naturally occurring compounds derived from plants with numerous benefits for human health. Regular intake of sufficient amounts of dietary compounds of plants was proven to reduce the incidence of civilization diseases, including cancer. Numbers of experimental studies have demonstrated anticancer abilities of phytochemicals via the modulation of epigenetic modifications, directly connected with the modulation of different cancer-related processes such as apoptosis, proliferation, cellular metabolism, or invasiveness. MicroRNAs are characterized as a group of short, non-coding RNAs that regulate post-transcriptional silencing of target genes. Recent evidence suggested a critical role of aberrantly expressed miRNA in different steps of carcinogenesis. Our experiment focuses on the chemopreventive and potential therapeutic effects of *Rhus coriaria* (sumac) mediated via the regulation of expression of microRNAs in experimental mammary carcinogenesis evaluated *in vivo*. Carcinogenesis in rats was chemically induced by NMU (N-methyl-N-nitrosourea). Chemoprevention by sumac was administered in two concentrations of 0.1 % and 1 % in diet and lasted 15 weeks. Acquired data revealed that sumac decreased expression of oncogenic miR-210 by 64 % ($p < 0.001$) and increased level of tumor-suppressive miR-145 by 67 % ($p < 0.001$) in lower dose treatment group compared to controls. In conclusion, our results proved the chemopreventive effect of sumac via decrease in expression of miR-210 and increase in expression of miR-145 in rat mammary carcinoma cells *in vivo*.

Keywords: phytochemicals, epigenetics, microRNA, rats

Úvod

Fytochemikálie predstavujú heterogénny súbor bioaktívnych zlúčenín klasifikovaných podľa chemickej štruktúry, ktoré zahŕňajú polyfenoly, fenolové kyseliny, karotenoidy a organosírne zlúčeniny. Tieto sekundárne metabolity rastlín sa nachádzajú v ovocí, zelenine, obilninách a iných rastlinných produktoch a sú často zodpovedné za odlišné vlastnosti rastlín ako je pigmentácia a vôňa. Okrem toho, mnohé z nich hrajú dôležité úlohy v ochrane hostiteľskej rastliny pred vírusmi, parazitmi a inými škodlivými stimulmi [1]. Fytochemikálie ako nenutričné zložky rastlín vykazujú mnohé prospešné účinky spojené s prevenciou rôznych civilizačných ochorení [2]. Bioaktívne zložky rastlín preukázali výrazný potenciál v regulácii procesov ako sú hypoxia [3], angiogenéza [4], apoptóza [5] alebo invazivita a metastázovanie [6], ktoré sú asociované s malígnou transformáciou buniek. Výrazný účinok fytochemikálií bol dokumentovaný v regulácii epigenetických procesov, ktoré hrajú výraznú úlohu v iniciácii, promócii a progresii rakoviny [7]. Rakovina prsníka v súčasnosti predstavuje

najčastejší typ malígneho ochorenia diagnostikovaného v ženskej časti populácie. Hoci je mortalita na tento typ nádorového ochorenia stabilizovaná, neustále rastie počet novo diagnostikovaných prípadov [8]. Výraznú komplikáciu v liečbe rakoviny prsníka predstavuje rozvoj rezistencie ako aj získanie invazívneho a metastatického fenotypu, čo limituje potenciál súčasne používaných terapeutických stratégií. Neustály progres v oblasti biológie a medicíny prináša nové poznatky o molekulárnej podstate ochorenia. Epigenetické mechanizmy, ktoré sú zapojené v regulácii biologických procesov v bunke zahŕňajú najmä posttranslačné modifikácie histónov, metylácie promótorových oblastí tumor-supresorových génov a expresiu malých nekódujúcich RNA (miRNA). Deregulácie v týchto procesoch sú často spojené s iniciáciou a promóciou nádorového ochorenia prsníka [9]. Aberantná expresia miRNA podporuje rozvoj intratumorovej hypoxie [10], invazivity a metastáz [11], rezistencie na liečbu [12] alebo môže iniciovať zmeny v metabolizme nádorových buniek [13]. V súčasnosti je pozornosť mnohých vedeckých skupín zameraná najmä na analýzu expresií miRNA, ktoré predstavujú ideálne prognostické a prediktívne markery rakoviny prsníka.

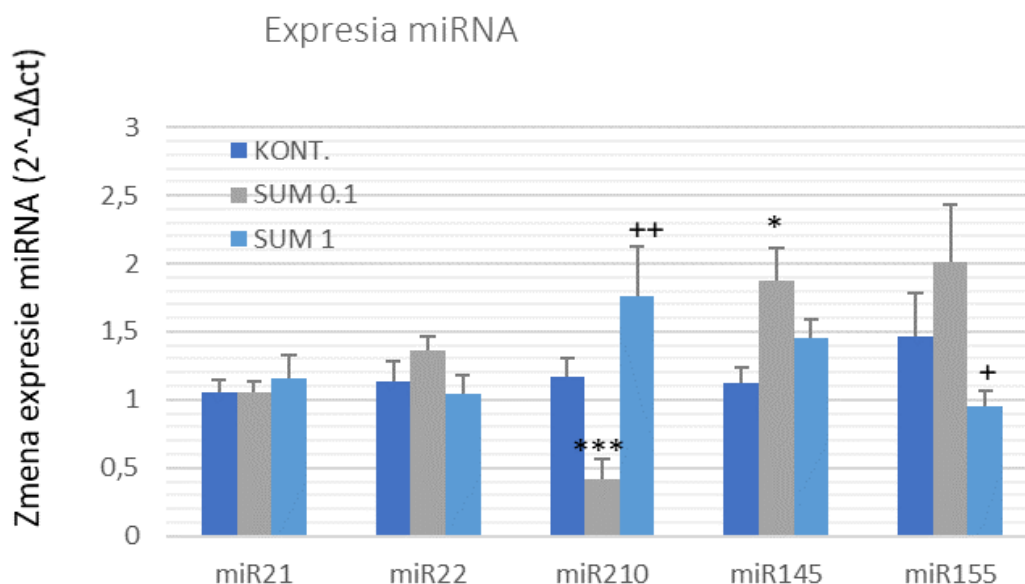
Materiál a metódy

V rámci našej štúdie sme použili samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley (n=75) (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) vo veku 30-34 dní s telesnou hmotnosťou približne 115 – 140 g. Aklimatizácia zvierat prebiehala v štandardných podmienkach vo viváriách s teplotou prostredia 23 ± 2 °C, relatívnou vlhkosťou vzduchu 40 – 60 % a s režimom svetlo/tma (L/D 12 : 12 h). Karcinogéza bola u potkanoch indukovaná intraperitoneálnym podaním karcinogénu N-nitroso-N-methylurey (NMU, Sigma, Deisenhofen, Nemecko) v jednorazovej dávke 50 mg/kg telesnej hmotnosti v 42. deň postnatálneho vývoja. Chemoprevencia sumachom (*Rhus coriaria* L. - plod, SONNENTOR Kräuterhandels GMBH, Sprögnitz, Rakúsko; krajina pôvodu-Irán) začala týždeň pred aplikáciou karcinogénu a trvala približne 15 týždňov. Sumach bol podávaný v diéte v dvoch koncentráciách a to 1 g/kg (nižšia dávka, 0,1 %) a 10 g/kg (vyššia dávka, 1 %). Zvieratá boli náhodne rozdelené do 3 experimentálnych skupín: 1) kontrolná skupina bez chemoprevencie; 2) skupina s nižšou koncentráciou sumachu v potrave; 3) skupina s vyššou koncentráciou sumachu v potrave. Posledný týždeň boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou a bolo im odobraté nádorové tkanivo na ďalšiu analýzu. Tkanivo sme odobrali s použitím jednorazových sterilných skalpelových čepieľok (Medplus, Nitra) a následne vložili do stabilizačného roztoku *RNA/later* (Thermo Fisher Scientific) na stabilizáciu bunkovej RNA. V ďalšom kroku sme tkanivo homogenizovali s použitím TissueLyser LT (Qiagen, Nemecko). Samotná RNA bola izolovaná s použitím komerčne dostupného izolačného kitu miRVana microRNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific), pričom sme postupovali podľa priloženého protokolu. Koncentrácia vyizolovanej RNA bola zmeraná prostredníctvom spektrofotometra NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). V ďalšom kroku sme konvertovali RNA na cDNA pomocou komerčne dostupného kitu TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) a postupovali podľa odporúčaní výrobcu. Pre kvantitatívnu real-time PCR analýzu sme použili TaqMan™ Advanced miRNA assays Kit (Thermo Fisher Scientific) pre tumor supresorové miR-22, -145 a pre onkogénne miR-21, -210, -155. Na normalizáciu výsledkov sme použili miR-191. Samotná analýza expresie prebiehala na zariadení AB7500 Real Time System (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK1860/2016) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-3239/15-221 a Ro-1640/17-221

Výsledky

Sumach v nižšej koncentrácii v potrave (SUM 0,1) signifikantne znížil expresiu miR-210 o 64 % ($p < 0.001$) a zvýšil expresiu miR-145 ($p < 0.05$) o 67 % v porovnaní s kontrolnou skupinou. V prípade porovnania zmien v expresii medzi nižšou (SUM 0.1) a vyššou dávkou sumachu v potrave (SUM 1) sme identifikovali pokles miR-155 o 52 % ($p < 0.05$) a nárast miR-210 o 337 % ($p < 0.01$). V prípade ostatných analyzovaných miRNA (miR-21, -22, -155) sme nezaznamenali žiadne signifikantné zmeny v ich expresii pri porovnaní liečených skupín so skupinou bez chemoprevencie (Obr.1).



Obr. 1 Analýza expresie miR-21, -22, -210, -145, a -155 v nádorovom mamárnom tkanive odobratého zo samíc potkana kmeňa Sprague-Dawley. Získané hodnoty boli normalizované prostredníctvom endogénnej kontroly miR-191. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM. Signifikantný rozdiel, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. KONT, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ vs. SUM 0.1

Diskusia

Epigenetické mechanizmy hrajú zásadnú úlohu v regulácii génovej expresie a nie je teda prekvapením, že sú esenciálne pre normálny priebeh bunkových procesov a ich prípadne aberácie sú spojené s rozvojom mnohých civilizačných ochorení, vrátane rakoviny [14]. Zásadnú úlohu v rámci epigenetických procesov má miRNA, ktorá reguluje génovú expresiu na posttranskripčnej úrovni a tým ovplyvňuje hladiny exprimovaných onkogénnych alebo tumor-supresorových mRNA prostredníctvom ich degradácie alebo inhibície ich translácie [15]. Deregulácia v expresii miR-21, -22, -210, -145, -155 je často detegovaná v prípadne rakoviny prsníka *in vitro*, *in vivo* ako aj v klinickej sfére [16–20]. Fytochemikálie preukázali signifikantný modulačný potenciál v regulácii expresie miRNA v mnohých experimentálnych štúdiách zameraných na mamárnu karcinogézu [7,21,22]. V našom experimente sme sledovali expresiu piatich miRNA (-21, -22, -210, -145, -155) v konvenčnom (premenopauzálnom) modeli mamárnej karcinogenézy. Získané údaje odhalili pokles v expresii miR-210 a nárast miR-145 v skupine s nižšou dávkou sumachu v potrave (SUM 0.1) v porovnaní s kontrolnou skupinou bez chemoprevencie. Pokles v expresii miR-210 a nárast v miR-145 je spájaný s lepšou prognózou pre pacientov s rakovinou prsníka [23,24]. Modulačný aspekt fytochemikálií na úroveň expresie miR-145 bol dokumentovaný aj *in vitro*. Genisteín zvýšil hladinu expresie miR-145 v nádorových bunkových

líniách Y79, čo následne viedlo k inhibícii proliferácie a indukcií apoptózy [25]. Zvýšená hladina miR-210 je často asociovaná s hypoxickým fenotypom nádoru, ktorý podporuje rozvoj invazivity a metastáz, zmeny v bunkovom metabolizme a vznik rezistencie na aplikovanú terapiu [26]. V našej štúdii sme zaznamenali zníženie v expresii miR-210 po aplikácii sumachu v potrave, čo poukazuje na onkostatický účinok fytochemikálií obsiahnutých v tejto rastlinnej funkčnej potravine.

Záver

V predkladanej experimentálnej štúdii sme preukázali signifikantný chemopreventívny účinok sumachu v animálnom modeli mamárnej karcinogenézy prostredníctvom regulácie expresie miRNA. Zmes fytochemikálií obsiahnutých v sumachu predstavuje súbor sekundárnych metabolitov, ktorých aditívny, prípadne synergický efekt je zodpovedný za chemopreventívny účinok spojený s reguláciou expresie miRNA. Z toho dôvodu pravidelná konzumácia sumachu môže byť asociovaná so znížením rizika rozvoja malígneho ochorenia prsníka najmä v skupine žien s vysokým rizikom rozvoja neoplázie. Fytochemikálie preukázali výrazný dopad na reguláciu expresie miRNA v mnohých predklinických štúdiách zameraných na rakovinu prsníka. Len ďalší výskum v tejto oblasti a najmä implementácia získaných informácií do klinickej sféry nám môže priniesť nové terapeutické stratégie v prevencii a liečbe nádorových ochorení v kontexte prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Integrovaná stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života, kód ITMS: 313011V446, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Kotecha, *Oncotarget*. **2016**, 7(32):52517.
- [2] Mena, *Nutrients*. **2020**, 2157.
- [3] Samec, *Cancers*. **2021**, 13(1):130.
- [4] Liskova, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. **2020**, 1–18.
- [5] Abotaleb, *Cancers*. **2019**, 11(1):28.
- [6] Liskova, *Cancers*. **2020**, 12(6):1498.
- [7] Samec, *Journal of cancer research and clinical oncology*. **2019**, 145(7):1665–1679.
- [8] Kudela, *Cancers*. **2019**, 11(11):1791.
- [9] Moosavi, *Iranian Biomedical Journal*. **2016**, 20(5):246.
- [10] Huang, *Molecular cell*. **2009**, 35(6): 856–867.
- [11] Mcanena, *BMC cancer*. **2019**, 19(1):1–10.
- [12] Shen, *American Journal of Translational Research*. **2015**, 7(10):2115.
- [13] Ye, *Technology in Cancer Research & Treatment*. **2018**, 17:1533033818805997.
- [14] Ahmad, *The Indian Journal of Medical Research*. **2013**, 137(4):680.
- [15] Patwardhan, *Systems Biology and Holistic Targeting*. **2016**, 235–272.
- [16] Pasculli, *Scientific reports*. **2019**, 9(1):1–9.
- [17] Wang, *BMC cancer*. **2019**, 19(1):1–13.
- [18] Zou, *Experimental and Therapeutic Medicine*. **2017**, 14(2):1009–1016.
- [19] Ding, *International Journal of Oncology*. **2017**, 50(5):1701–1710.
- [20] Zhang, *OncoTargets and therapy*. **2019**, 12:7993.
- [21] Sayeed, *Journal of Functional Foods*. **2017**, 28:177–193.
- [22] Varghese, *Biomolecules*. **2020**, 10(2):191.
- [23] Xiaofei, *Iranian Journal of Public Health*. **2020**, 49(1):21.
- [24] Tang, *Journal of Surgical Research*. **2019**, 236:278–287.
- [25] Wei, *Molecular vision*. **2017**, 23:385.
- [26] Muz, *Hypoxia*. **2015**, 3:83.

Úloha galektínu-3 v cervikálnych léziách

Mešťanová, V.¹, Csizmárová, S.¹, Krajňáková, B.¹, Kajo, K.², Adamkov, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave, Ústav patológie, Bratislava
veronika.mestanova@uniba.sk

Abstract

Galectins, a family of β -galactoside binding proteins, play an essential role in cancer progression, cell survival, cell adhesion, tumor-associated angiogenesis and tumor dissemination. In addition to that, galectins are implicated in the adjustment of immune and inflammatory reactions guidance of the cancer escape from the immune surveillance. These carbohydrate-binding proteins show multiple functional heterogeneity bound to the various intracellular compartments as well as extracellular milieu. The abovementioned characteristics indicate profound engagement of galectins in critical signaling pathways affecting cervical cancer evolution. Presented immunohistochemical analysis evaluates expression of galectin-3 (gal-3) in context of selected proteins panel that seems to be closely related to the differentiation degree and histopathological stage of precancerous lesions and cervical cancer. However, there is still sadly poor evidence confirming its significance in diagnosis and prognosis of cervical cancer. Gal-3 is a potential candidate to become a promising predictor of the cervical lesions progression and valuable prognostic marker.

Keywords: galectin-3, cervical lesions, epithelial-mesenchymal transition

Úvod

Galektíny patria do rodiny proteínov s typickou väzobnou doménou pre β -galaktozidázu (laktázu). V progresii nádorových ochorení galektíny predstavujú významnú molekulu zapojenú do viacerých kritických signálnych dráh zodpovedných za proliferáciu a prežívanie nádorových buniek, adhezivitu vo vzťahoch bunka - bunka, resp. bunka - komponenty extracelulárnej matrix (ECM), tumor-asociovanú de-novo angiogénzu, invazivitu a migráciu buniek [1,2]. Navyše, široké spektrum funkčnej heterogenity presahuje až do regulácie imunitnej a zápalovej reakcie v oblasti lézie. Komplexnosť galektínov je definovaná ich angažovanosťou v množstve intracelulárnych ako aj extracelulárnych procesov, s čím priamo súvisí aj ich variabilná subcelulárna lokalizácia v jadre, cytoplazme, plazmatickej membráne či ECM [3]. Expresia gal-3 je okrem iných nádorov popísaná aj v premalígnych a malígnych léziách krčka maternice. Avšak vzhľadom k funkčnej pluralite gal-3 je hodnotenie jeho pozície v procese malígnej transformácie buniek krčka maternice náročné, čoho dôkazom sú rôznorodé, v niektorých prípadoch až protichodné závery vedeckých prác. Z pohľadu biologického chovania nádorových buniek krčka maternice je dôležité sledovať správanie gal-3 v asociácii s β -katenínovou signálnou kaskádou, ktorá je rovnako zapojená do regulácie novotvorby krvného zásobenia aktívnych nádorov a transformácie epitelového fenotypu týchto buniek na agresívnejší mezenchýmový fenotyp [4,5]. Cieľom predloženej práce je popísať predbežné výsledky hodnotenia expresie gal-3 v prekancerózných ako aj v kancerózných léziách krčka maternice a v ďalšej fáze analýzy korelovať tieto výsledky s markermi Wnt-signálnej dráhy (β -katenin), markermi epiteliálno-mezenchýmovej tranzície (EMT) (E-kadherin, N-kadherin, fascin) a inými.



Obr. 1 Schematické zapojenie galektínu-3 do širokej škály procesov vzhľadom k jeho subcelulárnej lokalizácii (upravené podľa Newlaczky a Yu [12])

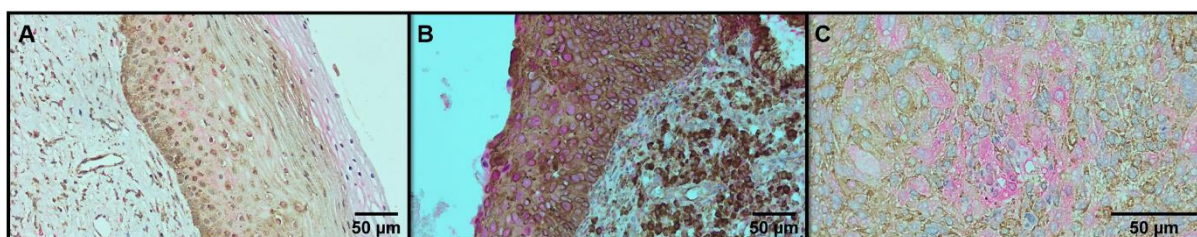
Materiál a metódy

V predloženej štúdií bol použitý archívny materiál v podobe FFPE bločkov pochádzajúcich z diagnosticky uzatvorených prípadov premalígných a malígných lézií krčka maternice. Súbor tvorí 85 vzoriek (LSIL=30, HSIL=28, iSCC=27). Rezy o hrúbke 3 µm boli spracované prostredníctvom PT-Link (Pre-Treatment Module for Tissue Specimens, Dako). Všeobecný protokol dvojitého imunohistochemického spracovania tkaniva podlieha v praxi modifikáciám na základe špecifikácií konkrétneho antigénu, ktorý sa deteguje v príslušnom tkanive, na základe špecifických vlastností použitej protilátky a podľa odporúčaní výrobcu. V predloženej práci bola použitá protilátka Recombinant Anti-Galectin-3 (klon EPR19244, dil. 1:2000) vizualizovaná chromogénom HRP magenta (DM857, EnVision FLEX, Dako, Omnis) so substrátom DM843 (EnVision Flex Substrate Buffer, Dako, Omnis). Druhou protilátkou bol Recombinant Anti-Prostaglandin E Receptor EP2/PTGER2 (klon EPR8030(B), dil. 1:1000) s použitím vizualizačného činidla DAB chromogén (3,3-diaminobenzidín). Jadrá buniek boli štandardne dofarbované hematoxylínom. Pri interpretácii predbežných výsledkov získaných imunohistochemickou analýzou sme semikvantitatívne vyhodnocovali percento pozitívnych buniek, intenzitu imunoreakcie a subcelulárnu lokalizáciu v korelácii k inými histomorfologickými parametrami.

Predbežné výsledky

Analýze vzájomných vzťahov gal-3 a PTGER2 sa venujeme priebežne, avšak z dôvodu komplexnosti pleiotropných biologických funkcií samotného lektínu sme sa v predloženej práci zamerali len na hodnotenie expresie galektínu-3. Expresia gal-3 bola detekovaná vo všetkých hodnotených vzorkách s typickou heterogénnou prezentáciou v cytosole, jadre, na bunkovej membráne aj v ECM. V porovnaní s normálnym epitelom krčka maternice, boli intenzita imunoreakcie ako aj percentuálny podiel pozitívnych buniek vyššie v LSIL (skvamózna intraepitelová lézia nízkeho stupňa), HSIL (skvamózna intraepitelová lézia vysokého stupňa) a SCC (skvamocelulárny karcinóm) s progredujúcou tendenciou. Subcelulárna lokalizácia

gal-3 vykazovala zmiešanú expresiu. Vo vzorkách s normálnou histológiou epitelu krčka maternice bol gal-3 exprimovaný zväčša v jadrách buniek bazálnej a parabazálnej vrstvy, s postupným prestupom na membránu, resp. do ECM epitelových buniek intermediárnych a superficiálnych epitelových vrstiev. Diverzifikáciu subcelulárnej lokalizácie gal-3 sme zaznamenali vo vzorkách HSIL, kde sme popri jadrovej pozorovali aj cytoplazmovú pozitivitu, najmä v asociácii so zápalovou reakciou okolitej strómy. Podobný trend prechodu gal-3 jadrovej positivity do cytosolu vykazovali aj vzorky SCC, navyše s expresiou membránovej, resp. ECM positivity v niektorých oblastiach invazívneho okraja malígnej lézie. Zaujímavým fenoménom bol výrazný pokles intenzity imunoreakcie spolu so zníženým podielom gal-3 pozitívnych buniek v malom počte SCC lézií, čo priamo korelovalo aj s poklesom PTGER2 expresie.



Obr. 2 Expresia galektínu 3 v cervikálnych léziách LSIL (A), HSIL (B), SCC (C)

Diskusia

Za normálnych podmienok je gal-3 exprimovaný v rôznych tkanivách. Vedecké štúdie preukazujú jeho konštantne zvýšenú expresiu vzhľadom k závažnosti niektorých onkologických ochorení [6]. Prezentované predbežné výsledky naznačujú súvis medzi expresiou gal-3 a progresiou lézií krčka maternice. Ovplyvňujúce molekuly bunkového povrchu, proteíny ECM a glykoproteíny cytosolu, gal-3 výrazným spôsobom participuje na bunkovej proliferácii, apoptóze, príľnavosti buniek, angiogenéze, štiepení prekursorovej mRNA a iných procesoch [7]. Niektorí autori poukazujú na fakt, že jadrová expresia gal-3 reguluje Wnt/ β -katenínovú dráhu aktiváciou transkripcie cyklínu-c, C-myc a ďalších génov stimulujúcich tumorigenézu a zhoršujúcich prognózu pacienta [4]. Niektoré práce uvádzajú variabilnú intenzitu imunoreakcie gal-3 v nádorových bunkách, čo môže naznačovať ich duálnu funkciu v predikcii agresivity a invazivity lézie. Slabá expresia koreluje so zvýšenou invazivitou a rastom nádoru a naopak, výrazná expresia gal-3 je asociovaná so zníženou invazivitou a rastom [8,9,10]. Rovnako aj v nami hodnotených vzorkách SCC sme zaznamenali lézie s rôznorodou intenzitou. Navyše, PTGER2 v kombinácii s gal-3 sa javia ako významné prognostické faktory prežívania pacientov s karcinómom krčka maternice [11]. Hodnotenie prognostickej a diagnostickej plauzibility gal-3 môže predstavovať ďalší dôležitý krok pri objasnení mechanizmu vzniku cervikálnych lézií.

Záver

Galektín-3 predstavuje vďaka svojmu širokému funkčnému záberu zaujímavú molekulu z pohľadu biologického správania buniek premalígnych a malígnych lézií krčka maternice. Jeho potenciál v rozvoji cervikálnych lézií a vzájomné asociácie s ďalšími faktormi signálnych dráh zapojených do progresie týchto lézií si vyžadujú zvýšenú pozornosť s dôrazom lepšie pochopiť patogenézu cervikálnych ochorení a prípadné využitie galektínu-3 v dennej bioptrickej praxi.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0129/16 a UK/21/2020.

Literatúra

- [1] Liu and Rabinovich, *Nature Reviews Cancer*. **2005**, 5(1):29–41.
- [2] Wang, *BioMed Research International*. **2018**, art. ID–2175927.
- [3] Viguier, *Tissue Barriers* 2. **2014**, art. ID–e29103.
- [4] Song, *Cancer Research*. **2009**, 69(4):1343–1349.
- [5] Chetry, *Journal of Cancer*. **2018**, 9(24):4742–4755.
- [6] Nangia-Makker, *Glycobiology*. **2018**, 28(4):172–181.
- [7] Hömig, *European Journal of Cell Biology*. **2015**, 94:309–315.
- [8] Li, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **2017**, 50(4):e5356.
- [9] Shu, *PLoS One*. **2011**, 6:e27346.
- [10] Yang, *Cancer+*. **2021**, 2(3):11–17.
- [11] Dietlmeier, *Scientific Reports*. **2020**, 10:1154.
- [12] Newlaczky and Yu, *Cancer letters*. **2011**, art. ID–10934264.

Imunohistochemická analýza fascínu a jeho funkcia v EMT v léziách krčka maternice

Csizmárová, S.¹, Mešťanová, V.¹, Krajňáková, B.¹, Kajo, K.², Adamkov, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave, Ústav patológie, Bratislava
csizmarova5@uniba.sk

Abstract

Cervical cancer is a significant health problem among women worldwide. It ranks on the fourth place for both incidence and mortality. Cervical neoplasias arise in most cases from the epithelium in the transformation zone. Preinvasive lesions are classified either in two-tiered diagnostic cytopathologic approach as low-grade and high-grade squamous intraepithelial lesions or three tiered histopathologic approach as cervical intraepithelial lesion I, II, III. Invasive squamous carcinoma is able to spread mainly via lymphatic or hematogenous spread. During the progression of epithelial cancer, neoplastic cells lose their typical morphological and functional characteristics and acquire a mesenchymal phenotype in process of epithelial-mesenchymal transition (EMT). There is a high number of different molecules and signalling pathways able to initiate the process of EMT. In our study we focus on the role of actin bundling protein fascin in the process of EMT in cervical neoplastic lesions.

Keywords: EMT, fascin, cervical cancer

Úvod

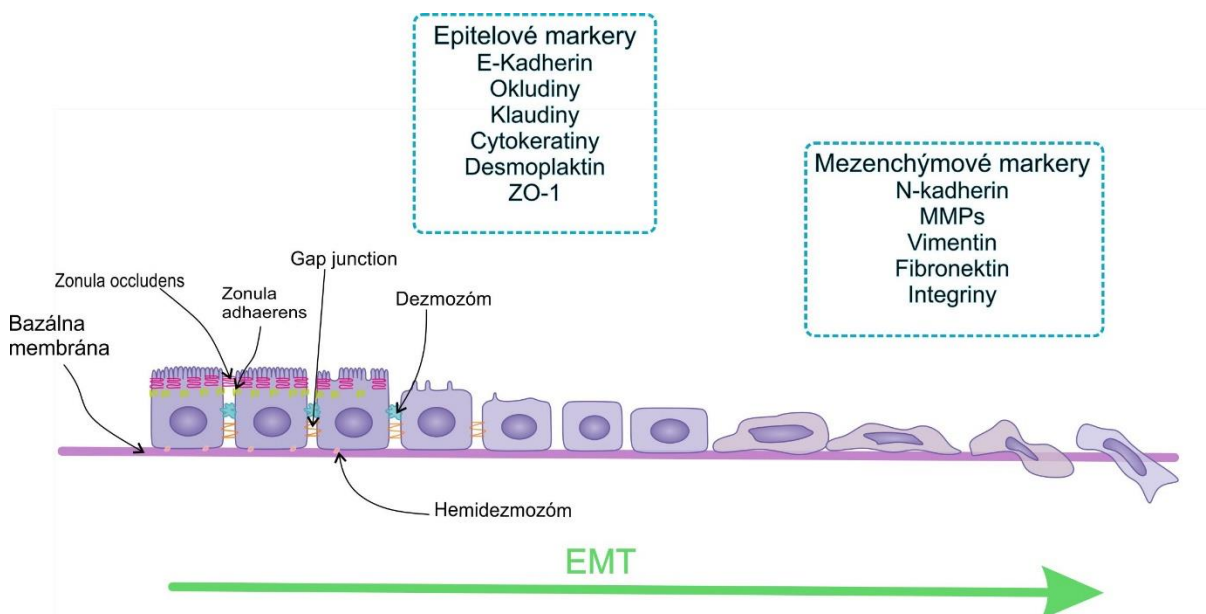
Rakovina krčka maternice je celosvetovo na 4. priečke najčastejších gynekologicko-onkologických ochorení u žien. Ako aj u iných onkologických ochorení, tiež pri nádoroch krčka maternice je mortalita spájaná predovšetkým s metastazovaním nádorových buniek. Na prestup nádorových buniek do okolitého tkaniva pôsobí viacero molekulových a bunkových mechanizmov. Nádorové bunky diseminujú dvoma základnými cestami hematogénnou a lymfogénnou. Práve proces epiteliálno-mezenchymálnej tranzície je dôležitou súčasťou metastazovania nádorov. EMT zabezpečuje prechod jednotlivými krokmi metastatickej kaskády. Počas EMT epitelové bunky strácajú svoje typické charakteristické vlastnosti a nadobúdajú nový fenotyp [1]. Bolo identifikovaných viacero iniciátorov EMT ako hormóny, rastové faktory, cytokíny, hypoxia, metabolické zmeny, imunitná odpoveď a protinádorová terapia [2, 3, 4]. V našej súčasnej práci sa zameriavame na funkciu niektorých proteínov ako je napr. fascin v súvislosti s EMT.

Epiteliálno-mezenchymálna tranzícia

Metastazovanie nádorov je asociované s biologickým fenoménom označovaným ako epiteliálno-mezenchymálna tranzícia. EMT sa však nevzťahuje výhradne len na proces karcinogenézy. Fyziologicky sa vyskytuje aj pri embryogenéze a procese hojenia rán či fibrózy.

EMT spájaná s patológiou nádorov na rozdiel od ostatných dvoch typov, stráca koordináciu, dochádza k narušeniu integrity epitelu ako aj dezorganizácii tkaniva a vzniku nových nádorových mezenchymových buniek [1]. Medzi hlavné znaky EMT patria: strata medzibunkových spojení, strata typickej polarizácie buniek, reorganizácia

cytoskeletu, morfológické zmeny a získanie migračnej kapacity. Bunky sa stávajú izolovanými, pohyblivými a sú rezistentné na apoptózu [2, 4]. Okrem morfológických zmien dochádza pri získaní mezenchýmového fenotypu aj k zvýšenej expresii markerov typických pre mezenchýmové bunky (viď. Obr.1).



Obr. 1 Kľúčové kroky pri EMT a charakteristické markery pre epitelové a mezenchýmové bunky

EMT spúšťajú a regulujú rozličné signálne dráhy a molekuly. Aktivácia a regulácia EMT nielen mediátormi, ale aj samotným vplyvom mikroprostredia, je veľmi komplexná a jej výsledkom je aktivácia ďalších bunkových dráh. EMT sprevádzajú zmeny v génovej expresii, ktoré navodzujú represiu epitelového fenotypu a aktiváciu mezenchýmového. Tieto zmeny iniciujú komplexné regulačné dráhy, ktoré zahŕňajú transkripčné faktory SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2, Twist, E12/E47 a nekódujúce RNA [5].

Fascin

Fascin je 55 kDa aktín viažuci proteín, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri pohybe, migrácii a adhézii buniek. Na základe jeho lokalizácie sa rozlišujú tri formy fascin. Fascin-1 sa vyskytuje v nervovom a mezenchýmovom tkanive, fascin-2 vo fotoreceptorových bunkách sietnice a fascin-3 v semenníkoch [6]. Fascin má dôležitú úlohu pri formovaní bunkových štruktúr založených na aktíne (napr. filopódie, dendrity, mikrokľky a i.), je teda zodpovedný za prvé kroky pri migrácii neoplastických buniek [7, 8]. Fyziologicky je fascin exprimovaný na typických miestach ako mozog, vaječníky, semenníky, svalové bunky, fibroblasty [9]. Viaceré štúdie však potvrdili jeho zvýšenú expresiu v rôznych typoch malígnych lézií [6, 8, 10]. Predpokladá sa, že táto abnormálna expresia fascin v nádorových bunkách vedie k EMT a napomáha progresii a metastazovaniu nádorov.

U invazívnych nádorových buniek je často pozorovaný vývoj membránových výbežkov. Tieto sa tvoria vďaka prestavbe cytoskeletových mikrofilamentov a predpokladá sa, že tento proces je riadený aktín viažucimi proteínmi ako je fascin. Je tiež známe, že nadmerná expresia fascin znižuje adhezivitu medzi bunkami a zvyšuje motilitu epitelových buniek. Fascin sa dostáva do popredia štúdií vzhľadom na jeho súvis s progresiou nádorových ochorení a možnosť jeho využitia ako markera

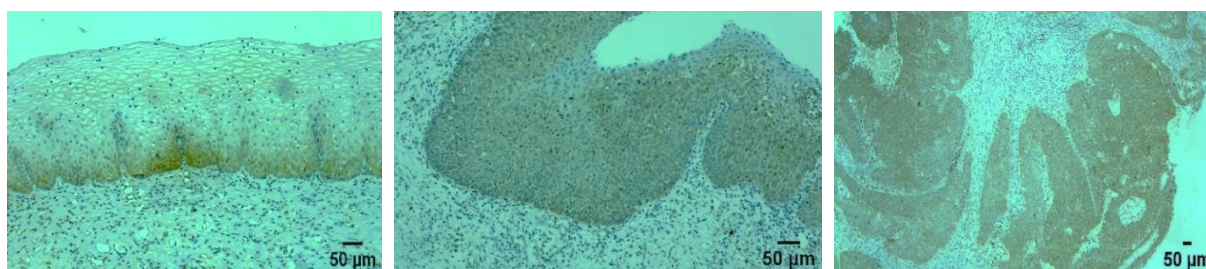
v diagnostike a prognóze rôznych typov rakoviny vrátane karcinómu krčka maternice [8].

Materiál a metódy

V práci sme pomocou imunohistochemických metód vyšetrili materiál vo forme parafrínových (FFPE) bločkov. Náš súbor obsahuje 85 vzoriek, medzi ktorými sa nachádza 30 vzoriek LSIL, 28 vzoriek HSIL a 27 vzoriek skvamocelulárneho karcinómu (SCC). Z parafrínových bločkov sa pripravili rezy o hrúbke 3 μm . Tieto vzorky sa následne deparafrinizovali, rehydratovali a revitalizovali sa antigény pomocou použitia PT Link-u (Pre-Treatment Module for Tissue Specimens, Dako). Vzorky sa ručne imunohistochemicky ofarbili a na vizualizáciu sa použil DAB (3,3-diaminobenzidín) chromogén. Pre hodnotenie vzoriek sme použili svetelný mikroskop Olympus BX41 a mikrofotografie sme zaznamenali pomocou fotoaparátu Olympus E-420 s použitím software-u Zeiss Zen 3.3. Na ofarbených vzorkách sme následne semikvantitatívne hodnotili expresiu markerov nasledovnými parametrami: intenzita imunoreakcie, percento pozitívnych buniek a lokalizácia biomarkera. Získané výsledky budeme následne štatisticky vyhodnocovať pomocou štandardných štatistických metód pomocou testu Chi-square (χ^2), Spearmannovho korelačného koeficientu a Fisherovho exaktného testu.

Predbežné výsledky

Expresia fascinu bola cytoplazmová u všetkých vzoriek. U väčšiny (73%) LSIL vzoriek sme detegovali slabú pozitivitu imunoreakcie. Zvyšné vzorky vykazovali strednú alebo vysokú intenzitu imunoreakcie. Expresia bola výrazná predovšetkým v bazálnej a parabazálnej vrstve epitelu. HSIL vzorky vykazovali podobne ako LSIL skôr slabú expresiu fascinu, ale u 14% vzoriek bol fascin detegovaný v celej hrúbke epitelu. Skvamocelulárny karcinóm vo väčšine prípadov vykazoval strednú intenzitu imunoreakcie. Fascin bol detegovaný taktiež v invazívnych častiach lézií a endotelových bunkách ciev. Tieto naše výsledky sú len predbežné, keďže ešte naďalej hodnotíme vzorky a snažíme sa presnejšie identifikovať napr. expresiu fascinu HSIL oblastí pri SCC, vzťah imunoreakcie a cytologickej morfológie a hĺbky invázie lézie a presnejšie vyhodnotiť reaktívne elementy v stróme. Okrem štatistického vyhodnotenia nás ešte čaká aj korelácia klinicko-morfologických charakteristík (vek, pohlavie, TNM klasifikácia a grading) s imunohistochemickými parametrami.



Obr. 2 Expresia fascinu v LSIL (A), HSIL (B) a SCC (C)

Diskusia

V práci sme pozorovali expresiu fascinu v léziách krčka maternice. Intenzita imunoreakcie a percento pozitívnych buniek sa zvyšuje so závažnosťou lézií a invazivitou. Naše predbežné výsledky sa zhodujú s výsledkami iných štúdií [8,11, 12]. Zvýšená expresia fascinu bola identifikovaná v rôznych typoch neoplastických

lézií ako napr. ezofageálny karcinóm [13], nádory ústnej dutiny [14], karcinóm žalúdka [15], uroteliálny karcinóm [10], karcinóm prsníka [16] a iné. Štúdie poukazujú taktiež na koreláciu zvýšenej expresie fascinu s pokročilými štádiami a metastázami tumorov. Práve kvôli zvýšenej imunoreakcii pri invazívnych léziách a korelácii s pokročilými štádiami by mohol byť fascin indikátorom invazivity [11, 12].

Záver

V našej práci pozorujeme expresiu fascin, ktorý má dôležitú úlohu pri procese EMT. Je jedným z kľúčových proteínov pre zabezpečenie pohyblivosti nádorových buniek pri získaní mezenchýmového fenotypu. Budeme pokračovať s hodnotením jeho expresie a jej korelácie s ďalšími klinicko-morfologickými parametrami a zároveň s ďalšími proteínmi, ktoré sú zapojené do procesu EMT. Budeme sa snažiť hlbšie pochopiť súvislosti v rámci procesu EMT a rakoviny krčka maternice a zhodnotiť možnosť využitia fascin ako plauzibilného diagnostického, diferenciálno-diagnostického či prognostického markera.

Práca bola financovaná z grantu VEGA č. 1/0129/16 a UK/21/2020.

Literatúra

- [1] Nistico, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2012**, 4(2):a011908.
- [2] Lamouille, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2014**, 15(3):178–196.
- [3] Stefania, *Front Oncol.* **2017**, 7:24.
- [4] Savagner, *Ann Oncol.* **2010**, 21(7):89–92.
- [5] Roche, *Cancers (Basel)*. 2018, 10(2):52.
- [6] Ibrahim, *Int J Adv Res.* **2016**, 4(8):01–408.
- [7] Beghein, *Scientific Rep Rts.* **2018**, 8:15606.
- [8] Ghalejoogh, *Med J Islam Repub Iran.* **2018**, 32:134.
- [9] Ma, *Int J Cancer.* **2015**, 137:2534–2544.
- [10] Sharma, *Medical Journal Armed forces India.* **2014**, 70:139–143.
- [11] Koay, *Pathology.* **2014**, 46(5):433–438.
- [12] Kabukcuoglu, *Eur J Gynaecol Oncol.* **2006**, 27(2):171–176.
- [13] Hsu, *Diseases of the Esophagus.* **2009**, 22:402–408.
- [14] Alam, *BMC Cancer.* **2012**, 12:32.
- [15] Hashimoto, *Oncology.* **2004**, 67:262–270.
- [16] Gonzalez-Reyes, *Mol Cell Biochem.* **2018**, 443(1-2):1–0.

Imunohistochemická expresia cytokeratínu 17 v epiderme pri benígnych epidermálnych proliferatívnych léziách

Bartoš, V.¹

¹ Martinské biotické centrum, s.r.o, Martin
vladim.bartos@gmail.com

Abstract

Background: Cytokeratin 17 (CK17) is a multifunctional cytoplasmic protein that is not normally produced in the interfollicular epidermis of human skin. **Objective:** The aim of this study was to investigate an immunohistochemical expression of CK17 in benign cutaneous epidermal squamoproliferative lesions. **Material and Methods:** The study group included 22 skin biopsy samples with nosologic entities which exhibited a proliferated/hyperplastic epidermis without keratinocytic atypia. All cases were immunohistochemically investigated by antibody against human CK17 (clone E3). **Results:** The positivities of CK17 in given lesions were as follows: seborrheic keratosis (5/13; 38,5%), clavus (2/2; 100%), verruca vulgaris (2/2; 100%), psoriasiform dermatitis (1/1; 100%), prurigo nodularis (1/1; 100%), reactive and pseudoepitheliomatous hyperplasia (3/3; 100%). **Conclusion:** Abnormal production of CK17 within keratinocytes occurs universally in benign epidermal proliferative lesions of various etiology. Immunohistochemical expression of CK17 can not serve as a marker for the differential diagnosis. Since a production of CK17 in the epidermis is probably related to inflammatory cellulization, this knowledge might be useful to introduce novel anti-CK17 therapeutic modalities for chronic dermatoses.

Keywords: cytokeratin 17, epidermis, squamoproliferative lesions

Úvod

Cytokeratíny predstavujú širokú rodinu intermediárnych filamentových proteínov. Vo všeobecnosti sú považované za marker epitelových buniek resp. epitelovej diferenciácie [1-3]. Existuje 20 základných epitelových cytokeratínov, ktoré sú podľa molekulovej hmotnosti a izoelektrického bodu rozdelené na dva typy [1-3]. Cytokeratíny typu I majú pomerne nízku molekulovú hmotnosť a numericky zahŕňujú CK10 – CK20 [1-3]. Cytokeratíny typu II majú vyššiu molekulovú hmotnosť a zahŕňujú CK1 – CK9 [1-3]. Cytokeratíny majú vysoký stupeň tkanivovej špecificity. V koži expresia CK génov reflektuje typ epitelu (interfolikulárna epiderma vs. pilosebaceózna jednotka), štádium diferenciácie epitelových buniek a je modifikovaná rôznymi intracelulárnymi a extracelulárnymi faktormi [2].

Cytokeratín 17 (CK17) zaradujeme ku kyslým cytokeratínom typu I. V koži cicavcov je principiálne syntetizovaný v adnexálnych štruktúrach, teda vo vlasových folikuloch, ekrinných potných žľazách, mazových žľazách a nechtoch [2, 4, 5]. V povrchovej epiderme (s výnimkou kože na dlaniach a chodidlách) nie je bežne prítomný, ale k jeho tvorbe tu dochádza pri rôznych hyperproliferatívnych patologických stavoch [2, 5, 6, 7]. Táto skutočnosť je dobre známa napr. pri psoriáze, kde aberantná produkcia CK17 v postihnutej epiderme zohráva úlohu aj v samotnej patogenéze ochorenia [4, 5, 7]. CK17 je exprimovaný pri rôznych epitelových tumoroch kože, najmä pri bazocelulárnom karcinóme a nádoroch odvodených z vlasových folikulov, čiastočne aj pri nádoroch pochádzajúcich z potných žliaz a pri spinocelulárnom karcinóme [3].

V súčasnosti absentujú ucelenejšie štúdie zaoberajúce sa expresiou CK17 pri nenádorových proliferatívnych/hyperplastických léziách epidermy, čo je zapríčinené aj tým, že táto skupina je veľmi široká a zahrňuje rôznorodé chorobné jednotky. Cieľom prezentovaného príspevku bolo sledovanie imunohistochemickej expresie CK17 v koži pri vybraných benígnych epidermálnych skvamoproliferatívnych léziách.

Materiál a metódy

Hodnotený súbor pozostával z 22 bioptických vzoriek kože s chorobnými jednotkami rôznej etiológie (viď Tab. 1), ktoré ako jeden z morfológických atribútov obsahovali aj proliferovanú/hyperplastickú epidermu bez keratinocytových atypií. Topografická distribúcia lézií bola nasledovná: hlava a krk (n = 9), brucho (n = 3), chrbát (n = 2), hrudník (n = 2), predlaktie (n = 1), stehno (n = 1), ruka (n = 2) a noha (n = 2). Vzorky boli spracované v parafínových bločkoch a ďalej podľa konvenčných laboratórnych postupov formou histologických rezov. Okrem štandardného farbenia hematoxylínom a eozínom boli všetky prípady imunohistochemicky vyšetrené monoklonálnou myšaciu protilátkou proti ľudskému CK17 (klon E3, DAKO, ready-to-use). Sledovaná bola prítomnosť/absencia expresie CK17 v patologicky zmenenej (proliferovanej) epiderme, ako aj v okolitej nepostihnutej epiderme a ostatných epitelových štruktúrach kože.

Výsledky

CK17 vykazoval silnú imunoreaktivitu vo vonkajšej pošve vlasového folikulu, ktorá zároveň slúžila ako vnútorná kontrola. Ďalej bola prítomná mierna až stredne výrazná pozitivita v duktoch a sekréčných častiach väčšiny potných a mazových žliaz. Povrchová epiderma neexprimovala CK17 okrem prípadov lokalizovaných na dlani (n = 1), na prste ruky (n = 1) a na chodidle (n = 2), kde bola viditeľná ložisková imunoreaktivita aj v epidermálnych keratinocytoch mimo lézie. Prehľad jednotlivých diagnóz a zastúpenie CK17-pozitívnych prípadov je uvedený v Tabuľke 1. Súhrne možno konštatovať, že okrem seboroickej keratózy bola pri všetkých ostatných jednotkách zreteľná a väčšinou difúzna pozitivita na CK17 v proliferovanej epiderme, ktorá ostro kontrastovala s okolitou CK17-negatívnou epidermou. Seboroické keratózy boli sprevádzané alebo intenzívnou imunoreaktivitou na CK17 (38,5 %), alebo naopak, jej úplnou absenciou (61,5 %). Subjektívne sa zdalo, že CK17-pozitívne seboroické keratózy boli sprevádzané intenzívnejšou chronickou zápalovou celulizáciou v stróme. Reprezentatívne prípady niektorých chorobných jednotiek sú demonštrované na Obrázkoch 1 - 3.

Diskusia

CK17 je multifunkčný cytoplazmatický proteín, ktorý participuje na plejáde intracelulárnych a extracelulárnych procesov zahrňujúcich proliferáciu a diferenciáciu buniek a udržiavanie integrity tkaniva [5]. Jeho (nad)produkciu stimulujú rôzne cytokeratíny a rastové faktory, napr. interferón gamma (IFN- γ), interleukín 17 a 22 (IL-17, IL-22), transformujúci rastový faktor beta (TGF- β) a bázický fibroblastový rastový faktor (bFGF) [5]. Okrem nich aj transkripčné faktory (Gli1/2, Nrf2, p53) a iné proteíny (Annexin A2) väzbou na promótor génu CK17 významne participujú na syntéze jeho proteínu v cytoplazme [5]. Ako už bolo spomenuté, interfolikulárna epiderma v ľudskej koži (s výnimkou palmoplantárnej lokalizácie) bežne neprodukuje CK17. Pokým bazálne keratinocyty syntetizujú najmä CK5 a CK14 [2, 6], diferencovanejšie keratinocyty v suprabazálnych vrstvách ich prestávajú produkovať začínajú syntetizovať CK1 a CK10 [2, 6]. Za rôznych patologických stavov však aktivované

keratinocyty indukujú de novo transkripciu CK6, CK16 a CK17, ktoré nie sú bežne produkované v interfolikulárnej epiderme [2, 6]. Tieto cytokeratíny majú funkciu určitej „ochrannnej bariéry“ (barrier alarmins) a kolektívne poskytujú „flexibilnú kostru“ (flexible scaffold) umožňujúcu keratinocytom odolávať traumatizujúcim vplyvom a modulovať rôzne funkcie vrátane apoptotických mechanizmov a imunitnej homeostázy [6]. Schéma produkcie cytokeratínov v epiderme za fyziologických a patologických okolností a efekt ich pôsobenia sú ilustrované na Obrázku 4.

V prezentovanej štúdii sa autor zameral na hodnotenie imunohistochemickej expresie CK17 pri niektorých benígnych epidermálnych skvamoproliferatívnych léziách. Napriek malému počtu analyzovaných prípadov možno uzavrieť, že s výnimkou seboroickej keratózy vykazovali všetky ostatné lézie v patologicky zmenenej (proliferovanej) epiderme konštantnú pozitivitu na CK17. Okolité epiderma bola negatívna na CK17 s výnimkou lokalizácie na ruke a nohe, kde sa aj v nej fokálne vyskytovali zoskupenia CK17-pozitívnych keratinocytov. Zaujímavé však je, že väčšina seboroických keratóz nevykazovala expresiu CK17. V literatúre absentujú štúdie zaoberajúce sa konkrétne touto problematikou, preto autor nemal možnosť porovnávať svoje výsledky s inými prácami. V jednej kazuistike [8] bola seboroická keratóza taktiež negatívna na CK17. V prezentovanej štúdii boli seboroické keratózy alebo intenzívne pozitívne na CK17, alebo úplne negatívne (ložisková pozitivita sa nevyskytovala), preto je pravdepodobné, že indukciu tvorby proteínu v proliferovaných keratinocytoch ovplyvňujú iné (extraepitelové) determinanty, napr. zápalové bunky v stróme. Dosiaľ známe poznatky poukazujú, že CK17 nemá len funkciu štrukturálneho proteínu, ale zohráva významnú úlohu aj v lokálnej imunitnej regulácii. V tomto smere je názorným príkladom psoriáza. Je známe, že pri nej je CK17 nadprodukovaný v proliferovanej epiderme [5]. CK17 má podobné epitopy ako Streptokokový proteín M6, ktorý pri psoriáze funguje ako superantigén [5, 7]. Epitopy ektopicky produkovaného CK17 v aktivovaných keratinocytoch sú rozpoznávané dendritickými bunkami, ktoré vylučujú mediátory indukujúce diferenciáciu T-lymfocytov na Th1- a Th17-lymfocyty [5]. Tie produkujú IL-17, IL-22 a IFN- γ , ktoré spätne stimulujú tvorbu CK17 v psoriatickej epiderme [5]. Zjednodušene povedané, ektopicky produkovaný CK17 v proliferujúcich keratinocytoch udržiava proces ochorenia aktiváciou autoreaktívnych T-lymfocytov [7]. V tejto kaskáde, ktorá sa označuje ako „autoimunitná slučka“ (CK17/T-cell/cytokine autoimmune loop), môže byť CK17 atraktívnym cieľom v génovej terapii psoriázy, a to mechanizmom priamej inhibície jeho tvorby [4, 7]. Recentná štúdia na myších modeloch odhalila [7], že pri imiquimodom indukovanej psoriáziformnej dermatitíde supresia tvorby CK17 v keratinocytoch prostredníctvom špecifickej siRNA (small interfering RNA) signifikantne zmiernila prejavy ochorenia. Inhibícia tvorby CK17 totiž súbežne viedla k supresii tvorby cytokínov z T-lymfocytov, ktoré sú kľúčovou zložkou vyvolávajúcou zápalové zmeny v koži. Aj v prezentovanej štúdii sa CK17-negatívne seboroické keratózy zdali mať menej výraznú (alebo žiadnu) zápalovú celulózu v stróme v porovnaní s CK17-pozitívnymi prípadmi, ale keďže toto pozorovanie nebolo nijako objektivizované, z pohľadu analýzy nie je relevantné.

Záver

V rámci benígnych epidermálnych proliferatívnych lézií kože sa ektopická produkcia CK17 v keratinocytoch vyskytuje univerzálne pri ochoreniach rôznej etiológie. Imunohistochemická expresia CK17 teda nemôže slúžiť ako marker v ich diferenciálnej diagnostike. Keďže tvorba CK17 v epiderme pravdepodobne súvisí so

zápalovou celulizáciou v stróme, tento poznatok možno využiť pri zavádzaní nových anti-CK17 terapeutických modalít chronických dermatóz.

Literatúra

- [1] Weedon, *Weedon's Skin Pathology. 3th Edition.* **2010**, p.248.
- [2] Wang, *Methods Enzymol.* **2016**, 568:303350.
- [3] Zhou, *Oncol Lett.* **2019**, 17:927–932.
- [4] Jin, *Med Res Rev.* **2014**, 34(2):438–454.
- [5] Yang, *J Patol.* **2019**, 247(2):158–165.
- [6] Zhang, *Cells.* **2019**, 8:807.
- [7] Xiao, *Chin Med J.* **2020**, 133(24):2910–2918.
- [8] Ishida, *Oncol Lett.* **2011**, 2(4):625–627.

TABULKY

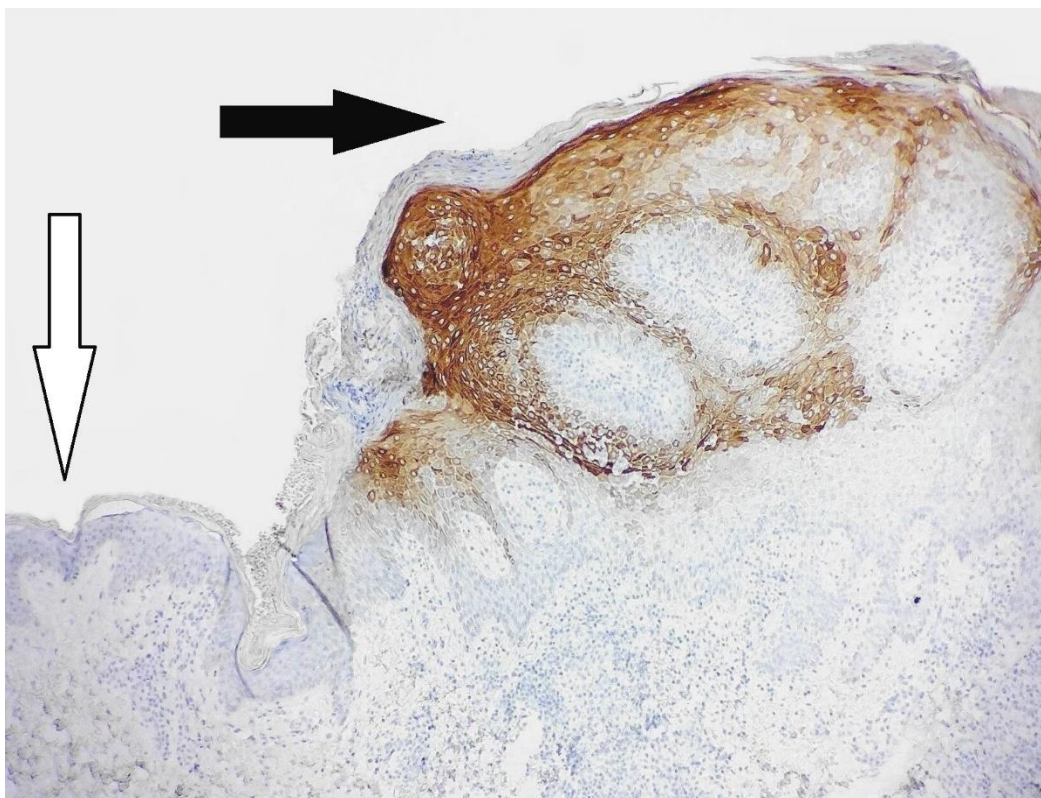
Tab. 1 Prehľad jednotlivých lézií v súbore a zastúpenie CK17-pozitívnych prípadov. (^a v rámci pilomatrixómu a chondrodermatitis nodularis, ^b v rámci hojenia rany s jazvou)

Patologická lézia	Etiológia	N	CK17+
Seboroická keratóza	nádorová	13	5/13 (38,5 %)
Clavus	mechanická	2	2/2 (100 %)
Verruca vulgaris	vírusová	2	2/2 (100 %)
Reaktívna hyperplázia epidermy ^a	reaktívna	2	2/2 (100 %)
Pseudoepiteliomatózna hyperplázia epidermy ^b	reaktívna	1	1/1 (100 %)
Prurigo nodularis	zápalová	1	1/1 (100 %)
Psoriáziformná dermatitída	zápalová	1	1/1 (100 %)

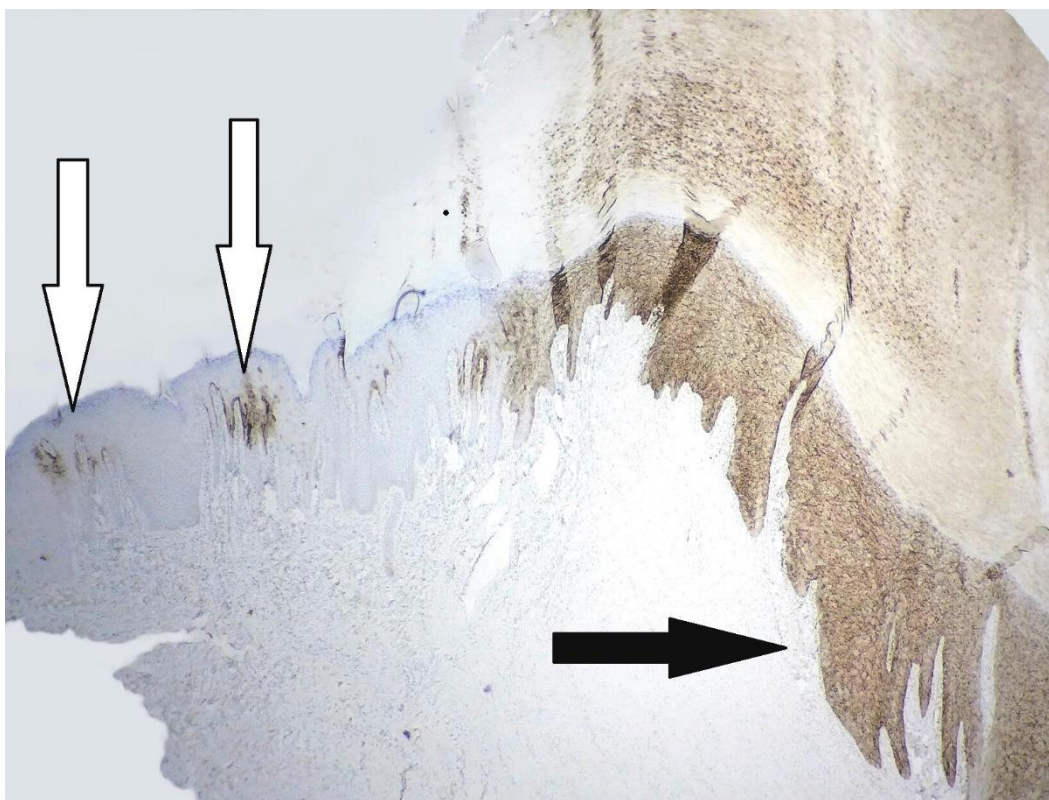
OBRÁZKY



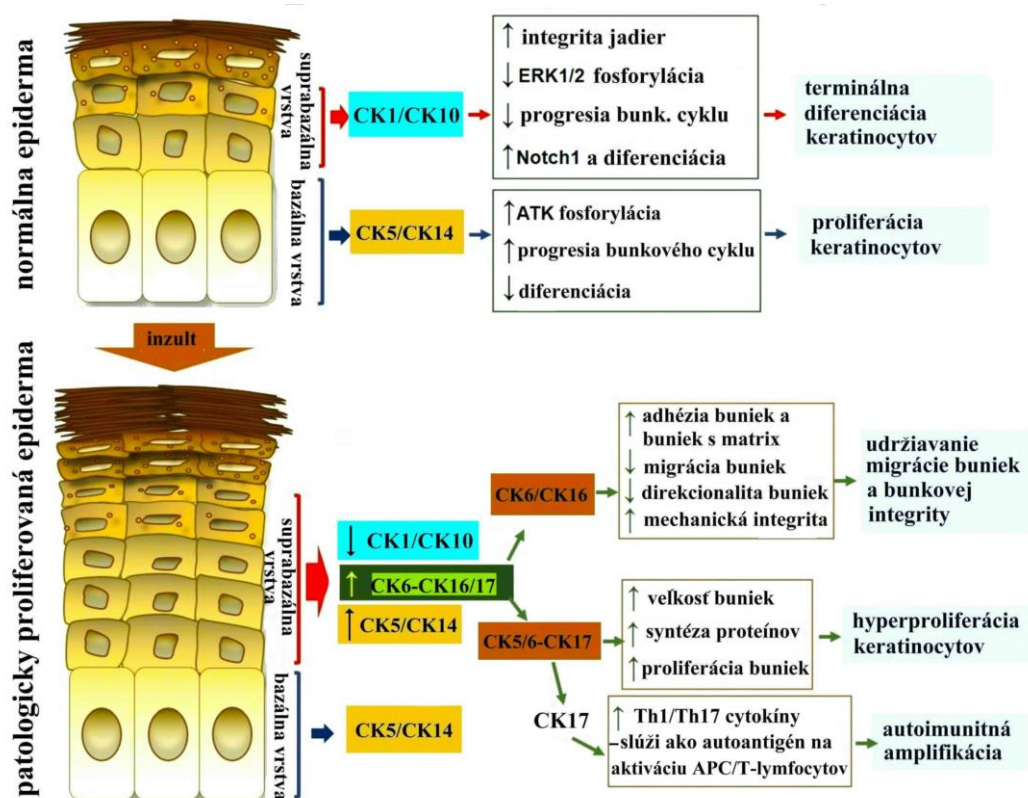
Obr. 1 Intenzívna pozitivita CK17 (čierna šípka) pri seboroickej keratóze. Okolitá epiderma je negatívna (biela šípka; zväčšenie 10x)



Obr. 2 Intenzívna pozitivita CK17 (čierna šípka) pri prurigo nodularis. Okolité epiderma je negatívna (biela šípka; zväčšenie 20x)



Obr. 3 Intenzívna pozitivita CK17 (čierna šípka) pri clavuse na nohe. Zoskupenia CK17-pozitívnych keratinocytov sa vyskytujú aj v okolitej epiderme (biele šípky; zväčšenie 10x)



Obr. 4 Schéma produkcie cytokeratínov v epiderme za fyziologických a patologických okolností. (prevzaté z ref. 6)

Paradoxná kožná reakcia u pacientky liečenej IL17 inhibítorom - klinický a histopatologický pohľad

Péčová, T.¹, Vorčáková, K.¹, Péč, M.², Adamicová, K.³, Péč, J.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Dermatovenerologická klinika, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, I. Interná klinika, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej anatómie, Martin
tpecova@gmail.com

Abstract

The authors present a case of patient with chronic plaque psoriasis treated with IL17 inhibitor ixekizumab. After two months of treatment, skin reaction appeared starting as exanthema, mimicking drug reaction exanthema, and evolving into anti-IL-17 induced paradoxical reaction. Paradoxical reactions were previously described as anti-TNF-alpha inhibitor class effect, but with arrival of the new drug classes, there are new manifestation of skin reactions which need to be addressed by clinician as well as pathologist.

Keywords: chronic plaque psoriasis, ixekizumab, IL17 inhibitors, paradoxical reactions

Úvod

Biologická liečba je inovatívna vysoko účinná liečba u pacientov so stredne ťažkou až ťažkou chronickou ložiskovou psoriázou. Okrem terapeutického účinku s remisiou kožných lézií však môže biologická liečba spôsobiť aj pestrú paletu nežiaducich kožných prejavov - od rozvoja paradoxnej psoriázy cez reakcie v mieste vpichu až po kandidové infekcie v závislosti od typu biologika [1].

Materiál a metodika

Autori prezentujú kazuistický prípad pacientky s chronickou ložiskovou psoriázou a súčasne prítomnou palmoplantárnou pustulóznou psoriázou, u ktorej počas liečby inhibítorom interleukínu 17 (IL17) ixekizumabom došlo k rozvoju paradoxnej reakcie.

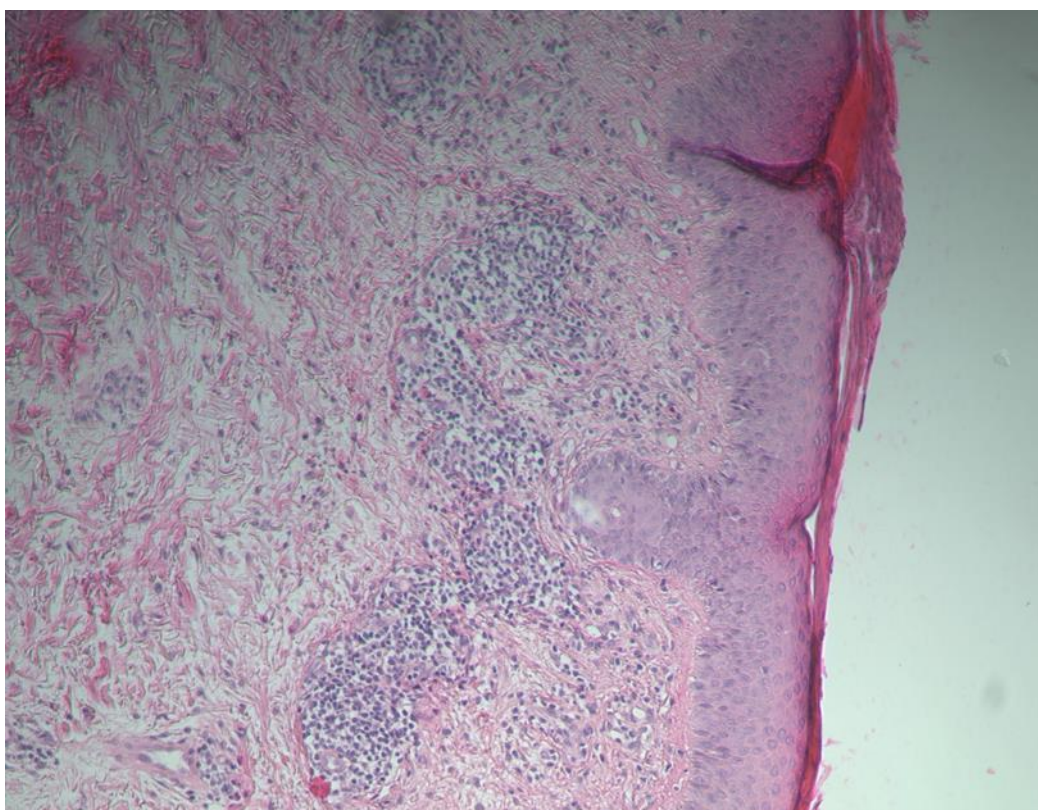
Výsledky

73-ročná pacientka s chronickou ložiskovou psoriázou s palmoplantárnou pustulóznou psoriázou sledovaná dermatológom od 40 rokov veku, kedy sa manifestovali prvé prejavy ochorenia v oblasti rúk a kapilícia. V roku 2015 z ložiska na dlani bola histologicky verifikovaná palmoplantárna pustulózná psoriáza. Konvenčnú systémovú liečbu pacientka netolerovala a lokálna fotochemoterapia a UVB fototerapia nevedla k stabilizácii ochorenia, preto bola u pacientky indikovaná biologická liečba. Počas prvolíniovej biologickej liečby adalimumab v štandardnom dávkovacom režime 40 mg s.c. každých 14 dní nedošlo k zásadnému terapeutickému zlepšeniu, preto bola liečba ukončená a ako druhá línia biologickej liečby bol zavedený do liečby ixekizumab v iniciačnej dávkovacej schéme 160 mg s.c. v 0. týždni a následne 80 mg s.c. v 2., 4., 6., 8., 10. a 12. týždni. Po začatí liečby ixekizumabom došlo u pacientky k rýchlej regresii psoriatických prejavov vrátane ložísk na dlaniach, doposiaľ terapeuticky refraktérnych. Po dvoch mesiacoch liečby došlo po podaní injekcie u pacientky k tvorbe exantému s prítomnosťou Quinckeho edému s časovou koreláciou s podaním ixekizumabu. Liečba ixekizumabom bola ukončená, pre progresiu prejavov a šírenie

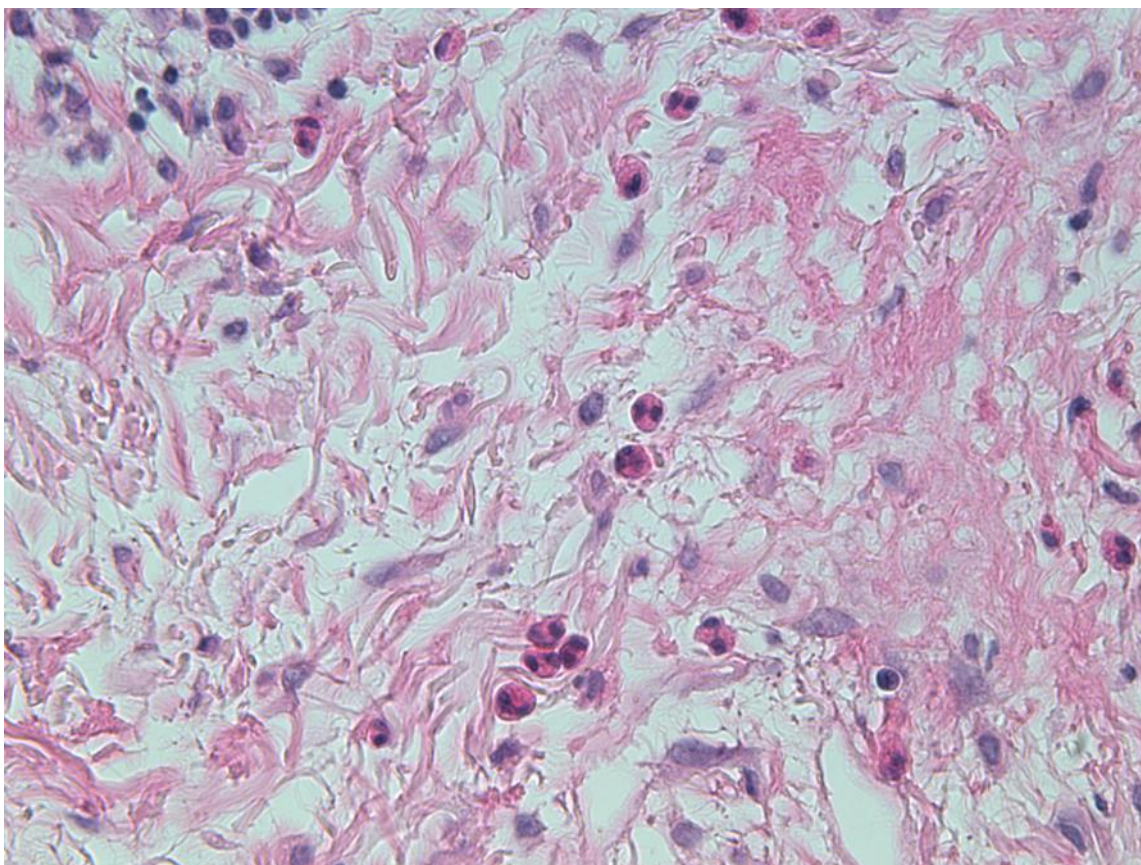
infiltrovaných erytematóznych ložísk z horných končatín a trupu na dolné končatiny bola pacientka hospitalizovaná, a nastavená na antihistaminiká. Klinicky jasnočervené ostro ohraničené plaky s deskvamáciou imponovali ako psoriaziformná paradoxná reakcia. Laboratórne bola prítomná eozinofília, autoprotilátky boli v rámci referenčných hodnôt, realizovaná biopsia kože z infiltrovaného ložiska na predlaktí však potvrdila superficiálnu perivaskulárnu, prevažne lymfocytovú dermatitídu s početnou prímiesou eozinofilov, pričom histopatologický nález imponoval ako alergická urtikariálna reakcia kože (vo vyšetrenej vzorke bola prítomná tenšia epiderma s vyhladenou dermo-epidermálnou junkciou (DEJ), na povrchu bola komptaktná keratóza s ložiskami parakeratózy a retikulárna derma hrubšia s miernym edematóznym priesakom). O mesiac pacientka bola hospitalizovaná pre recidívu s generalizáciou prejavov až prechodom do erythrodermie a vzhľadom na klinický obraz bola nastavená na perorálnu liečbu kortikoidmi s dosiahnutím regresie prejavov.



Obr. 1 Erythrodermia s psoriaziformným charakterom ložísk



Obr. 2 Superficiálna perivaskulárna prevažne lymfocytový dermatitída. HE, zväčšenie 10x



Obr. 3 Prítomnosť disperzných eozinofilov v tkanive. HE, zväčšenie 40x

Diskusia

Paradoxné reakcie sú známou komplikáciou pri liečbe biologikami zo skupiny TNF-alfa inhibítorov. U pacientov môže paradoxne dôjsť k rozvoju psoriaziformnej reakcie, histopatologicky sa líšiacej od psoriázy - aj keď histologické vzorky zvyknú vykazovať známky psoriaziformnej a/alebo spongiotickej (ekzematoidnej) štruktúry, tieto lézie neboli konzistentné na molekulárnej úrovni s psoriázou a ekzémom s použitím chemokínového (C-C motív) ligandu 27 / indukovateľného klasifikátora syntázy oxidu dusnatého [2]. Anti-TNF-alfa indukované lézie vykazovali vyššie hladiny interferónu alfa (IFN-alfa) ako psoriatické alebo ekzémové ložiská [2]. Liečba inhibítormi IL17 predstavuje novú skupinu biologík s cieľným mechanizmom účinku [3, 4] vzhľadom na centrálnu postavu IL17 v etiopatogenéze psoriázy [5]. Ekzematózne dermatózy sa ukazujú ako nežiaduci účinok spojený s liečbou IL17 inhibítormi. V retrospektívnej štúdií na kohorte 185 pacientov [6] so stredne ťažkou až ťažkou chronickou ložiskovou psoriázou liečených inhibítormi IL17 sa ekzematózna dermatitída objavila u 2,2% pacientov po priemerne 13,5 týždni liečby. Patch testy u všetkých pacientov boli negatívne, len u 1 pacienta sa podarilo reakciu zvládnuť topickými kortikosteroidmi bez nutnosti zmeny liečby. Ekzematózne dermatitídy boli popísané u 5-20% pacientov so zápalovými ochoreniami liečenými TNF-alfa inhibítormi, u pacientov liečených inhibítormi IL17 a IL12/23 boli doposiaľ popisované len zriedkavo [6]. Novšia retrospektívna analýza [7] kohorty pacientov z rokov 2016 až 2019 hodnotila dáta 468 pacientov liečených inhibítormi IL17, kde 5,8% pacientov malo kožnú reakciu. Z toho 40,7% pacientov malo klasický ekzém, 40,7% pacientov prejavy podobné atopickej dermatitíde a 18,5% pacientov psoriaziformnú reakciu. Histopatológia u 12 vzoriek z celkovo vyšetrených 27 preukázala epidermálnu spongiózu [7].

Záver

Dáta z klinickej praxe často ukazujú vedľajšie účinky liekov nepopisované v randomizovaných kontrolovaných klinických skúšaníach. Monitoring pacientov na inovatívnej liečbe je základným predpokladom definovania spektra možných vedľajších reakcií. Vzhľadom na histopatologickú nešpecifickosť reakcií popisovaných pri inhibícií TNF alfa je možné očakávať podobné nešpecifické histopatologické obrazy aj pri dermatitídach indukovaných IL17 inhibítormi.

Literatúra

- [1] Otani, *Curr Allergy Asthma Rep.* **2018**, 12:<https://doi.org/10.1007/s11882-018-0764-z>.
- [2] Stoffel, *Br J Dermatol.* **2018**, 178(5):1151–1162.
- [3] Langley, *N Engl J Med.* **2014**, 371(4):326–338.
- [4] Gordon, *N Engl J Med.* **2016**, 375(4):345–356.
- [5] Furue, *G Ital Dermatol Venereol.* **2016**, 154(4):418–424.
- [6] Napolitano, *Br J Dermatol.* **2019**, 181(3):604–606.
- [7] Caldarola, *Expert Opin Biol Ther.* **2020**, 20(6):665–672.

Zavedenie a optimalizácia metódy na detekciu hypermetylácie génu *GRIA4* na komerčných kontrolách a kontrolných vzorkách z konvenčnej a tekutej biopsie

Lukáčová, E.¹, Burjanivová, T.¹, Malicherová, B.², Lasabová, Z.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav molekulovej biológie a genetiky, Martin ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav klinickej biochémie, Martin
lukacova114@uniba.sk

Abstract

According to incidence, colorectal cancer is the third most common oncological malignancy worldwide and most common cancer in Slovakia. Around 20-30% of colorectal carcinoma cases arise through the serrated neoplastic pathway. This pathway is characterized by an activating mutation in *BRAF* or *KRAS* gene, followed by aberrant hypermethylation. Aberrant DNA methylation, as an epigenetic modification, represents another promising biomarker for cancer detection and monitoring and have potential clinical use as diagnostic and prognostic tools. In this study, we focused on the development and optimization of methylation-specific Droplet Digital PCR method for *GRIA4* hypermethylation detection. After optimization, we manifested this method on three different samples: healthy donor saliva sample (0,78% methylation), colorectal cancer patient tissue sample (67% methylation) and melanoma patient plasma sample (3,3% methylation). We chose Droplet Digital PCR as a detection method due to its high sensitivity, which is needed in the case of plasma methylation detection.

Keywords: colorectal cancer, liquid biopsy, DNA methylation, Droplet Digital PCR

Úvod

Kolorektálny karcinóm (KRK) je jedno z najčastejších sa vyskytujúcich nádorových ochorení v ekonomicky rozvinutých krajinách, čo je pripisované životnému štýlu a stravovacím návykom. Podľa databázy GLOBOCAN 2020 sú, z pohľadu incidencie, kolorektálne nádory celosvetovo 3. najčastejšie a na Slovensku najčastejšie sa vyskytujúce onkologické malignity [1].

Približne 20-30% kolorektálnych karcinómov vzniká cez serátnu hyperplastickú dráhu [2]. Molekulárne abnormality serátnej dráhy zahŕňajú aktivačné mutácie génov *BRAF* a *KRAS* a aberantnú metyláciu, tzv. hypermetylačný CIMP fenotyp (CpG Island Methylated Phenotype). V roku 1999, Toyota a kol. navrhli výraz CIMP na opis podmnožiny kolorektálnych karcinómov, ktoré vykazujú rozsiahlu hypermetyláciu CpG dinukleotidov [3]. Metylácia je epigenetický mechanizmus, ku ktorému dochádza pridaním metylovej (CH₃) skupiny k DNA, čím sa modifikuje funkcia a ovplyvňuje expresia génov. Najviac charakterizovaným procesom metylácie DNA je kovalentné pridanie metylovej skupiny na 5-uhlík cytozínu, na CpG ostrovoch. Tento proces je katalyzovaný DNA-metyltransferázou (DNMT) za prítomnosti S-adenozylmetionínu, ktorý figuruje ako donor metylovej skupiny. Aberantná metylácia DNA vo forme hypermetylácie CpG ostrovčekov môže viesť k potlačeniu transkripcie tumor supresorových génov [4].

Tekutá biopsia je alternatívou k štandardnej chirurgickej biopsii a poskytuje nám informácie o nádore prostredníctvom jednoduchého odberu krvi. Krv onkologických

pacientov obsahuje materiál derivovaný z nádoru, ktorý cirkuluje v krvi, cirkulujúce nádorové bunky (CTC) a cirkulujúcu tumorovú DNA (ctDNA) [5]. CtDNA je fragmentovaná dvojvláknová DNA uvoľnená do krvi apoptotickými a nekrotickými nádorovými bunkami, alebo aktívnym nádorovým uvoľňovaním [6]. Cirkulujúca nádorová DNA sa nachádza v bezbunkovej frakcii spolu s bezbunkovou DNA (cfDNA) pochádzajúcou zo somatických, hlavne hematopoetických buniek [7]. Táto frakcia sa môže veľmi líšiť v závislosti od veľkosti a typu nádoru, proliferatívneho štádia, reakcie na liečbu, úrovne vaskularizácie atď. [8]. V porovnaní so štandardnou chirurgickou biopsiou je tekutá biopsia neinvazívna a efektívna metóda, ktorá poskytuje komplexný molekulárny profil nádoru.

Droplet Digital PCR (ddPCR) je vysoko citlivá metóda, ktorej kľúčovým aspektom je technológia rozdelenia vzorky do približne 20 000 kvapiek. Na túto procedúru je potrebný tzv. kvapky-generujúci olej (Droplet Generation Oil), do ktorého je nukleová kyselina zaobalená. V každej jednotlivkej kvapke sa následne uskutoční DNA amplifikácia pomocou PCR. Každá kvapka je analyzovaná samostatne, za použitia fluorescenčného detekčného systému. Na značenie slúžia TaqMan próby FAM (modrá) a HEX/VIC (zelená). Táto technika vyžaduje menšie vstupné množstvo DNA ako iné komerčne dostupné digitálne systémy PCR, čo znižuje náklady a zachováva cenné vzorky. Dokáže taktiež detegovať nízko koncentrované vzorky a je to mimoriadne citlivá a ekonomická metóda kvantifikácie DNA bez štandardných kriviek.

Materiály a metódy

Komerčné kontroly a kontrolné vzorky

Na zavedenie metódy a ako kontrolné vzorky boli použité komerčne dostupné kontroly, plne metylovaná DNA a plne nemetylovaná DNA kontrola EpiTect (Qiagen, Hilden, Nemecko). Kontrolné vzorky boli sliny od zdravého darcu, nádorové tkanivo od pacienta s kolorektálnym karcinómom a plazma od pacienta s malígnym melanómom.

Izolácia a bisulfidová modifikácia DNA

Na izoláciu genomickej DNA zo vzoriek nádorových/nenádorových tkanív bol použitý komerčný kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany), podľa pokynov výrobcu. Periférna krv pacientov bola odoberaná do EDTA skúmaviek. Centrifugáciou separovaná plazma bola potom skladovaná pri -80 °C, až kým sa neuskutočnila extrakcia. Cirkulujúca DNA bola následne z plazmy vyizolovaná za pomoci QIAamp DSP Virus Kit (Qiagen, Hilden, Germany), podľa pokynov výrobcu. Na bisulfitovú konverziu gDNA a cirkulujúcej DNA pacientov bol použitý EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany), podľa pokynov výrobcu.

Príprava ddPCR reakčného mixu

Reakčná zmes obsahovala Master Mixu, ktorý sa skladal zo supermixu pre próby, primerov, metylačne špecifickej próby (*M-Próby*) a próby, ktorá bola komplementárna k nemetylovanej sekvencii (*U-Próby*) (pozn.: Unmethylated) a vzorku nariadenú vodou na koncentráciu 300 - 3000 kópií na reakciu.

Vytvorenie kvapôčok v QX200™ Droplet Generator a PCR v T100™ Thermal Cycler
Celý objem reakčného mixu bol prepipetovaný do stredných radov DG8™ Cartridge (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA) a do spodných jamiek DG8™ bol nanosený kvapky-generujúci olej (Droplet Generation Oil). Kazeta sa potom umiestnila do generátora kvapiek QX200™ Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA), ktorý produkuje okolo 20 000 kvapiek na vzorku. Vytvorené kvapky

sa potom prepipetovali do 96-jamkovej doštičky. PCR doštička bola pokrytá prepichnuteľnou fóliou a tepelne utesnená pomocou Bio-Rad PX1™. PCR prebehla v termálnom cykleri T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA).

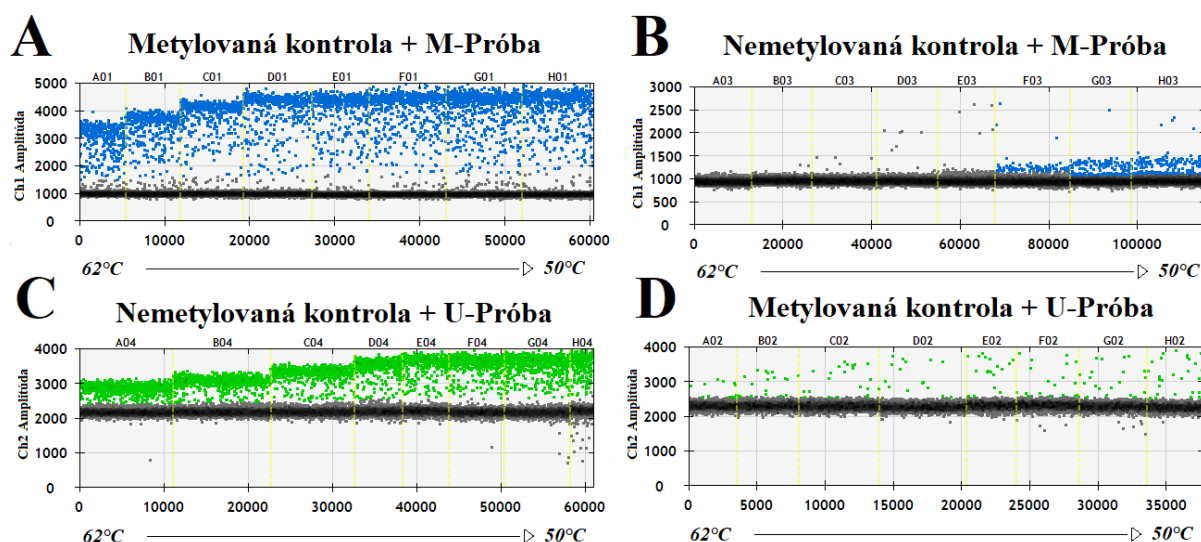
Analýza v QX200™ Droplet Reader a v QuantaSoft™ softvéri

Po PCR amplifikácii bola 96-jamková doštička premiestnená do QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA), ktorý analyzuje každú kvapku samostatne za použitia dvojfarebného fluorescenčného detekčného systému. Dáta získané z QX200™ boli analyzované a interpretované softvérom QuantaSoft™ v.1.7 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA). Rozdelené boli do troch klastrov a to podľa analýzy fluorescenčnej emisie vo vlnových dĺžkach HEX alebo FAM. Kvapky obsahujúce metylovanú DNA s vysokou amplitúdou FAM, kvapky obsahujúce nemetylovanú DNA s vysokou amplitúdou HEX a prázdne kvapky bez DNA boli farebne rozdielne. Prahová hodnota bola nastavená pomocou softvéru QuantaSoft™ manuálne pri najnižšej amplitúde, ktorá zachytáva skutočný negatívny klaster, na základe signálov pozitívnej a negatívnej komerčnej kontroly.

Výsledky

1. Vytvorenie optimálnych podmienok pre amplifikáciu v termálnom cykleri

Na zadefinovanie optimálnych podmienok pre amplifikáciu v termálnom cykleri, bol vytvorený teplotný gradient v rozmedzí teplôt 50°C-62°C. Vzorky kontrolnej metylovanej a nemetylovanej DNA boli podrobené rôznym annealingovým teplotám (Obr.1), ktorých výsledkom bola najlepšia teplota 55-56 °C. Pri výbere teploty sa brala do úvahy amplitúda a špecificita väzby.

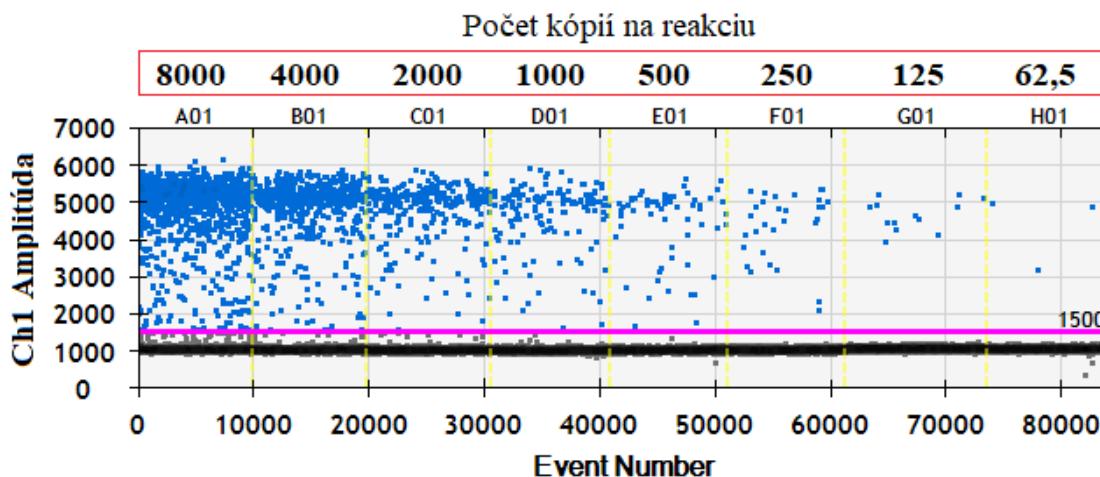


Obr. 1 Termálny gradient na optimalizáciu annealingovej teploty: 1D ploty zobrazujúce negatívne a pozitívne kvapôčky metylovanej a nemetylovanej DNA kontroly amplifikovanej pri ôsmich rôznych teplotách, v rozmedzí 50-62 °C. Modré (FAM značené) kvapôčky sú metylované (A) a zelené (HEX značené) sú nemetylované (C). Nemetylovaná kontrola s M-Próbou (B) a metylovaná kontrola s U-Próbou (D) boli využité na detekciu nešpecifickej väzby

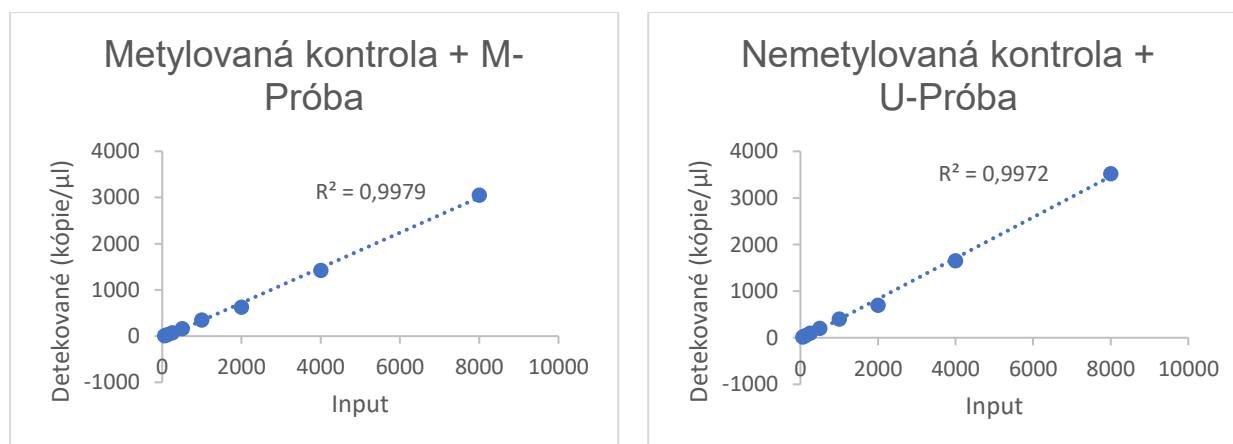
2. Koncentračný gradient a treshold

Druhý krok bol koncentračný gradient ôsmich rôznych riedení DNA kontrol, na potvrdenie dynamického rozsahu a linearity metódy. Na riediacu radu bola použitá metylovaná (Obr. 2) a nemetylovaná DNA kontrola v koncentráciách 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 a 62,5 kópií/reakciu. Obe kontroly boli kombinované s M-

Próbou aj U-Próbou, tak ako to bolo aj pri teplotnom gradiente. Pri výbere najlepšej koncentrácie sa brala do úvahy amplitúda, celkový počet pozitívnych kvapôčiek a špecificita väzby. Pri tomto experimente boli taktiež zadefinované tresholdové hodnoty a linearita eseje (Graf 1, 2).



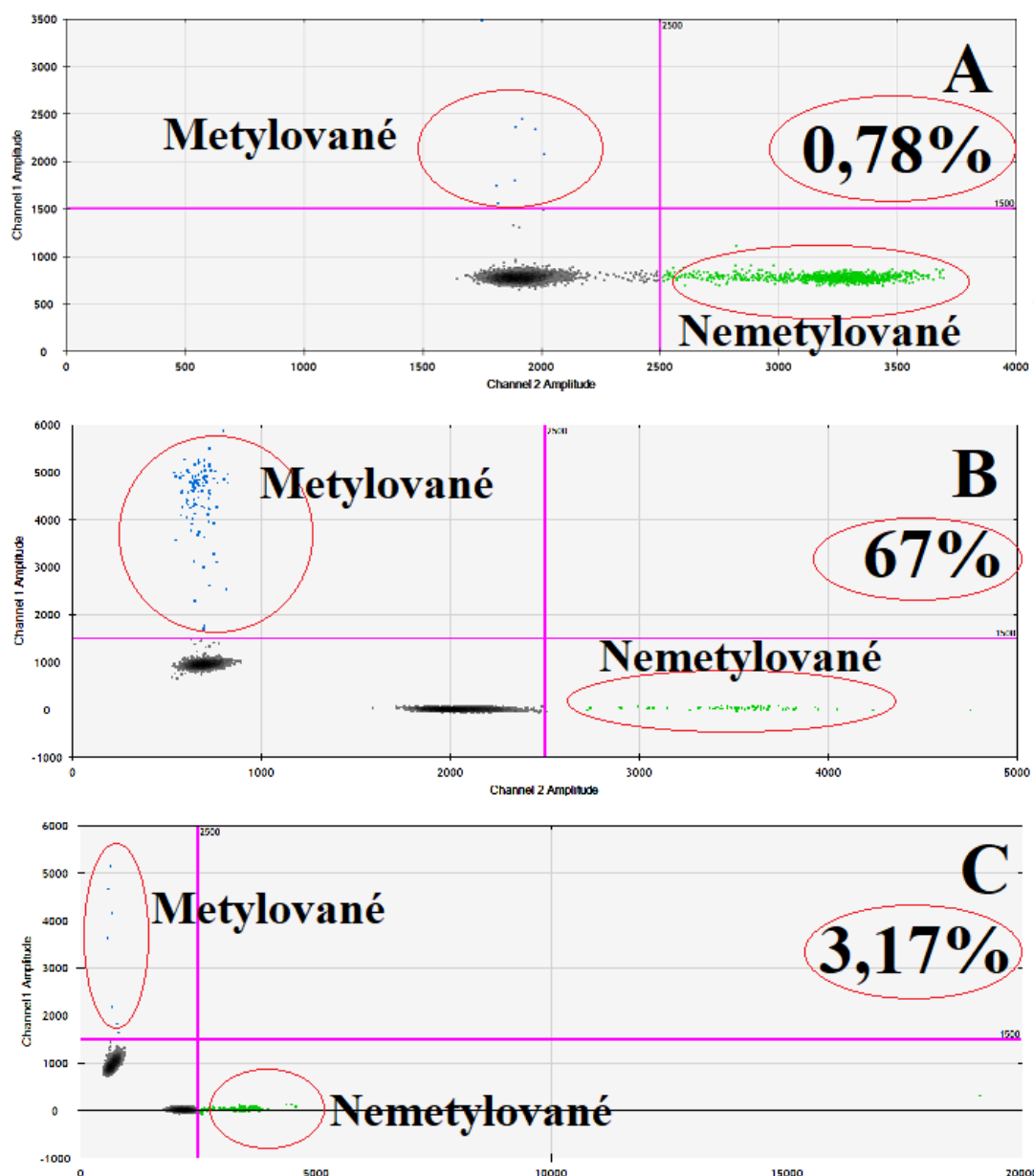
Obr. 2 Ukážka koncentračného gradientu metylovanej kontroly s M-Próbou: 1D plot zobrazujúci negatívne a pozitívne kvapôčky metylovanej DNA v koncentráciách 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 a 62,5 kópií/20 μ l. Pozitívne sú od negatívnych oddelené tzv. tresholdom, teda prahovou hodnotou detekcie vznikajúcej fluorescence



Graf 1 a 2 Grafy linearity: Korelačný koeficient je u metylovanej kontroly (s M-Próbou) rovný 0,9979, u nemetylovanaj kontroly (s U-Próbou) je $R^2=0,9972$

3. Aplikácia metylačne-špecifickej eseje na kontrolné vzorky genomickej a cirkulujúcej DNA

Metylácia promotóru génu *GRIA4* bola detegovaná u troch kontrolných vzoriek: vzorka slín od zdravého darcu, nádorové tkanivo od pacienta s kolorektálnym karcinómom a nádorová plazma od pacienta s melanómom.



Obr. 4 Quantasoft™ výstupy troch kontrolných vzoriek: **A:** zdravá vzorka slín obsahovala 18 metylovaných a 2460 nemetylovaných kópií, teda 0,78% metylácia **B:** u nádorového tkaniva bola detegovaná metylácia u 232 kópií z celkového počtu 348, teda 67%, **C:** v nádorovej plazme bolo zachytených 14 metylovaných kópií génu z celkového počtu 442 kópií génu, teda 3,17%

Diskusia

Hypermetylačný CIMP fenotyp je charakteristickým znakom kolorektálnych karcinómov vznikajúcich serátnou dráhou. U pacientov s KRK bolo identifikovaných množstvo metylovaných génov súvisiacich s rakovinou, napríklad *MLH1* [9], *CDKN2A/p16* [10] a iné.

Barault *et.al.*, (2018) zverejnili výsledky celogenómovej metylačnej štúdie na mikročipoch, ktorá identifikovala často metylované gény u kolorektálneho karcinómu. Identifikovali 5 kandidátnych génov s metyláciou špecifickou pre rakovinové zmeny a nie ako dôsledok diferenciácie bunkovej línie. Išlo o gény *EYA4*, *GRIA4*, *ITGA4*, *MAP3K14-AS1* a *MSC* [11]. O rok neskôr, Hauptman a kolektív vykonali analýzy dráh a funkčnosti na 198 rôzne exprimovaných génoch a vybrali šesť génov: *CEP55*,

FOXD3, *FOXF2*, *GNAO1*, *GRIA4* a *KCNA5* ako potenciálne diagnostické markery kolorektálneho karcinómu [12]. Len nedávno, v roku 2020, Vega-Benedetti *et.al.* navrhli gény *GRIA4* a *VIPR2* ako metylačné biomarkery na skorú detekciu KKR [13]. Všetky tri štúdie majú spoločného menovateľa, gén *GRIA4*. V prvej štúdii, 71,3% pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom vykazovali metylačnú pozitivitu pre *GRIA4* gén [11]. V druhej štúdii bola hypermetylácia génu *GRIA4* prítomná u 97,3% vzoriek a bol to najviac metylovaný gén spomedzi 6 ďalších potenciálnych markerov [12]. V tretej štúdii bol metylovaný promótor *GRIA4* detegovaný aj vo vzorkách stolice a bol navrhnutý ako biomarker pre včasnú diagnostiku kolorektálneho karcinómu [13].

My sme sa rozhodli vytvoriť metylačne-špecifickú esej práve na gén *GRIA4* a budeme ju aplikovať na vzorky plazmy pacientov s kolorektálnym karcinómom. Na našich kontrolných vzorkách bola detegovaná metylácia u genomickej aj cirkulujúcej DNA. Na detekciu metylácie z plazmy sme vybrali Droplet Digital PCR metódu z toho dôvodu, že je senzitívna a dokáže detegovať rôzne genetické/epigenetické aberácie z nízkeho množstva alebo nízko koncentrovaných vzoriek. Keďže výťažok cirkulujúcej DNA z plazmy je porovnateľne nižší ako výťažok genomickej DNA z nádorového tkaniva a po bisulfidovej konverzii sa degraduje viac ako 90% DNA, na detekciu metylácie je potrebná vysoko citlivá metóda ako ddPCR.

Záver

Uvedomenie si, že zmeny v génovej expresii, vzniknuté v dôsledku epigenetických modifikácií, zohrávajú zásadnú úlohu vo vývoji a progresii rakoviny, je jedným z najvýznamnejších prelomov v molekulárnej biológii nádorov za posledné dve desaťročia. Okrem klinických a histopatologických markerov nám práve molekulárne biomarkery umožňujú zlepšiť detekciu, diagnostiku, prognózu a sledovanie terapeutickú odpoveď. Individualizácia liečby na základe molekulárno-biologických charakteristík nádoru významne zvyšuje efektivitu liečby, prognózu pacienta a chráni pacienta pred vedľajšími účinkami onkologickej liečby. Cirkulujúca nádorová DNA obsahuje molekulárne informácie o nádore a preto má veľký potenciál v nádorovej diagnostike a monitoringu. V našej štúdii, sme zaviedli a optimalizovali metylačne-špecifickú PCR na rýchlu detekciu *GRIA4* metylácie s vysokou citlivosťou a špecifickosťou. Táto technika môže poskytnúť rýchly a neinvazívny záchyt aberantnej metylácie u pacientov v skorých štádiách kolorektálneho karcinómu.

Práca bola podporená grantami VEGA č. 1/0380/18, VEGA č. 1/0205/20, Grant UK/25/2021 a LISPER (Integratívna stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života)

Literatúra

- [1] Global Cancer Observatory (GCO), IARC. **2020**, <https://gco.iarc.fr/>.
- [2] Bettington, *Histopathology*. **2013**, 62(3):367–386.
- [3] Toyota, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1999**, 96(15):8681–8686.
- [4] Merlo, *Nature medicine*. **1995**, 1(7):686–692.
- [6] Jahr, *Cancer research*. **2001**, 61(4):1659–1665.
- [7] Moss, *Nature communications*. **2018**, 9(1):1–12.
- [8] Bettingowda, *Science translational medicine*. **2014**, 6(224):224ra24–224ra24.
- [9] Kane, *Cancer research*. **1997**, 57(5):808–811.
- [10] Petko, *Clinical Cancer Research*. **2005**, 11(3):1203–1209.
- [11] Barault, *Gut*. **2018**, 67(11):1995–2005.
- [12] Hauptman, *BMC medical genomics*. **2019**, 12(1):1–17.
- [13] Vega-Benedetti, *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21(12):4494.

Využitie cirkulujúcej nádorovej DNA pri monitorovaní onkologických ochorení

Burjanivová, T.¹, Lukáčová, E.¹, Lasabová, Z.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav molekulovej biológie a genetiky, Martin
BTatiana@seznam.cz

Abstract

The circulating tumour DNA (ctDNA) is a type of extracellular DNA that is present in the peripheral blood of patients with various malignancies. CtDNA analysis through liquid biopsy has a great potential for its use in oncology. Liquid biopsy has revolutionized cancer detection. It enables sensitive detections of genetic and epigenetic alterations in circulating tumor DNA of oncological patients. It is useful not only for diagnosis but also to monitor tumors more effectively and for assessing tumor heterogeneity. This non-invasive method could be beneficial for the patients in comparison to traditional biopsies, because it reveals information on all tumor sites and it is safer and less painful for the patient.

Keywords: liquid biopsy, circulating tumor DNA, Cancer screening

Úvod

Histopatologické vyšetrenie je stále zásadné pre presnú diagnostiku, klasifikáciu a charakterizáciu nádorových ochorení. Tieto vyšetrenia majú stále nezastupiteľnú úlohu v diagnostike a manažmente onkologických ochorení. Konvenčná biopsia má však viacero úskalí. Získanie biologického materiálu môže byť pre pacienta bolestivý zákrok a nie vždy je možné odbery biologického materiálu opakovať. Odber z jedného miesta nám neposkytne informáciu o genetickej heterogenite nádoru. Okrem toho môže dôjsť pri konvenčnej biopsii ku rozsevu nádorových buniek v trase punkčnej ihly. V kontraste ku konvenčnej biopsii sa ukázala byť atraktívnou možnosťou analýza cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) u pacientov s onkologickými ochoreniami. Neinvazívnu analýzu cirkulujúcej nádorovej DNA spolu s neinvazívnymi analýzami cirkulujúcich nádorových buniek označujeme ako tzv. tekutá biopsia (z angl. „liquid biopsy”).

Prítomnosť fragmentovanej bezbunkovej DNA bola prvýkrát popísaná v roku 1948 Mandelom a Metaisom [1]. Zvýšená hladina fragmentovanej mimobunkovej DNA bola prvýkrát u pacientov popísaná v roku 1977 [2]. Cirkulujúca fragmentovaná DNA býva zvýšená aj pri cievnej mozgovej príhode [3], cvičení [4], úrazoch [5], transplantáciach [6], a infekcii [7]. Fragmentovanú bezbunkovú DNA, v ktorej je možné nájsť nádorové mutácie pacienta s onkologickými ochoreniami nazývame ako bolo spomenuté v texte cirkulujúcou nádorovou DNA. Voľná cirkulujúca fetálna DNA (*cffDNA*) v krvi tehotnej matky bola ako prvá popísaná Dr. Lo a spolupracovníkmi v roku 1997 [8]. Predpokladaným zdrojom voľnej cirkulujúcej DNA sú bunky trofoblastu. Táto DNA cirkuluje v krvnom obeh v krátkych fragmentoch (menej ako 200 bp) po degradácii trofoblastu. Hoci koncentrácia voľnej fetálnej DNA počas tehotenstva stúpa, najskôr ju môžeme detegovať od 4. týždňa. Neinvazívne prenatálne testovanie sa dá využiť pre zisťovanie aneuploidii ako je napr. Downov syndróm [9]. V roku 1989 Stroun a spoluautori ukázali, že niektoré voľne cirkulujúce DNA vyskytujúce sa v plazme pacientov s nádorovým ochorením pochádzajú z nádorových buniek [10]. *KRAS* mutácie, ktoré boli v tkanivách v kolorektálnom karcinóme [11], nádoroch pľúc [12]

a pankrease [13] boli identické ako *KRAS* mutácie v cirkulujúcej nádorovej DNA. Mutácie v cirkulujúcej nádorovej DNA sú vysoko špecifické a preto sa dajú využívať ako prognostické a prediktívne markery u pacientov s onkologickými ochoreniami. Zdrojom cirkulujúcej fragmentovanej bezbunkovej DNA je apoptóza (regulovaný proces zaistujúci odstránenie nepotrebných a poškodených buniek, pri ktorom vznikajú z rozpadajúcej sa bunky apoptotické telieska), nekróza (na rozdiel od apoptózy sa jedná o patologický proces spôsobený mechanickými, chemickými alebo biologickými faktormi, pri ktorom praskne cytoplazmatická membrána a obsah sa vyleje do prostredia) alebo uvoľňovanie živými bunkami [10]. Cirkulujúca nádorová DNA má aj klinické využitie. Príkladom sú analýzy mutácií génu *KRAS* v plazme pacientov s kolorektálnym karcinómom [14]. K zlepšeniu záchytu zriedkavých mutácií v ctDNA prispelo zavedenie technológie droplet digital PCR v roku 1999 [15]. Pri droplet digital PCR prebieha reakcia v emulzných kvapkách. K vytváraniu dochádza ešte pred samotnou reakciou v droplet generátore, kde sa spoja kvapky reakčnej zmesi s olejovými kvapkami na vytvorenie emulzie vodného roztoku s olejom. V droplet digitálnej PCR prebieha štandardná PCR v každej mikrokvapke zvlášť, takže v závislosti na počte mikrokvapiek je možné dosiahnuť tisíce až niekoľko desiat tisíc parciálnych kvalitatívnych výsledkov na báze fluorescencie (pozitívne/negatívne) pre analyzovanú vzorku. Pokiaľ je objem kvapôčky známy, frakcia pozitívnych kvapôčok sa potom použije na výpočet absolútnej koncentrácie cieľovej sekvencie. Kvantifikácia cieľovej sekvencie v prípade digitálnej PCR prakticky nezávisí na počte amplifikačných cyklov, čo významne eliminuje závislosť na exponenciálnom náraste množstva výsledného PCR produktu, ako je to v konvenčnej PCR či real-time PCR, a umožňuje tak absolútnu kvantifikáciu. Hlavnou výhodou tohto prístupu je absolútna kvantifikácia, bez nutnosti zostrojenia kalibračnej krivky. Na našom pracovisku sa nám úspešne podarilo zaviesť technológiu ddPCR vhodnú na detekciu *BRAFV600E* mutácie u pacientov s malígnym melanómom aj v archivovanom materiáli, akým sú parafínové bločky aj z cirkulujúcej nádorovej DNA získanej z plazmy, čo môže prispieť ku skvalitneniu diagnostiky aj ako sledovania odpovede na liečbu [16, 17]. Koncentrácia ctDNA koreluje u onkologických pacientov s veľkosťou nádoru a so štádiom ochorenia. Pacienti s nižším štádiom nádorového ochorenia majú v plazme nižšie hladiny ctDNA v porovnaní s pacientmi s pokročilým stupňom nádoru a s horšou prognózou ochorenia [18]. Vyššia hladina ctDNA je asociovaná aj s horšou prognózou [19, 20]. Klinické využitie tekutej biopsie je vhodné aj na včasný záchyt ochorenia [17]. CtDNA sa dá takisto využiť na diagnostiku a monitorovanie progresie onkologického ochorenia. Pri pacientoch s kolorektálnym karcinómom boli detegované mutácie *KRAS* génu v ctDNA ešte pred nástupom ochorenia [21]. Štúdia, v ktorej bolo vyšetrených 640 pacientov s rôznymi typmi nádorov, ukázala 100-násobné zvýšenie koncentrácie ctDNA v štádiu IV v porovnaní so štádiom I onkologického ochorenia [22].

Ďalším príkladom využitia ctDNA je možnosť detekcie relapsu ochorenia a odpovede na liečbu. U pacientov s nádorom prsníka môže ctDNA slúžiť ako nástroj na ukázanie odpovede na chemoterapiu, takisto ctDNA identifikovala u týchto pacientov nástup relapsu [23]. CtDNA je možné aplikovať aj na detekciu vzniku sekundárnej rezistencie, ktorá je pri pacientoch s onkologickými ochoreniami pomerne častým javom. Príkladom sú mutácie *EGFR* pri pacientoch s nádorom pľúc, vznikajúce po liečbe cielenou terapiou. Detekcia vzniku sekundárnej rezistencie umožňuje predikovať recidívu ochorenia [24]. Tekutá biopsia nie je aplikovateľná na všetky typy nádorov. Pacienti s nádormi mozgu majú nízke hladiny ctDNA kvôli krvno-mozgovej bariére. Ako zdroj ctDNA sa dajú využiť aj iné tekutiny, ako je plazma [25]. Zdrojom ctDNA je

moč v prípade nádorov močového mechúra, prostaty a obličiek [26], stolica pri kolorektálnom karcinóme a karcinóme žalúdka [27] a stery z krčka maternice pri cervikálnych nádoroch [28].

Schválenie používania tekutej biopsie EMA (European Medicines Agency -Európska lieková agentúra) a FDA na detekciu prítomnosti nádorov aj jej využívanie v klinických štúdiách predstavujú míľnik v personalizovanej onkológii a otvárajú nové možnosti prinášajúce benefity pre pacientov s týmito závažnými ochoreniami. Aj napriek pokrokom v oblasti tekutej biopsie je potrebné si uvedomiť, že tieto vyšetrenia dopĺňajú konvenčné histologické vyšetrenie, ktoré má stále svoju nezastupiteľnú úlohu v diagnostike a manažmente liečby onkologických ochorení avšak tieto analýzy majú diagnostický a prognostický potenciál u pacientov s onkologickými ochoreniami, čo dokazuje neustály nárast publikácií venujúci sa tejto problematike. Takisto sa úspešne venujeme tejto problematike aj na našom pracovisku, čo dokazujú naše publikácie [16, 17].

Práca bola podporená grantami VEGA č. 1/0380/18, VEGA č. 1/0205/20, Grant UK/25/2021 a LISPER (Integratívna stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života)

Literatúra

- [1] Mandel, C R *Acad Sci Paris*. **1948**,142:241–3.
- [2] Leon, *Cancer Res*. **1997**, 37:646–650.
- [3] Tsai, *Clin. Chim. Acta*. **2011**, 412:476–479.
- [4] Breitbach, J. *Appl. Physiol*. **2014**, 117:119–130.
- [5] Rodrigues, J. *Neurotrauma*. **2014**, 31:1639–1646.
- [6] De Vlaminck, *Transl Med*. **2014**, 6:241ra77.
- [7] De Vlaminck, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **2015**, 112:13336–13341.
- [8] Lo, *Lancet*. **1997** 350:485–487.
- [9] Grendar, *Prenat Diagn*. **2017** Dec;37(12):1265.
- [10] Stroun, *Oncology*. **1989**, 6:318–322.
- [11] Sidransky, *Science*. **1992**, 256:102–105.
- [12] Mao, *Cancer Res*. **1994**, 54:1634–1637.
- [13] Caldas, et al., *Cancer Res*. **1994**, 54:3568–3573.
- [14] Lecomte, *Int. J. Cancer*. **2002**, 100:542–548.
- [15] Vogelstein, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **1999**, 96:9236–9241.
- [16] Malicherova, *Am. J. Transl. Res*. **2018**,10:3773–3781.
- [17] Burjanivova, *Genet Test Mol Biomarkers*. **2019**; 23:241–245.
- [18] Agassi, *American Journal of Clinical Pathology*. **2015**, 143(1):18–24.
- [19] Tjensvoll, *Mol Oncol*. **2016**,10:635–43.
- [20] Shaw, *Clinical Cancer Research*. **2017**, 23(1):88–96.
- [21] Lecomte, *Int J Cancer*. **2002**, 100:542–548.
- [22] Bettgowda, *Sci. Transl Med*. **2014**, 6:224ra24.
- [23] Gevensleben, *Clin Cancer Res*. **2013**,19:3276–84.
- [24] Seki, *Oncologist*. **2016**, 21:156–164.
- [25] Bettgowda, *Sci Transl Med*. **2014**, 6:224–224ra24.
- [26] Birkenkamp-Demtröder, *Eur Urol*. **2016**, 70:75–82.
- [27] Sidransky, *Science*. **1992**, 256:102–105.
- [28] Kinde, *Sci Transl Med*. **2013**, 5:167ra4.
- [29] European Medicines Agency. EMA. **2016**, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001016/WC500036358.pdf.
- [30] European Medicines Agency. EMA. **2016**, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/004124/WC500202022.pdf.

Molekulárne prognostické testy v diagnostike karcinómu prostaty

Dušenka, R.¹, Dušenková, S.², Kliment, st., J.¹, Eliáš, B.², Švihra ml., J.², Sivák, Š.³, Kliment, ml., J.², Ľupták, J.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Urologická klinika;
² Univerzitná Nemocnica Martin, Urologická klinika; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Neurologická klinika, Martin
rdusenka@gmail.com

Abstract

Prostate cancer is the most common visceral malignancy in men. The diversity of the disease, especially in the case of localized disease, represents care without the need for immediate therapeutic intervention. The second group of patients with high risk of localized disease is the group in whom the extent of treatment remains unclear (i.e., surgery, radiation therapy [RT], or combination therapy that includes surgery, RT, or androgen deprivation therapy [ADT]). Tests based on molecular characteristics with a better understanding of prostate cancer biology have led to the development of molecular tests that are more specific for prostate cancer. Prostate genomic scores Oncotype Dx and Decipher are multimarker assays that are specific for prostate cancer, commercially available and recommended by expert groups for risk stratification in clinically localized disease and, in the case of Decipher, for the selection of men for postprostatectomy radiation therapy (RT). Loss of phosphatase tumor suppressor and tensin homologue (PTEN) appears to be biologically relevant and clinically prognostic as one of the possible markers in untreated localized prostate cancer and in men treated for malignancy.

Keywords: prostatic cancer, molecular testing, prognostic testing

Úvod

Karcinóm prostaty predstavuje najčastejšiu viscerálnu malignitu u mužov. Pre rôznorodosť ochorenia takmer polovica pacientov, najmä s lokalizovaným ochorením, nevyžaduje okamžitú potrebu terapeutického zásahu [1]. Na druhej strane existuje skupina mužov s vyšším rizikom lokalizovaného ochorenia, u ktorých rozsah liečby ostáva nejasný (t.j. chirurgický zákrok, radiačná terapia [RT] alebo kombinovaná liečba, ktorá zahŕňa chirurgický zákrok, RT alebo androgén deprivačnú terapiu [ADT]). Stratifikácia rizika sa pri definovaní prognostických rizikových skupín tradične spolieha na klinicko-patologické charakteristiky, ako sú prostatický špecifický antigén, grading, klinické štádium, ako aj percento pozitívnych vzoriek z biopsie prostaty. Okrem toho boli na základe týchto klinicko-patologických parametrov (napr. Skóre Cancer of Prostate Risk Assessment Assessment [CAPRA] [2]) vyvinuté nomogramy a skórovacie modely na predikciu rizika progresie karcinómu prostaty. Diagnostický pokrok posledného desaťročia dramaticky zvýšil jednak chápanie biológie karcinómu prostaty, ako aj schopnosť získavať molekulárne informácie z malého množstva prostatického tkaniva. Spolu s týmito pokrokmi prišli aj nové dostupné a výhľadové biomarkerové testy na diagnostiku karcinómu prostaty založené na tkanivách, ktoré sľubujú pomoc pri určovaní prognózy karcinómu prostaty a pri rozhodovaní o liečebnom postupe. Súčasný molekulárny test, ktoré môžu lepšie určiť agresivitu rakoviny prostaty, boli vyvinuté na základe všeobecných znakov malignity (konkrétne indexov proliferácie), alebo molekulárnych znakov, ktoré sú pre karcinóm prostaty

konkrétnejšie. Tieto testy zahŕňajú testy založené na imunohistochemii (IHC) a testy založené na expresii RNA. Zatiaľ čo štúdie III. fázy klinických skúšaní potvrdia, ktoré z týchto genomických klasifikátorov by sa mali bežne používať, v texte sumarizujeme súčasne dostupné testy pre prognózu karcinómu prostaty a ich možné klinické aplikácie.

Dostupné testy

Podrobnejšie pochopenie biológie karcinómu prostaty viedlo k vývoju molekulárnych testov, ktoré sú konkrétnejšie prispôsobené karcinómu prostaty. Okrem toho rozšírená schopnosť využívať čerstvo zmrazené, formálnom fixované, parafínom zaliaté (FFPE) tkanivo umožnilo posúdenie expresie pomocou profilovania RNA v celom genóme na stanovenie markerov špecifických pre prognózu karcinómu prostaty.

Genomické skóre prostaty Oncotype Dx a Decipher sú multimarkerové testy, ktoré sú špecifické pre karcinóm prostaty, komerčne dostupné a sú odporúčané expertnými skupinami pre stratifikáciu rizika pri klinicky lokalizovanom ochorení a v prípade Decipheru pre výber pacientov pre postoperačnú radiačnú terapiu (RT). Strata supresora nádoru fosfatázy a tenzínového homológu (PTEN) sa javí ako biologicky relevantný a klinicky prognostický marker u neliečeného lokalizovaného karcinómu prostaty a u pacientov, ktorí sa podrobili liečbe ochorenia. Pre akceptáciu testu na používanie v klinickej praxi je potrebné ďalšie vyhodnotenie PTEN imunohistochemie (IHC) u pacientov diagnostikovaných biopsiou prostaty.

Genomický klasifikátor (Decipher)

Decipher (Decipher Biosciences, formálne Genome Dx) je dodatok k CLAR (Clinical Laboratory Improvements Amendments)/ CLIA/ College of American Pathologist (CAP) certifikovaný v celom genóme, ktorý využíva expresiu 22 markerov RNA (kódujúcich a nekódujúcich) za účelom predpovede vzniku metastáz a špecifickej úmrtnosti na karcinóm prostaty. Test bol vyvinutý porovnaním molekulárnych profilov u pacientov s vysokorizikovým karcinómom prostaty, u ktorých sa vyvinuli včasné metastázy po prostatektómii, s porovnateľnými skupinami pacientov s priaznivými výsledkami po operácii. Klasifikátor karcinómu prostaty s 22 markermi sa tiež nazýva genomický klasifikátor [3]. Expresia celého genómu sa testuje v tkanive a na základe expresie týchto 22 markerov sa určuje skóre klasifikátora rakoviny prostaty (v rozmedzí od 0 do 1). Decipher sa skúma ako prognostický nástroj u pacientov po radikálnej prostatektómii. Skúma sa tiež ako nástroj na usmernenie výberu aktívneho sledovania u pacientov so stredne rizikovým a nízkorizikovým karcinómom prostaty a použitie adjuvantnej alebo záchranej RT u pacientov s nepriaznivými patologickými črtami po radikálnej prostatektómii.

V zaslepanej validačnej štúdii mal Decipher hodnotu v multivariačnej analýze pre predikciu metastáz po prostatektómii (miera rizika [HR] 1,5 za každých 10% zvýšenia skóre) [5]. Skóre klasifikátora karcinómu prostaty >0,45 bolo spojené so zvýšeným rizikom metastáz, pričom skóre >0,6 predstavovalo pre pacientov po lokálnej liečbe podstatne vyššie riziko progresie ochorenia. Tieto výsledky boli validované v dvoch samostatných kohortách u pacientov po radikálnej prostatektómii [4,6]. Okrem predikcie metastáz po prostatektómii sa preukázalo, že klasifikátor karcinómu prostaty súvisí aj so špecifickou úmrtnosťou na rakovinu prostaty [7,9] a progresívnym ochorením u pacientov podstupujúcich adjuvantnú alebo záchrannú RT [10-13]. Metaanalýza [8] preukázala štatisticky významnú súvislosť medzi vysokým (>0,6) verzus nízkym (<0,45) skóre klasifikátora rakoviny prostaty a zvýšeným rizikom

vzdialených metastáz, ale nie medzi intermediárnym skóre (0,45 až 0,6) a nízkym skóre klasifikátora karcinómu prostaty po úprave pre použitie pri adjuvantnej a záchranej liečbe po radikálnej prostatektómii. V samostatnej štúdii má klasifikátor karcinómu prostaty so skóre $>0,6$ nezávisle predpovedané vzdialené metastázy v porovnaní s inými nepriaznivými klinicko-patologickými znakmi dostupnými pri prostatektómii (t.j. Gleasonovho skóre 8 až 10, inváziu semenných vezikúl alebo lymfatických uzlín) [11]. Súbežné úpravy klinicko-patologických vlastností, načasovanie adjuvantnej a záchranej postprostatektomickej liečby na zistenie metastatického ochorenia v štúdii by poskytli ďalšiu silu na podporu spojenia medzi skóre klasifikátora karcinómu prostaty $>0,6$ a rizikom metastatického ochorenia. Implementácia skóre klasifikátora genómového karcinómu prostaty pre prognostické hodnotenie po prostatektómii je najinformatívnejšia so zahrnutím štandardných klinických a patologických znakov [14]. Hodnota pridania Decipheru k chirurgickému skóre hodnotenia rizika rakoviny prostaty (CAPRA) [15] na zlepšenie predikcie úmrtnosti na karcinóm prostaty po radikálnej prostatektómii sa ukázala v analýze 185 mužov s vysokým rizikom rekurencie ochorenia po prostatektómii, ktorí podstúpili liečbu [7]. Z 85 mužov s vysokým skóre CAPRA malo 17 z 33 mužov, ktorí mali tiež vysoko rizikové skóre Decipher, úmrtnosť špecifickú pre karcinóm (52%); Decipher preklasifikoval zostávajúcich 49 mužov na nízke až stredné riziko a boli pozorované iba tri prípady úmrtia špecifického pre karcinóm (6%). Decipher môže byť užitočný aj pri predikcii vzdialených metastáz u mužov podstupujúcich primárnu RT pri karcinóme prostaty [16]. Použitím vopred určených kategórií rizika klasifikátora karcinómu prostaty dosiahol kumulatívny výskyt metastáz pre skóre $>0,6$ 20% 5 rokov po RT, zatiaľ čo kumulatívne riziko metastáz počas trvania sledovania u pacientov so skóre klasifikátora $\leq 0,2$ bolo nulové.

Predikcia prínosu z postprostatektomickej radiačnej terapie

Na základe Decipherovho testovania sú okrem prognostických genomických znakov k dispozícii informácie o celom genóme, ktoré umožnili vývoj charakterických znakov, schopných predpovedať odpoveď na adjuvantnú alebo záchrannú RT (t.j. 24-génové výsledné skóre pooperačnej radiačnej terapie [PORTOS]) [17]. V počiatkových štúdiách neboli prognostické znaky pre metastatickú progresiu po prostatektómii u pacientov, ktorí nedostávali ďalšiu RT, ale u pacientov s vysokým skóre PORTOS, ktorí mali zhruba 7-násobný pokles metastáz, ak sa použila adjuvantná alebo záchranná RT. Vplyv skóre na následné rozhodovanie o postoperačnej RT sa ukázal v prospektívnej štúdii PRO-IMPACT [18]. Po testovaní Decipherom sa zmenilo 18% odporúčaní u pacientov pri liečbe karcinómu prostaty, u ktorých sa zvažovala adjuvantná RT a 32% odporúčaní sa zmenilo u pacientov, u ktorých sa uvažovalo o záchranej RT. U pacientov s vyššou pravdepodobnosťou metastatického postihnutia sa častejšie odporúčala intenzívnejšia terapia. Používanie Decipheru bolo spojené so znížením rozhodovacích konfliktov a u pacientov, ktorí boli podľa Deciphera klasifikovaní ako nízkorizikoví, s menšou úzkosťou a strachom z recidívy karcinómu prostaty. Decipher môže byť nápomocný pri rozhodovaní o adjuvantnej verzus včasnej záchranej RT po prostatektómii pre skupinu vysoko rizikových nádorov. V retrospektívnej analýze 188 mužov s pT3 štádiom alebo s pozitívnym okrajom, ktorí podstúpili pooperačnú RT v dvoch štúdiách počas 19-ročného obdobia, bol kumulatívny výskyt metastáz 5 rokov po RT 0,9 a 29% pre nízke ($<0,4$), stredné (0,4 až 0,6) a vysoké ($>0,6$) Decipher skóre [13]. Podskupina nízko rizikového Decipher skóre mala vynikajúce dlhodobé výsledky bez ohľadu na načasovanie pooperačnej RT (t.j. adjuvantná verzus záchranná RT). Naopak, u pacientov s vyšším Decipher skóre

bola 5 ročná kumulatívna incidencia metastáz 6% u pacientov liečených adjuvantnou RT a 23% u tých, ktorí odložili RT, kým sa nezvýšila hladina ich prostatického špecifického antigénu (PSA). Avšak vzhľadom na výsledky nedávno vykonaných randomizovaných štúdií, ktoré priamo porovnávajú obidva liečebné postupy, sa praktické kroky u väčšiny pacientov posúvajú od adjuvantnej RT v prospech záchranej RT. Kým nebudú k dispozícii ďalšie informácie (vrátane výsledkov randomizovaných štúdií testujúcich vplyv výsledkov Decipher testu a jeho skóre na rozhodnutia a výsledky liečby), použitie genómových markerov u pacientov, ktorí podstúpili radikálnu postprostatektómiu by nemalo byť bežné. Doposiaľ štandardným opatrením ostáva sledovanie postoperačného vyšetrenia sérového PSA a liečba záchrannou RT, ak sa zachytí detekovateľná hodnota PSA (0,1 ng/ml) a jeho elevácia.

Stratifikácia rizika u mužov pri aktívnom sledovaní

Decipher testovanie bolo vykonané na biopsických diagnostických vzorkách v skupine 266 pacientov s veľmi nízkym, nízkym a stredne rizikovým karcinómom prostaty. Výsledky boli porovnané s histologickými nálezmi pri následnej radikálnej prostatektómii [19]. Po úprave skóre CAPRA pri diagnostike [20] bol Decipher nezávislým prediktorom nežiaducej patológie pri prostatektómii (odds ratio 1,29 [95% CI 1,03 - 1,61] na každých 10% zvýšenia). Negatívna prediktívna hodnota (určovala stupeň spoľahlivosti pri absencii nepriaznivej patológie) bola 91% (95% CI 87-94) a 96% (95% CI 90-99) pre hodnoty testu Decipher 0,45, respektívne 0,2. Predpokladá sa, že títo pacienti budú dobrými kandidátmi na aktívne sledovanie.

Klinické odporúčania pre molekulárne markery u lokalizovaného karcinómu prostaty z roku 2019 vydané Americkou spoločnosťou pre klinickú onkológiu (ASCO) dospeli k záveru, že Decipher sa môže používať v situáciách, v ktorých je pravdepodobné, že výsledok testu bude považovaný za súčasť celku s rutinnými klinickými faktormi a ovplyvní manažment pacienta [21]. Pri informovaní pacientov o vhodnosti aktívneho sledovania a pri usmerňovaní stratifikácie rizika, poradenstve pacientov a rozhodovaní o výbere liečby. Decipher bol jediný molekulárny biomarker, ktorý sa odporúčal pri rozhodovaní medzi postoperačnou adjuvantnou RT a záchrannou RT, Decipher PORTOS je jediným prediktívnym biomarkerom pre odpoveď na RT.

Genomické skóre prostaty (Oncotype Dx Genomic Prostate Skóre)

Novo diagnostikovaný lokalizovaný karcinóm prostaty sa často identifikuje vo vzorkách s malým obsahom prostatického tkaniva po biopsii prostaty. Za účelom molekulárneho vyhodnotenia malého objemu FFPE tkaniva karcinómu z biopsie prostaty, bol vyvinutý test (Oncotype Dx Genomic Prostate Score, Genomic Health) s použitím kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie s reverznou transkripciou (RT-PCR), ktorú je možné vykonať na vzorkách s malým obsahom tkaniva v dĺžke 1 mm [22]. Toto stanovenie obsahuje 17 rakovinových génov, ktoré predstavujú štyri biologické dráhy onkogenézy karcinómu prostaty (vrátane dráhy androgénového receptora, stromálnej odpovede a proliferácie), spolu s piatimi referenčnými génmi. Táto analýza bola vyvinutá na základe výsledkov štúdií využívajúcich vzorky z prostatektómie ako aj vzorky z biopsie prostaty [23]. Účel použitia a dostupné údaje - Genómové skóre prostaty sa najčastejšie používa na predikciu ochorenia vyššieho stupňa ochorenia u mužov podstupujúcich aktívne sledovanie.

Stratifikácia rizika u mužov pri aktívnom sledovaní

Viaceré [24,25] štúdií naznačuje, že skóre genómovej prostaty môže predpovedať patologické vlastnosti vyššieho stupňa ochorenia u mužov podstupujúcich aktívne

sledovanie a môže pomôcť pri rozhodovaní v liečbe u pacientov s veľmi nízkym rizikom, nízkym alebo stredným rizikom karcinómu prostaty [23,26-31].

V prospektívnej validačnej štúdii s 395 pacientami, ktorí mali karcinóm prostaty s nízkym až stredným rizikom a splnili inklúzne kritériá pre aktívne sledovanie, výsledky testu korelovali s nálezmi zo vzorkách po prostatektómii [23]. V skupine pacientov po prostatektómii malo 123 pacientov ochorenie vysokého stupňa alebo bez postihnutia prostaty karcinómom. Každé 20-bodové zvýšenie skóre genómovej prostaty bolo spojené so štatisticky významným zvýšením rizika ochorenia vysokého stupňa a/ alebo bez ochorenia postihujúceho prostatu (odds ratio 1,9, 95% CI 1,3 - 2,9).

Prospektívna multiinštitucionálna štúdia analyzovala 1200 mužov s veľmi nízkym, nízkym a stredne rizikovým karcinómom prostaty, testom Oncotype Dx Genomic Prostate Score [27]. Prostatektómii podstúpilo 114 pacientov, z ktorých 40 malo nepriaznivé patologické vlastnosti (definované ako Gleasonovo skóre $\geq 4 + 3$ alebo patologické stadium ochorenia T3). Výsledok skóre genómovej prostaty bol prediktorom nejnepriaznivej patológie (odds ratio na 20 jednotiek skóre genómovej prostaty 2,2, 95% CI 1,2-4,1) a preukázal sa ako významný po úprave podľa skóre biopsie podľa Gleasona, klinického štádia T a PSA.

V štúdii uskutočnenej na mužoch podstupujúcich radikálnu prostatektómiu sa z hľadiska prognostického dopadu skóre genómovej prostaty analyzovali vzorky biopsie od 431 mužov s nízkym alebo stredným rizikom karcinómu prostaty [29]. Genomické skóre prostaty bolo spojené s nepriaznivými patologickými vlastnosťami pri následnej radikálnej prostatektómii. V kombinovanej analýze tejto štúdie a štúdie opísanej vyššie (spolu 732 pacientov) [30] sa ukázalo, že skóre genómovej prostaty moduluje riziko nepriaznivých patologických znakov pri prostatektómii vrámci podskupín s rizikom CAPRA.

Na druhej strane, novšie údaje naznačujú, že skóre genómovej prostaty má obmedzené využitie, najmä ako samostatný test, u mužov s veľmi nízkym rizikom, ktorí zvažujú aktívne sledovanie [24,25].

Vo vyššie uvedenej štúdii sa vzorky biopsie od 431 pacientov s nízkym alebo stredným rizikom karcinómom prostaty analyzovali za účelom prognostického vplyvu skóre genómovej prostaty; všetci pacienti následne podstúpili radikálnu prostatektómiu [29]. Pri dôkladnejšej analýze bolo skóre genómovej prostaty jediným významným prediktorom biochemického intervalu bez relapsu.

Retrospektívne bol analyzovaný dlhodobý vplyv skóre genómovej prostaty u 279 mužov, ktorí podstúpili radikálnu prostatektómiu pre klinicky lokalizované ochorenie [32]. Vyššie skóre genómovej prostaty bolo spojené s kratším časom do úmrtia na karcinóm prostaty a kratším časom do vývoja metastáz s dopadom na horšie prežívanie bez biochemických relapsov.

Strata fosfatázy a tenzínového homológu

Karcinóm prostaty je charakterizovaný vysokým stupňom genómovej komplexnosti, obzvlášť s častými zmenami v počte chromozomálnych kópií (delécií a amplifikácií) [33]. Častým relatívne skorým javom v klonálnej evolúcii karcinómu prostaty je strata PTEN tumor supresora na chromozóme 10q [34]. Normálnou funkciou PTEN je zastavenie dráhy PI3K/ AKT (fosfoinozítid 3-kináza/ proteínkináza 3), ktorej aktivácia vedie k bunkovému rastu, prežitiu a motilitate buniek [35]. Jednotlivé časti dráhy PI3K/

AKT sú pozmenené až u 50% všetkých primárnych karcinómov prostaty a prakticky u 100% všetkých metastatických lézií [36]. Reflektujúc jeho biologický význam, delécia PTEN v modeloch na myšiach vedie k lokálne invazívnemu karcinómu prostaty a vedie k rýchlej progresii do metastatického ochorenia v kombinácii s ďalšími genomickými zmenami (akou je delécia SMAD4) [37]. Použitím rutinne odobratého tkaniva prostaty je možné merať stratu PTEN na úrovni DNA pomocou fluorescenčnej in-situ hybridizácie (FISH) a na úrovni expresie pomocou IHC.

Účel použitia a dostupnosť údajov o strate PTEN preukázala prognostickú hodnotu u pacientov s nízkorizikovým ochorením bez operačnej liečby, jeho prognostická hodnota je menej istá u pacientov liečených chirurgickým zákrokom.

Transatlantická prostatická skupina (TAPG) hodnotila stratu PTEN u IHC aj FISH u skupiny konzervatívne liečených pacientov s lokalizovaným karcinómom prostaty [38]. Výkonové charakteristiky boli najpriaznivejšie, keď sa PTEN hodnotil s IHC (možno preto, že IHC dokáže zistiť stratu expresie proteínu PTEN, či už v dôsledku straty chromozómov alebo umlčania génu). V celkovo 18% pacientov tejto skupiny malo stratu PTEN IHC. Strata PTEN, ktorá korelovala s jej biológiou ako skorou molekulárnou zmenou, vysoko predpovedala úmrtnosť na karcinóm prostaty u pacientov s nízkorizikovými charakteristikami (pacienti s nízkym Gleasonovým skóre, nízkym PSA, nízkym farbením Ki-67 a nízkym rozsahom ochorenia; HR úmrtia na karcinóm prostaty 7,4, $p=0,012$ u týchto pacientov, $p=8,13$ u pacientov s Gleasonovým skóre <7). Naopak, strata PTEN nekorelovala s prognózou u pacientov s vyšším rizikom. To naznačuje, že IHC identifikujúca stratu PTEN, na rozdiel od indexov proliferácie bunkového cyklu, môže mať dôležitú klinickú úlohu pri rozhodovaní, ktorí pacienti s nízkym rizikom sú nevhodnými kandidátmi na odloženú liečbu lokalizovaného karcinómu prostaty. Dôležité je, že štúdia TAPG PTEN IHC sa realizovala na vzorkách prostaty z transuretrálnej resekcie prostaty, ktorá by sa mala potvrdiť v klinicky relevantnejšej kohorte pri biopsii prostaty.

Údaje týkajúce sa nezávislej prognostickej schopnosti straty PTEN u pacientov po liečbe boli rozporuplnejšie. Môže to byť spôsobené s vysokou frekvenciou narušenia dráhy PTEN u pacientov, ktorí podstúpili aktívnu liečbu a vysokou koreláciou medzi stratou PTEN a klinicko-patologickými faktormi, akými sú Gleasonové skóre a patologické štádium ochorenia [39,40]. V jednej z kohort u takmer 400 pacientov vyšetovaných použitím IHC bola strata PTEN významným determinantom budúcich metastáz a smrti po radikálnej prostatektómii pri jednorozmernej analýze, ktorá ale stratila signifikantnosť pri multivariačnej analýze, ktorá zahŕňala celkový zdravotný stav, stupeň a stav chirurgického okraja po radikálnej prostatektómii [39]. Naopak, pri použití rovnakých protokolov farbenia u populácie s vyšším rizikom (všetky Gleasonové skóre 7-10) dostávajúcej adjuvantne docetaxel po radikálnej prostatektómii sa zistilo, že strata PTEN, vysoká expresia MYC a zvyšujúce sa farbenie Ki-67 sú nezávislými prediktormi progresie ochorenia [41]. Ukázalo sa tiež, že homozygotná strata PTEN nezávisle predpovedá biochemickú recidívu pri analýze pomocou FISH metódy u pacientov po radikálnej prostatektómii, u ktorých je vysoké riziko progresie ochorenia [40,42,43].

Ďalšie údaje naznačujú, že heterogenita nádoru a limitácia odberu vzoriek môžu zodpovedať za časť variability v prognostických štúdiách u pacientov po liečbe s väčším počtom odobratých vzoriek z prostaty po realizovanej prostatektómii (dôkladnejšie kvantitatívne hodnotenie straty PTEN), čo vedie k presnejšej predpovedi klinického správania [44]. Strata PTEN sa kombinovala s hodnotením preusporiadania

ERG (gén špecifický pre transformáciu erytroblastov [ETS]) v ďalšom teste prognostického panelu (ProstaVysion) a pri vyšetrení pomocou ERG IHC. Stav preusporiadania ERG môže pridať ďalšie informácie o prognostickom význame straty PTEN, pretože muži so stratou PTEN a prípady bez preusporiadania ERG majú zvýšené riziko letálneho karcinómu prostaty po radikálnej prostatektómii [45].

Napriek týmto údajom klinické odporúčania pre molekulárne markery pri lokalizovanom karcinóme prostaty z roku 2019 od ASCO dospeli k záveru, že strata PTEN môže poskytnúť náhľad na diagnostiku karcinómu prostaty [21]. Panely génu pre karcinóm prostaty, ktoré zahŕňajú stratu PTEN (ako je ProstaVysion), nemajú doposiaľ dostatok údajov na to, aby boli klinicky rutinne použiteľné.

Testy založené na bunkovej proliferácii

Testy založené na bunkovej proliferácii zahŕňajú IHC hodnotenie Ki-67, nukleárneho proteínu, ktorý je spojený so syntézou RNA a testy, ktoré sa spoliehajú na expresiu mediálnej RNA génov pre progresiu bunkového cyklu. Skóre progresie obsahuje informácie z 31 génov súvisiacich s bunkovým cyklom a 15 prevádzkových génov. Ki-67 IHC aj skóre progresie bunkového cyklu sú indikátormi zmnoženia nádorových buniek. Tieto testy sa použili vo viacerých retrospektívnych štúdiách v skupinách pacientov s lokálnou liečbou alebo bez nej. Aj keď zohľadňujú podobné biologické procesy, neboli priamo porovnané; avšak údaje pre oba testy sa zdajú byť podobné. V skupine pacientov s nízkym rizikom karcinómu prostaty neliečených (najmä pacientov na aktívnom sledovaní) bude mať málo pacientov s nízkym alebo veľmi nízkym rizikom karcinómu pri vysokom indexe proliferácie, pričom súčasná analýza demonštruje skóre progresie bunkového cyklu >1 u zhruba 8% nízko rizikových pacientov [46]. Medzi pacientami, ktorí obvykle podstupujú definitívnu liečbu, môže použitie indexov proliferácie poskytnúť cenné informácie, ktoré by mohli ovplyvniť rozsah liečby. Skóre progresie bunkového cyklu je komerčne dostupné a odporúčané expertnými skupinami pre stratifikáciu rizika pri klinicky lokalizovanom ochorení.

Imunohistochemia Ki-67

Ki-67 je jadrový proteín spojený so syntézou ribozomálnej RNA nevyhnutný pre proliferáciu bunkového cyklu. Protilátky proti Ki-67 sa môžu použiť na stanovenie IHC v rutinne skladovanom tkanive FFPE. Najčastejšie sa používa protilátka MIB1 (mindbomb E3 ubikvitínová proteínová ligáza 1). Typicky sa množstvo farbenia Ki-67 uvádza ako percento z celkovej bunkovej populácie, ktorá sa farbí pozitívne na Ki-67. Účel použitia a dostupné údaje farbenia Ki-67 konzistentne preukázalo prognostickú hodnotu a bolo testované u pacientov liečených RT a chirurgickým zákrokom, ako aj u tých, ktorí boli liečení konzervatívne bez definitívnej liečby.

V jednej skupine štúdií boli analyzované biopsie pred liečbou pacientov podstupujúcich RT a androgénovú depriváciu (ADT) ako súčasť štúdie Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 92-02 [47]. Medzná hodnota pre farbenie Ki-67 bola stanovená na $<7,1\%$. Farbenie Ki-67 $>7,1\%$ významne korelovalo so vzdialenými metastázami a špecifickou úmrtnosťou na karcinóm prostaty. Rovnaké asociácie platili, keď sa farbenie Ki-67 považovalo za spojitú premennú pri analýze viacerých premenných a údaje naznačujú, že hraničná hodnota $>7,1\%$ môže byť informatívnejšia. Toto sa preukázalo v následnej štúdii s použitím hraničnej hodnoty pre farbenie 11,3%, pričom výrazné farbenie Ki-67 nezávisle korelovalo s nárastom vzdialených metastáz, špecifickou úmrtnosťou na karcinóm a celkovou úmrtnosťou (HR 2,95, 2,35 a 1,44, v uvedenom poradí) [48]. Ki-67 bol prediktívnejší ako MDM2 a

p53 v tejto skupine pacientov, pričom kombinácie výrazného vyfarbenia Ki-67 a výrazného MDM2 pomocou IHC boli spojené s ešte vyššími HR pre zlé výsledky.

Ki-67 IHC bol testovný v biopsiách pacientov pred liečbou radikálnou prostatektómiu, ako aj v tkanive prostaty po prostatektómii.

Štúdia realizovaná na Mayo klinike skúmala farbenie Ki-67 v biopsiách pred liečbou radikálnou prostatektómiou [49]. Pri farbení Ki-67 sa použil medzný bod farbenia 6%. Zo 445 analyzovaných pacientov malo 11% výrazné farbenie Ki-67 a výrazné farbenie bolo spojené so zvýšeným rizikom progresie karcinómu prostaty a úmrtnosťou špecifickou pre karcinóm. Farbenie Ki-67 bolo nezávislým prediktorom týchto výsledkov v multivariačnej analýze a pridanou hodnotou k nomogramom podľa D'Amica a Kattana.

Pri analýze vzoriek po radikálnej prostatektómii vykazovalo Ki-67 podobné prognostické vlastnosti, s HR 1,5 až 4,4 v multivariačných analýzach [50]. Rozsah HRs odráža nedostatok uniformity, pokiaľ ide o optimálnu hranicu farbenia, metódy použité na kvantifikáciu farbenia Ki-67 a celkové riziko študovaných populácií.

Ki-67 bol skúmaný TAPG v biopsiách tkaniva u konzervatívne liečených pacientov s karcinómom prostaty [50]. Táto skupina obsahovala 243 analyzovaných prípadov diagnostikovaných zväčša pred rozšíreným používaním skríningu pomocou PSA, ktorí boli dlho klinicky sledovaní (medián 9 rokov). Počas sledovania pacienti neboli liečení pomocou RT, ani chirurgicky. Farbenie Ki-67 bolo dichotomizované, aby sa oddelili osoby s farbením <10% od osôb s farbením >10%, pretože prežívanie pacientov s farbením Ki-67 <5% a osôb s farbením medzi 5 a 10% bolo podobné. Použitím tejto hraničnej hodnoty malo iba 5% populácie výrazné farbenie Ki-67 v bioptických vzorkách. U pacientov s výrazným farbením Ki-67 však bola signifikantne vyššia úmrtnosť na karcinóm prostaty (HR 2,8 pri analýze viacerých premenných). Iba 1 pacient s Gleasonovým skóre <7 mal farbenie Ki-67 >10%, takže analýza tejto podskupiny nebola možná. Dôležité je, že súčasnú populáciu aktívneho sledovania tvoria predovšetkým pacienti s ochorením Gleasonovho skóre 6. To zdôrazňuje dôležité potenciálne obmedzenie farbenia Ki-67 v tom, že väčšina pacientov s diagnostikovaným nízkorizikovým karcinómom bude mať nízke hladiny Ki-67, čo naznačuje, že u mužov, ktorí sa rozhodujú medzi okamžitou a odloženou liečbou, môže existovať nízka užitočnosť. Napriek týmto údajom klinické pokyny pre používanie molekulárnych markerov pri lokalizovanom karcinóme prostaty z roku 2019 od ASCO dospeli k záveru, že Ki-67 môže poskytnúť náhľad na diagnostiku ochorenia [21].

Skóre progresie bunkového cyklu (Prolaris).

V priebehu posledného desaťročia sa schopnosť vykonávať molekulárnu analýzu s použitím techník, ako je RT-PCR, na malom množstve tkaniva FFPE stala rutinou. Na základe tejto technológie bol vyvinutý test, ktorý analyzuje 31 génov súvisiacich s bunkovým cyklom a 15 génov pre analýzu pomocou kvantitatívnej RT-PCR (Prolaris, Myriad Genetic Laboratóriá). Na analýzu môže byť použité tkanivo z biopsie alebo tkanivo priamo z radikálnej prostatektómie. Tento test poskytuje proliferačný index vyjadrený ako skóre progresie bunkového cyklu s vysoko reprodukovateľnými výsledkami. Podobne ako v prípade Ki-67 bolo skóre progresie bunkového cyklu testované vo viacerých klinických kohortách so známymi výsledkami a testovanie bolo úspešne uskutočnené pri biopsiách centrálnej zóny prostaty, transuretrálnej resekcii a tkanive prostaty po radikálnej prostatektómii [51–55]. Skóre progresie bunkového cyklu

vyjadruje mieru agresivity karcinómu. Poskytuje hodnotenie rizika biochemického relapsu alebo metastáz po definitívnej liečbe a špecifickej mortality pre dané ochorenie pri konzervatívnom manažmente.

U pacientov po radikálnej prostatektómii bola realizovaná multiinštitucionálna retrospektívna štúdia, ktorá analyzovala skóre progresie bunkového cyklu z bioptického tkaniva [51]. Pri analýze viacerých premenných bolo skóre progresie bunkového cyklu nezávisle spojené s biochemickou recidívou PSA a metastázami (HR 1,47, respektíve 4,19, na jednotku skóre, $p < 0,05$ pre obidve) po operácii. Aj keď v tejto skupine bolo relatívne málo prípadov metastáz, najhoršie metastatické výsledky mali pacienti so skóre progresie bunkového cyklu pre biopsiu > 2 (2,4% populácie štúdie). Všetky podskupiny pacientov so skóre progresie bunkového cyklu mali podobnú vysokú mieru prežitia bez metastáz.

V ďalšej analýze zahŕňajúcej 100 pacientov, ktorí mali nepriaznivé patologické vlastnosti, pT3 nádory alebo pozitívne chirurgické okraje po radikálnej prostatektómii, bola päťročná miera prežívania bez biochemického relapsu u pacientov s nízkym (< 0), stredným (0-1) alebo vysokým rizikom (> 1) skóre progresie bunkového cyklu 89, 39 a 13%, v danom poradí [56].

Okrem štúdií populácií liečených chirurgickým zákrokom, skóre progresie bunkového cyklu sa hodnotilo aj z hľadiska schopnosti predpovedania biochemického zlyhania po RT [55]. Analýza viacerých premenných opäť ukázala, že zvýšené skóre progresie bunkového cyklu bolo spojené s horšími výsledkami (HR 2,1, $p = 0,03$).

Stratifikácia rizika u pacientov pri aktívnom sledovaní

TAPG skúmala skóre progresie bunkového cyklu z biopsií prostaty u pacientov na konzervatívnej liečbe [53]. Z 349 analyzovaných vzoriek bolo stredné skóre progresie bunkového cyklu 1,03. V tejto skupine bez primárnej liečby bola kumulatívna incidencia úmrtia zvýšená u pacientov, ktorí mali skóre progresie bunkového cyklu > 2 (19% populácie), v porovnaní s pacientmi s nižším skóre progresie bunkového cyklu. Výsledky pacientov nebolo možné dobre diferencovať u pacientov s nižším skóre progresie bunkového cyklu (1-2, 0-1 alebo < 0). Pri analýze viacerých premenných bola HR pre úmrtie na karcinóm prostaty 1,7 na jednotku zvýšenia skóre progresie bunkového cyklu (čo predstavuje zdvojnásobenie génovej expresie bunkového cyklu) [57].

Dopadom tohto testu na liečebné odporúčania pre lokalizovaný karcinóm prostaty sa zaoberala štúdia s 1206 pacientmi s novodiagnostikovaným karcinómom prostaty [58]. Pri skúmaní terapeutických odporúčaní pred a po teste pre progresiu bunkového cyklu sa zistilo, že použitie testu zmenilo postup odporúčanej liečby v 48% prípadov; u 72% týchto pacientov bola použitá menej agresívna liečba, v 27% prípadoch agresívnejšia liečba.

Na rozdiel od Ki-67, klinické odporúčania pre molekulárne markery pri lokalizovanom karcinóme prostaty z roku 2019 od ASCO dospeli k záveru, že Prolaris môže byť používaný v situáciách, v ktorých je pravdepodobné, že výsledok testu s rutinnými klinickými ukazovateľmi ovplyvní manažment liečby [21]. Patrí sem informovanie mužov o vhodnosti aktívneho sledovania, pomoc pri usmerňovaní stratifikácie rizika, poradenstvo pacientov pri rozhodovaní v manažmente samotnej liečby karcinómu prostaty.

Genomické (zárodočné) testy

Karcinóm prostaty je spájaný so syndrómom prsníka a vaječníkov (HBOC) (kvôli mutáciám zárodočnej línie v homológnych génoch slúžiacich na opravu DNA, vrátane génov citlivosti na rakovinu prsníka BRCA1 a BRCA2) a Lynchovho syndrómu (mutácie v génoch pre zárodočné bunky mismatch opravných génov DNA). Opravy zárodočnej mutácie DNA sú prítomné u približne 4-6% pacientov s lokalizovaným karcinómom prostaty a približne 12% pacientov s metastatickým postuhnúťm. Genomické vyšetrenie sa odporúča u pacientov s novodiagnostikovaným veľmi nízkym, nízkym a stredným rizikom karcinómu prostaty, ak je pozitívna rodinná anamnéza alebo je intraduktálna histológia obohatená o mutácie BRCA [59].

Klinické využitie a odporúčania

Súčasný údaje naznačujú, že testovanie na molekulárnej úrovni môže byť prínosom pre stratifikáciu rizika lokalizovaného karcinómu prostaty a pri výbere ďalšej liečby. Odporúčania expertných skupín sa líšia v hodnotení, v ktorých prípadoch je možné ponúknuť jeden z molekulárnych testov zameraných na vyšetrenie tkaniva pri karcinóme prostaty.

Národná spoločnosť pre karcinóm

Odporúčania Národnej spoločnosti pre karcinóm (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) verzia 4.2019 [59] naznačujú, že je potrebné zvážiť molekulárnu biomarkerovú analýzu nádorového tkaniva u pacientov s klinicky lokalizovaným karcinómom prostaty s nízkym alebo priaznivým stredným rizikom, ak je ich predpokladaná dĺžka prežívania 10 alebo viac rokov. Použitie týchto testov sa bežne neodporúča u mužov s vysoko rizikovými nádormi.

Americká spoločnosť pre klinickú onkológiu/ Odporúčania Európskej urologickej asociácie

Odporúčania pre klinickú prax od Americkej urologickej asociácie (AUA)/ Americkej spoločnosti pre radiačnú onkológiu (ASTRO)/ Spoločnosť urologickej onkológie (SUO) a Americkej spoločnosti pre klinickú onkológiu (ASCO) z roku 2018 uviedli, že u pacientov s nízkorizikovým karcinómom prostaty nepreukázali genómové biomarkery založené na tkanivách klinický význam u pacientov na aktívnom sledovaní [61–63].

Klinické odporúčania pre klinickú prax z roku 2019 vydané ASCO (so zastúpením AUA, College of American Pathologists [CAP] a Európskej urologickej asociácie [EAU]), týkajúce sa molekulárnych biomarkerov pri lokalizovanom karcinóme prostaty podporil použitie jedného z niekoľkých biomarkerových testov u pacientov s lokalizovaným karcinómom prostaty s nízkym až stredným rizikom v situáciách, keď výsledok testovania spolu s rutinnými klinickými faktormi s pravdepodobnosťou ovplyvní rozhodnutie o ďalšej liečbe [21]. Jedná sa o prípady s vysokoobjemovým nízkorizikovým alebo priaznivým stredne rizikovým karcinómom prostaty, u ktorých sa zvažuje aktívne sledovanie alebo agresívnejšia liečba u pacientov s vysokorizikovým ochorením. Pre chýbajúce údaje z prospektívnych štúdií, rutinné používanie molekulárnych biomarkerov sa neodporúča.

Klinické odporúčania

Muži zvažujúci aktívne sledovanie

Pri výbere pacientov s karcinómom prostaty, u ktorých je pravdepodobné, že budú mať prospech z aktívneho sledovania, je dostupných niekoľko komerčných biomarkerov

(Oncotype Dx Genomic Prostate Score, Prolaris, Decipher alebo ProMark), ktoré zlepšujú prognostickú presnosť klinických multivariačných modelov pri identifikácii mužov s biologicky významným ochorením. O použití biomarkerov sa môže uvažovať pri striktne selektovaných pacientoch s nízkym alebo priaznivým ochorením stredného rizika, ktorí by mohli mať benefit zo stratifikácie rizika pri zvažovaní aktívneho sledovania (napr. vysokoobjemové ochorenie s abnormálnymi nálezmi pri digitálnom rektálnom vyšetrení [DRV] alebo vysoká elevácia prostatického špecifického antigénu [PSA]). Neexistujú porovnávacie údaje, ktoré by naznačovali, že niektorý z testov je lepší ako iný. Zatiaľ čo vyšetrenie pomocou magnetickej rezonancie (MRI) a testovanie tkanivových biomarkerov môžu pomôcť pri identifikácii klinicky významného karcinómu prostaty u pacientov, ktorí zvažujú aktívne sledovanie, existuje len málo štúdií porovnávajúcich tieto prístupy. Dve štúdie porovnávali multiparametrické MRI verzus testovanie 17-génového skóre onkotypu Dx genómovej prostaty a tretia štúdia porovnávala MRI verzus tkanivové mikročipy pomocou imunohistochemie (IHC) [64-66]. Údaje naznačujú, že MRI a molekulárne testovanie môžu poskytnúť klinicky relevantné informácie týkajúce sa pravdepodobnosti progresie ochorenia pri následnej biopsii alebo prostatektómii.

Diagnóza klinicky významného karcinómu prostaty

Pomoc pri diagnostike klinicky významného karcinómu prostaty a ďalšie prognostické dáta môže poskytnúť niekoľko komerčne dostupných biomarkerových testov (Oncotype Dx Genomic Prostate Score, Prolaris, Decipher alebo ProMark), ktoré môžu prispieť ku presnejšej stratifikácii rizika. U selektovaných pacientov s nepriaznivým ochorením stredného rizika môže použitie výsledkov testov pomôcť rozhodnúť o tom, či k rádioterapii (RT) pridať androgénovu depriváciu (ADT).

Rozhodovanie o rádioterapii po radikálnej prostatektómii

Pri rozhodovaní o adjuvantnej RT po radikálnej prostatektómii v porovnaní so záchrannou RT u pacientov s nepriaznivými patologickými charakteristikami ($\geq T3$, pozitívna lymfatická uzlina) a nedetekovateľnou hladinou PSA po prostatektómii môže byť genómový klasifikátor Decipher nápomocný stratifikáciou rizika u selektívne identifikovaných pacientov v rozhodovaní o benefite adjuvantnej liečby. Decipher bol jediný molekulárny biomarker, ktorý sa odporúča pri rozhodovaní o adjuvantnej RT po radikálnej prostatektómii verzus záchrannej RT a decipherovej pooperačnej radiačnej terapii.

Podľa výsledkov štúdie [PORTOS] - jediný prediktívny biomarker pre odpoveď na RT.

Vzhľadom na výsledky randomizovaných štúdií, ktoré priamo porovnávajú oba prístupy, sa výsledky odkláňajú od adjuvantnej liečby v prospech záchrannej RT pre väčšinu pacientov. Rutinné použitie genómových markerov u pacientov po radikálnej prostatektómii by sa nemalo ponúkať. Bežné pooperačné sledovanie sérovej hladiny PSA a liečba záchrannou RT, pri detekovateľnosti hladiny PSA (0,1 ng/ml) sa považuje za štandardnú starostlivosť.

Zhrnutie a odporúčania

Posledné roky sa objavujú viaceré typy molekulárnych prognostických testov s cieľom lepšej stratifikácie rizika neliečených ako aj liečených pacientov s lokalizovaným karcinómom prostaty. Pre niektoré z týchto testov existujú štúdie zahŕňajúce retrospektívnu analýzu tkaniva z kohortu pacientov s klinickými výsledkami, vrátane

imunohistochemie Ki-67 (IHC), IHC s fosfatázou a tenzínovým homológom (PTEN) a testov založených na RNA (ako je progresia bunkového cyklu), skóre [Prolaris], skóre genómovej prostaty [skóre onkotypu Dx pre genómovú prostatu] a genomický klasifikátor [Decipher]). V súčasnosti je potrebné realizovať ďalšie prospektívne validačné štúdie za účelom potvrdenia výsledkov testov. V prípade chýbania detailných validácií jednotlivých testov sa rutinné používanie molekulárnych biomarkerov neodporúča. Aktuálne údaje naznačujú, že testy založené na molekulárnych charakteristikách alebo na proliferácii buniek môžu priniesť ďalšie nezávislé prognostické informácie, ktoré môžu pomôcť pri stratifikácii rizika lokalizovaného karcinómu prostaty:

Génomové skóre prostaty (Oncotype Dx Genomic Prostate Score) a genomický klasifikátor (Decipher) sú multimarkerové testy, ktoré sú špecifické pre karcinóm prostaty, komerčne dostupné a sú odporúčané expertnými skupinami na stratifikáciu rizika pri klinicky lokalizovanom ochorení.

Strata PTEN tumor supresora sa javí ako biologicky významný a klinicky prognostický marker u neliečeného lokalizovaného karcinómu prostaty u pacientov, ktorí podstúpili liečbu ochorenia. Aj keď je komerčne dostupný (napr. ProstaVysion), bude potrebné ďalšie IHC vyhodnotenie PTEN u pacientov s diagnostikovaným karcinómom prostaty zvažujúcich aktívne sledovanie.

Skóre progresie bunkového cyklu (Prolaris) je komerčne dostupné a odporúčané expertnými skupinami pre stratifikáciu rizika pri klinicky lokalizovanom ochorení.

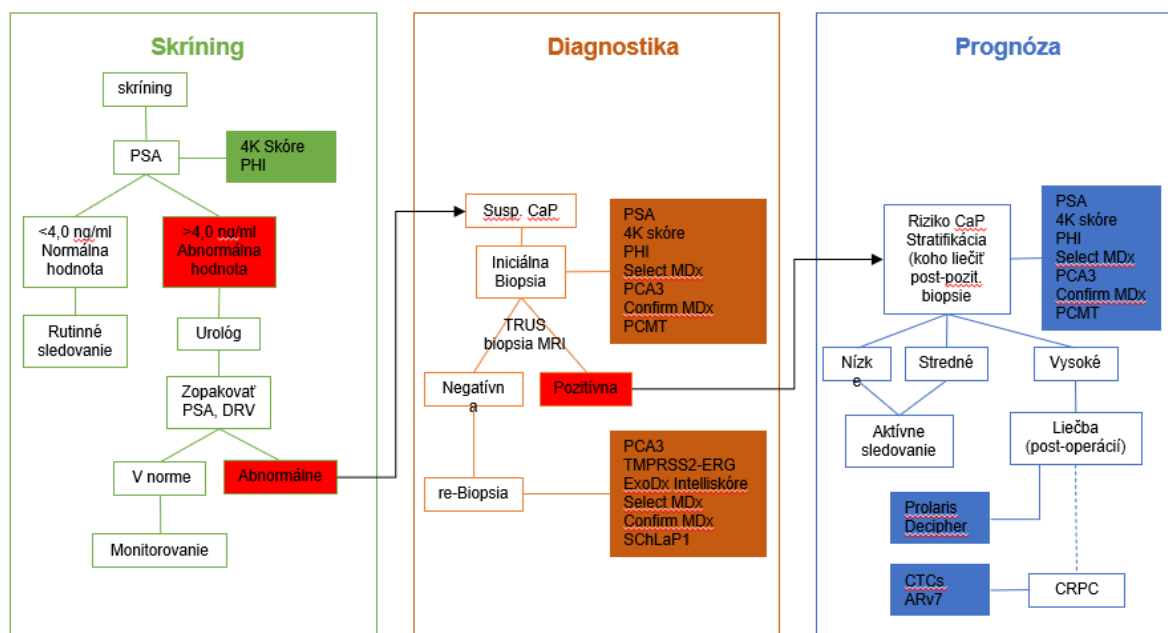
Zatiaľ čo Ki-67 môže poskytnúť náhľad na diagnostiku pokročilého ochorenia, v súčasnosti neexistujú dostatočné dôkazy na podporu jeho klinického použitia.

Klinické odporúčania Americkej spoločnosti pre klinickú onkológiu (ASCO) a Americkej urologickej asociácie (AUA) podporujú testovanie molekulárnymi biomarkermi za účelom hodnotenia rizika karcinómu prostaty pri klinicky lokalizovanom ochorení, v prípade, ak výsledky testov v kombinácii s dostupne používanými diagnostickými markermi karcinómu prostaty s pravdepodobnosťou ovplyvnia rozhodnutie o liečbe. Príkladom sú pacienti s vysokoobjemovým nízkorizikovým alebo priaznivým stredne rizikovým karcinómom prostaty zvažujúci aktívne sledovanie alebo pacienti s vysokorizikovým ochorením za účelom intenzívnejšej liečby. Validačné štúdií poutvrdili, že rutinné používanie molekulárnych biomarkerov sa neodporúča.

Diagnostika pomocou multiparametrickej magnetickej rezonancie prostaty (MRI) a tkanivových biomarkerov môže pomôcť pri identifikácii klinicky významného karcinómu prostaty u pacientov, ktorí zvažujú aktívne sledovanie. Niektoré štúdie porovnávajúce tieto postupy diagnostiky naznačujú, že MRI a molekulárne testovanie môžu poskytnúť klinické informácie týkajúce sa pravdepodobnosti upgradovania ochorenia pri následnej biopsii prostaty. Nie je jasné, u ktorých pacientov by daný diagnostický postup mal benefit.

Tab. 1 Schválené biomarkery na báze krvi, moču a tkanív pri karcinóme prostaty

Test biomarkerov	Molekulárne markery
Na báze séra	
Prostatický špecifický antigén (tPSA)	PSA
PHI (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)	celkové PSA, fPSA, p2PSA
4K (OPKO lab, Miami, FL, USA)	Total PSA, fPSA, intact PSA, hK2
Na báze moču	
PCA3 (ProgenSA) Hologic, Marlborough, MA, USA	PCA3
ExoDX Prostate (Intelliscore) Exosome Diagnostics Inc., Waltham, MA, USA	Exosomal RNA (PCA3, ERG)
MiPS (Detroit, MI, USA)	PCA3 and TMPRSS2-ERG mRNA
SelectMDx ^{SEP} (MDx Health, Irvine, CA, USA)	HOXC6, DLX1
Na báze tkaniva	
ConfirmMDx (MDxHealth, Irvine, CA, USA)	DNA hypermethylation (<i>GSTP1</i> ; <i>APC</i> ; <i>RASSF1</i>)
Prolaris (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA)	mRNA expression; 31 genes (cell cycle progression)
Oncotype Dx (Genomic Health, Redwood City, CA, USA)	mRNA expression; 17 genes
Decipher (GenomeDx Biosciences, San Diego, CA, USA)	mRNA expression; 22 genes (cell proliferation, migration, tumor motility, androgen signaling, and immune system evasion)
Promark (Metamark, Cambridge, MA, USA)	Protein biomarker test (8 proteins)



Obr. 1 Úloha diagnostických a prognostických biomarkerov pri liečbe karcinómu prostaty

Literatúra

- [1] Dall'Era, *Eur Urol.* **2012**, 62:976.
- [2] Cooperberg, *J Urol.* **2005**, 173:1938.
- [3] Erho, *PLoS One.* **2013**, 8:e66855.
- [4] Klein, *Eur Urol.* **2015**, 67:778.
- [5] Karnes, *J Urol.* **2013**, 190:2047.
- [6] Ross AE, *Eur Urol.* **2016**, 69:157.
- [7] Cooperberg, *Eur Urol.* **2015**, 67:326.
- [8] Spratt, *J Clin Oncol.* **2017**, JCO2016702811.
- [9] Karnes, *Eur Urol.* **2017**, 57:234.
- [10] Freedland, *Eur Urol.* **2016**, 70:588.
- [11] Dalela, *J Clin Oncol.* **2017**, JCO2016699918.
- [12] Ross, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2016**, 19:277.
- [13] Den, *J Clin Oncol.* **2015**, 33:944.
- [14] Spratt, *J Clin Oncol.* **2018**, 36:581.
- [15] Cooperberg, *Cancer.* **2011**, 117:5039.
- [16] Nguyen, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2017**, 34: 23-29.
- [17] Zhao, *Lancet Oncol.* **2016**, 17:1612.
- [18] Gore, *Cancer.* **2017**, 123:2850.
- [19] Kim, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2019**, 22:399.
- [20] Cooperberg, *J Natl Cancer Inst.* **2009**, 101:878.
- [21] Eggener, *J Clin Oncol.* **2020**, 38:1474.
- [22] Knezevic, *BMC Genomics.* **2013**, 14:690.
- [23] Klein, *Eur Urol.* **2014**, 66:550.
- [24] Gaffney, *J Urol.* **2019**, 202:96.
- [25] Lin, *J Clin Oncol.* **2020**, 38:1549.
- [26] Kornberg, *J Urol.* **2019**, 201:300.
- [27] Eggener, *Urology.* **2019**, 126:76.
- [28] Kornberg, *J Urol.* **2019**, 202:702.
- [29] Cullen, *Eur Urol.* **2015**, 68:123.
- [30] Brand, *Urology.* **2016**, 89:69.
- [31] Eure, *Urology.* **2017**, 107:67.
- [32] Van Den Eeden, *Eur Urol.* **2018**, 73:129.
- [33] Schoenborn, *Clin Cancer Res.* **2013**, 19:4058.
- [34] Baca, *Cell.* **2013**, 153:666.
- [35] Leslie, *Biochem J.* **2004**, 382:1.
- [36] Liu, *Cancer.* **2013**, 119:2405.

- [37] Ding, *Nature*. **2011**, 470:269.
- [38] Cuzick, *Br J Cancer*. **2013**, 108:2582.
- [39] Lotan, *Clin Cancer Res*. **2011**, 17:6563.
- [40] Troyer, *Prostate*. **2015**, 75:1206.
- [41] Antonarakis, *Cancer*. **2012**, 118:6063.
- [42] Leinonen, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2013**, 22:2333.
- [43] Yoshimoto, *Mod Pathol*. **2008**, 21:1451.
- [44] Jamaspishvili, *J Natl Cancer Inst*. **2020**, 112:1098.
- [45] Ahearn, *J Natl Cancer Inst*. **2016**, 108.
- [46] Tosoian, *J Urol*. **2017**, 120:808.
- [47] Pollack, *J Clin Oncol*. **2004**, 22:2133.
- [48] Khor, *J Clin Oncol*. **2009**, 27:3177.
- [49] Tollefson, *Mayo Clin Proc*. **2014**, 89:308.
- [50] Fisher, *Br J Cancer*. **2013**, 108:271.
- [51] Bishoff, *J Urol*. **2014**, 192:409.
- [52] Cooperberg, *J Clin Oncol*. **2013**, 31:1428.
- [53] Cuzick, *Br J Cancer*. **2012**, 106:1095.
- [54] Cuzick, *Lancet Oncol*. **2011**, 12:245.
- [55] Freedland, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **2013**, 86:848.
- [56] Shangquan, *J Cancer Res Clin Oncol*. **2020**, 146:687.
- [57] Cuzick, *Br J Cancer*. **2015**, 113:382.
- [58] Shore, *J Urol*. **2016**, 195:612.
- [59] Fraser, *Nature*. **2017**, 541:359.
- [60] Bekelman, *J Clin Oncol*. **2018**, 36:3251.
- [61] Sanda, *J Urol*. **2018**, 199:683.
- [62] Sanda, *J Urol*. **2018**, 199:990.
- [63] Leapman, *PLoS One*. **2017**, 12:e0185535.
- [64] Salmasi, *J Urol*. **2018**, 200:564.
- [65] Olivier, *Prostate*. **2018**, 78:1229.

Konsenzuálne molekulové subtypy pri kolorektálnom karcinóme a možnosti stratifikácie pacientov na základe analýzy DNA

Lasabová, Z.¹, Kašubová, I.², Lukáčová, E.¹, Burjanivová, T.¹, Mikolajčík, P.³

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav molekulovej biológie a genetiky, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine a Univerzitná nemocnica Martin, Chirurgická klinika a transplantáčnej centrum, Martin
zora.lasabova@uniba.sk

Abstract

Identification of consensus molecular subtypes (CMSs) in colorectal cancer (CRC) allows patients to be divided into four subtypes, CMS1, CMS2, CMS3 and CMS4, based on the gene expression profile (GEP) of the entire transcriptome obtained by RNA sequencing using the massive parallel sequencing (MPS) method. However, the methods used are relatively complex and are not available for clinical use. Therefore, repeated efforts are being made to simplify CMS identification. One of the possibilities to achieve better molecular characterization of the patient is the use of genetic biomarkers used in clinical practice. By combining the results of these analyzes, together with the results of histopathological diagnostics, we can get a more complex molecular-pathological characterization of CRC of an individual patient in relationship to the classification into CSMs subtypes.

Keywords: consensus molecular subtypes, colorectal cancer, DNA analysis, biomarker

Úvod

Kolorektálny karcinóm (KRK) predstavuje paradigmu pre molekulárnu charakterizáciu nádorov. Fearon a Vogelstein [1] popísali mnohokrokovú karcinogézu postupnej premeny adenómu na adenokarcinóm ako výsledok akumulácie genetických zmien, ku ktorým neskôr pribudli aj zmeny epigenetické. Tento model popisoval mutácie v onkogénoch ako *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* a neskôr *PIK3CA*, a v tumor supresorových génoch ako *APC*, *TP53* a *PTEN*, ktoré sú rozhodujúcim spôsobom zapojené do biológie KRK [1, 2]. Akumulácia týchto genetických mutácií vedie ku karcinogéze prostredníctvom deregulácie kľúčových signálnych dráh zapojených do proliferácie buniek, diferenciácie a apoptózy. Najčastejšie mutovaným génom v KRK je *APC*, ktorý vedie k abnormálnej signalizácii WNT dráhy, a je považovaný za tzv. „gatekeeper“ gén, teda vstupný gén nádorovej transformácie. KRK bez mutácie v *APC* často nesú mutácie v géne *CTNNB1*, ktorý sa tiež podieľa na WNT signálnej dráhe a nukleárna translokácia β -katenínu vedie k zvýšenej expresii génov zodpovedných za bunkovú proliferáciu [2]. Vývoj nových metód na detekciu genetických a epigenetických zmien na princípe masívneho paralelného sekvenovania (MPS) označované tiež ako sekvenovanie novej generácie (NGS), umožnili významný rozvoj vo výskume KRK. Mnohé výskumy boli zamerané na nádorovú a molekulovú heterogenitu. Zaužívaný TNM staging na určenie prognózy pacientov ukazoval, že aj pacienti s rovnakou klinicko-patologickou klasifikáciou mali niekedy rozdielny priebeh ochorenia [3], a/alebo rozdielne odpovede ako na chemoterapeutickú liečbu, tak aj na prvé biologické liečby napríklad anti-EGFR inhibítormi [4]. Okrem toho sa ukázalo, že v nádorovej heterogenite zohrávajú významnú úlohu výskyt hlavných klonov

a subklonov, stromálne bunky a bunky imunitného systému, infiltrované v tkanivách KRK [3, 5]. Na úrovni infiltrácie nádorovej masy imunitnými bunkami už prebehli aj prvé validačné štúdie, ktoré podporujú rozšírenie TNM stagingu aj o parameter tzv. „Immunoscore“ [6].

Dve veľmi významné aktivity prispeli v ostatných 9 rokoch významne k zmene molekulovej klasifikácie KRK. Tú prvú predstavuje projekt The Cancer Genome Atlas, ktorý v roku 2012 publikoval podrobnú integratívnu analýzu vzoriek KRK na úrovni sekvenácie exómu, somatických zmien počtu kópii DNA (*somatic copy number variation*; SCN), metylácie promótorových oblastí, mRNA a miRNA [7]. Druhým významným prínosom pre molekulovú charakterizáciu KRK bola publikácia, kde boli identifikované konsenzuálne molekulové subtypy (*consensual molecular subtypes*; CMS) pri KRK. Tieto boli identifikované na základe výsledkov profilov génovej expresie (GEPs) a zjednotením výsledkov šiestich pracovných skupín [8]. V tomto prehľadovom článku sa chceme zaoberať charakterizáciou CMS v kontexte zmien na úrovni DNA, a možnosti prenosu týchto poznatkov do klinickej praxe.

Konsenzuálne molekulové subtypy (CMSs) kolorektálneho karcinómu

V rokoch 2012 až 2014 nezávisle od seba publikovalo šesť výskumných tímov klasifikačné systémy na stratifikáciu CRC na základe profilov génovej expresie [9-14]. Autori pri tvorbe klasifikačných systémov využívali výsledky diferenciálnej génovej expresie, publikované v databázach, vrátane TCGA [7], ale využívali rozdielne molekulové metódy a zariadenia. V roku 2015 došlo k rozsiahlemu zdieľaniu údajov a spoločnej analýze zistených dát, čo umožnilo zistiť prepojenia medzi jednotlivými klasifikáciami a vytvorenie štyroch konsenzuálnych podtypov pre CRC, označených ako CMS1, CMS2, CMS3 a CMS4, ktoré rozdeľovali pacientov nie len na základe biomarkerov, ale aj na základe prognózy priebehu ochorenia [8]. Aby bola klasifikácia CMS univerzálne platná, bolo potrebné vykonať normalizáciu údajov a aplikáciu jednotlivých klasifikačných systémov na všetky dáta. K identifikovaným CMS bola následne priradená ďalšia molekulová charakterizácia typická pre KRK, ako sú napríklad mikrosatelitná instabilita (MSI), metylátorový fenotyp na CpG ostrovcích (CIMP), prítomnosť SCN ekvivalentná s chromozómovou nestabilitou CIN, prítomnosť klinicky relevantných mutácií vo vybraných, najčastejšie mutovaných onkogénoch ako sú *KRAS* a *BRAF*, infiltrácia bunkami imunitného systému, stromálna inváziu a najčastejšie aktivované signálne dráhy. Na základe údajov o celkovom prežívaní a prežívaní bez progresie bolo následne možné určiť prognózu pacientov, pričom najhoršie prežívanie bez relapsu mali pacienti s CMS4, najlepšia prognóza bola u pacientov s CMS1 [8].

Zjednodušenie klasifikácie CMS

Stanovenie jednotlivých CMS podtypov je metodicky zložitá a vyžaduje sekvenáciu transkriptómu pomocou postupov NGS, ktorej vyhodnotenie je spojené so zložitými bioinformatickými nástrojmi. Preto sú opakovane vyvíjané snahy o zjednodušenie identifikácie CMS pomocou cielených génových panelov na RNASeq [15], alebo imunohistochemickými postupmi, ktoré ukázali až 87% konkordanciu s CMS [16]. Jednou z možností dosiahnuť lepšiu molekulovú charakterizáciu CMS je využitie genetických biomarkerov, ktoré sú už dostupné. V klinickej praxi sa využívajú rôzne metódy molekulovej biológie a genetiky na určenie diagnózy, terapie a predikcie terapie pri nádorových ochoreniach [17]. Spojením výsledkov týchto analýz môžeme spolu s výsledkami histopatologickej diagnostiky dostať komplexnejší molekulovo-patologický obraz onkologického ochorenia určitého pacienta a priblížiť sa jeho

zaradeniu do jednotlivých CSM. V rámci tohto článku sa zameriame hlavne na genetické analýzy na úrovni DNA.

CMS1 alebo imunitný subtyp

Ak sa pozrieme na podrobnejšiu genetickú a genomickú charakterizáciu jednotlivých CMS podtypov, vidíme, že pre CMS1 subtyp je typická vysoká infiltrácia imunitnými bunkami, ktorá je hlavne výsledkom mikrosatelitnej instability (MSI) spôsobujúcej vysokú mutačnú záťaž. MSI má vplyv aj na tvorbu neoantigénov a produkciu chemotaktických cytokínov pre T bunky [18], ktoré sú prítomné práve v tomto molekulovom subtype vo vysokej miere. MSI je dôsledkom nefunkčnej opravy zle spárovaných báz (mismatch repair, MMR), ktorá je zabezpečovaná MMR génmi, hlavne *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6*. Tieto gény boli najprv identifikované ako kauzálne gény Lynchovho syndrómu [19], v súčasnosti však vieme, že sa vyskytujú aj v sporadických KRK. Somatické mutácie v MMR génoch a metylácia promótoru *MLH1* boli identifikované v 15% sporadických KRK v rámci projektu TCGA [7]. Aj v našich prácach sme sa venovali kolorektálnym karcinómom s MSI, kde sme využívali fragmentovú analýzu na detekciu MSI pomocou piatich jednonukleotidových mikrosatelitných markerov, a detekciu metylácie promótorovej oblasti génu *MLH1* pomocou metylačne špecifickej PCR [20]. Práve tieto dva biomarkery vhodne dopĺňajú charakterizáciu CSM1 na úrovni DNA. Ďalšou molekulovou príčinou vysokej mutačnej záťaže je prítomnosť somatických a germinatívnych mutácií v génoch *POLE* a/alebo *POLD*, ktoré sa nachádzajú prevažne v exonukleázovej doméne DNA polymerázy [21]. Práve koncentrácia mutácií v oblasti kódujúcej exonukleázovú doménu proteínu umožňuje jednoduchý mutačný skrining Sangerovou sekvenačnou metódou, ktorú máme zavedenú v našom laboratóriu [22]. Detekcia MSI je teda dôležitým genetickým markerom na detekciu pozitívneho prognostického parametra pre KRK, ktorý charakterizuje aj CMS1, pričom je tento parameter už aj prediktívny pre liečbu pomocou inhibítorov strážnych bodov [23]. Ďalšou unikátnou genetickou kombináciou, charakteristikou pre CSM1 je prítomnosť MSI a mutácie v géne *BRAF* [8], pričom mutačné analýzy génu *BRAF* patria tiež medzi rutinné analýzy, ktoré robíme aj v našich laboratóriách v laboratóriách [20, 24].

CMS2 – kanonický subtyp

Hlavnou genetickou charakteristikou subtypu CMS2, ktorý je označovaný aj ako kanonická, je prítomnosť veľkého množstva SCNA, ktoré spôsobujú stratu alebo zisk DNA úsekov v genóme. V projekte TCGA boli zaznamenané pre KRK zisky SCNv hlavne v chromozomálnych oblastiach 7, 8q, 13q a 20q, a straty SCNv na chromozómoch 4, 17p a 18q, pričom bolo dokázané, že hlavnými postihnutými signálnymi dráhami sú WNT a MAPK [7]. Detekcia SCNv, ktorá by svojou výpovednou hodnotou bola na úrovni CMS2 zatiaľ nebola validovaná v klinických štúdiách. Často mutovanými génmi týchto signálnych dráh sú hlavne gény *APC* a *CTNNB1*, pričom v oboch prípadoch dochádza k akumulácii nukleárneho β -katenínu a indukcii génovej expresie pre bunkovú proliferáciu. Ukazuje sa, že pacienti s vysokými jadrovými expresiou β -katenínu, ktorá je dôsledkom mutácií buď v géne *APC* alebo *CTNNB1*, spolu s *KRAS* mutáciou majú 5 ročnú prognózu oveľa horšiu ako pacienti s nízkou jadrovou expresiou β -katenínu [25,26]. Pri využívaní multigénových panelov je preto potrebné okrem už potvrdených klinicky relevantných biomarkerov ako sú mutácie v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF*, zahrnúť do hodnotenia pacientov aj mutácie v génoch *APC*, *CTNNB1*, ale aj *TP53*. Hlavne mutácie v génoch *APC* a *TP53* mutácie sa nachádzajú vo zvýšenej miere v CMS2 nádoroch. Okrem toho sa tieto mutácie stali

významnými parametrami nového robustného prognostického algoritmu, deliaceho KRK do prognostických tried na základe prítomnosti mutácií v génoch *APC*, *TP53* a *KRAS* [27], čo poukazuje na prepojenie s CMS2, a prognostický význam týchto mutácií v kontexte CMS2. V našich predbežných NGS analýzach pomocou multigénového panelu sme využili prognostický algoritmus podľa mutácií v génoch *APC*, *KRAS* a *TP53* [27], zaradili sme pacientov do prognostických tried [28], a pokračujeme vo validácii prognostického významu zistených mutácií na základe klinických údajov o prežívaní bez progresii a celkovom prežívaní pacientov.

CMS3 – metabolický subtyp

CMS3 je metabolický subtyp, charakterizovaný hlavne prítomnosťou mutácií v géne *KRAS*, ktoré sú asociované s nádorovým metabolizmom, hlavne s metabolizmom cukru, nukleotidov a degradáciou mastných kyselín [29]. Táto skupina je najheterogénnejšia s ohľadom na prítomnosť bežných genetických biomarkerov, pretože sa v nej nachádzajú nádory s MSI aj SCNV, bola tu pozorovaná znížená metylácia DNA [8]. Ukazuje sa však, že metabolické reprogramovanie nádorových buniek sa deje hlavne cez gény biogenézy ribozómov, mRNA translácie a jej metabolizmu, ktoré sú nadexprimované v *KRAS* mutovaných CRC. Okrem toho zohráva úlohu aj nadexpresia signálnej dráhy *TP53*, čo môže byť aj dôsledkom mutácií v géne *TP53*. Najvýznamnejšie genetické biomarkery tejto skupiny sú mutácie v géne *TP53* a *KRAS*, ktoré sú aj súčasťou multigénového panelu, ktorý využívame na našom pracovisku v spolupráci s Martinským centrom pre biomedicínu [28]. Úloha mutácií v prognóze a v terapii pacientov s KRK a CMS3 je predmetom ďalšieho výskumu, aby sme lepšie pochopili práve jednotlivé genetické podskupiny CMS ako aj to, prečo v niektorých prípadoch je prognostický význam tých istých mutácií odlišný a závisí aj od subtypu CMS [27, 30],

CMS4 – mesenchýmový subtyp

CMS4 je označovaný tiež ako mezenchýmový, a patrí tiež medzi geneticky veľmi heterogénnu skupinu. Jeho charakteristickou črtou je vysoká variabilita na úrovni SCNV, aktivácia signálnej dráhy TGF β a silná expresia génov, ktoré sú typické pre stromálne bunky [8]. Práve veľké množstvo SCNV má negatívny prognostický význam, pretože vedie k deregulácii mnohých signálnych dráh [31]. Ako už bolo spomenuté, metódy na stanovenie SCNV sú podobne náročné ako RNA sekvenácia pomocou NGS. Práve pri tejto kategórii je génová expresia silne ovplyvnená nádorovým mikroprostredím, hlavne stromálnymi bunkami, a je najmenej charakterizovaných genetických biomarkerov. Okrem stromálnej invázie, ktorá je charakterizovaná na základe zmerania oblasti nádoru, ktorá je infiltrovaná stromálnymi bunkami vo viac ako 50%, a je negatívnym prognostickým, je dobrým biomarkerom pre CMS4 expresia miR200 [33]. Analýzy úrovni DNA nie sú v tomto prípade nápomocné a vyžadujú ďalší výskum. Jedným z vysvetlení môže byť, že práve v týchto nádoroch sú mutované gény, ktoré sú celkovo menej často mutované, a SCNV je dominantnou silou karcinogenézy.

Záver

Charakterizácia nádorov pomocou analýz transkriptómu využíva zložité metódy, a je ťažko uplatniteľná v klinickej praxi. Ukázali sme, že určité biomarkery na úrovni DNA môžu charakterizovať pacientov s jednotlivými CMS, hlavne CMS1, CMS2 a CMS3, a spolu histopatologickou diagnostikou prispieť k lepšej stratifikácii pacientov ohľadne

ich prognózy. Ďalší výskum je však potrebný, aby výsledky analýz génovej expresie a DNA bolo možné lepšie spolu integrovať.

Práca bola podporená grantami VEGA č. 1/0380/18, APVV-16-0066, a LISPER (Integratívna stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života), podporovaný zo zdrojov EU.

Literatúra:

- [1] Fearon and Vogelstein, *Cell*. **1990**, 61:759–767.
- [2] Vogelstein, *Science*. **2013**, 339:1546–1558.
- [3] Galon, *Science*. **2006**, 313:1960–1964.
- [4] Blons, *PLoS One*. **2013**, 8:e68945.
- [5] Loeb, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2019**, 116:26863–26872.
- [6] Pages, *Lancet*. **2018**, 391:2128–2139.
- [7] The Cancer Genome Atlas Network, *Nature*. **2012**, 487:330–337.
- [8] Guinney, *Nat Med*. **2015**, 21:1350–1356.
- [9] Marisa, *PLoS Med*. **2013**, 10:e1001453.
- [10] Sadanadam, *Nat Med*. **2013**, 19:619–625.
- [11] Roepman, *Int J Cancer*. **2014**, 134:552–562.
- [12] Budinska, *J Pathol*. **2013**, 231:63–76.
- [13] Schlicker, et al., *BMC Med Genomics*. **2012**, 5:66.
- [14] De Sousa, *Nat Med*. **2013**, 19:614–618.
- [15] Dunne, *Clin Cancer Res*. **2016**, 22:4095–4104.
- [16] Trinh, *Clin Cancer Res*. **2017**, 23:387–398.
- [17] Lasabova a Plank, *Onkológia*. **2018**, 6:12–17.
- [18] Giannakis, *Cell Rep*. **2016**, 15:857–865.
- [19] Peltomaki, *Fam Cancer*. **2016**, 15:385–393.
- [20] Kasubova, *Oncol Lett*. **2019**, 17:3649–3656.
- [21] Elsayed, *Mol Genet Genomic Med*. **2019**, 7:e00603.
- [22] Lasabova, *Clin Exp Med*. **2019**, 19:393–400.
- [23] Mersakova, *Clin Exp Med*. **2019**, 21:195–204.
- [24] Malicherova, *Am J Transl Res*. **2018**, 10:3773–3781.
- [25] Lugli, *Histopathology*. **2007**, 50:453–464.
- [26] Phipps, *Br J Cancer*. **2013**, 108:1757–1764.
- [27] Schell, *Nat Commun*. **2016**, 7:11743.
- [28] Mikolajčík, *manuscript in preparation*.
- [29] Hagland, *Dig Surg*. **2013**, 14:157–165.
- [30] Yang, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2019**, 28:1141–1152.
- [31] Wang, *Oncogene*. **2016**, 35:2011–2019.
- [32] Huijbers, *Ann Oncol*. **2013**, 24:179–185.
- [33] Fessler, *Oncogene*. **2016**, 35:6026–6037.

Amyotrofická laterálna skleróza

Parvanovová, P.¹, Tatarková, Z.¹, Dobrota, D.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
parvanovova1@uniba.sk

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis is a fatal disorder characterized by the progressive loss of motor neurons. Although the molecular mechanism underlying motor neuron degeneration remains unknown, non-neuronal cells (including astrocytes) shape motor neuron survival in ALS. Of a variety of early pathological changes, the most specific to amyotrophic lateral sclerosis is the Bunina body. Thus it gives us important clues to the pathogenic mechanism involved in motor neuron degeneration. Due to the important functions that astrocytes perform in the central nervous system; it is of key importance to understand how these functions are altered when astrocytes become reactive in ALS. Given the key role that astrocytes play in the pathology of ALS, therapeutic approaches to modulate astrocyte biology may contribute to the development of integral therapeutic options to arrest the progression of ALS.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, bunina bodies, astrogliosis

Úvod

Amyotrofická laterálna skleróza (ALS) je charakterizovaná progresívnou degeneráciou motorických neurónov v mieche, mozgovom kmeni a motorickej kôre. Smrť motorických neurónov vedie k svalovej slabosti a paralýze, ktorá obvykle spôsobí smrť za jeden až päť rokov od objavenia prvých príznakov. ALS je najbežnejšou formou ochorenia motorických neurónov s frekvenciou výskytu 2,8 / 100 000 prípadov v Európe a 1,8 / 100 000 v Severnej Amerike, pričom priemerná prevalencia je 5,4 / 100 000 prípadov v Európe a 3,4 / 100 000 v Severnej Amerike. [1] Súčasný odhad naznačuje, že počet osôb trpiacich amyotrofickou laterálnou sklerózou sa do roku 2040 zvýši v celosvetovom meradle o viac ako dve tretiny. [2] Približne 5-10% prípadov ALS má rodinnú anamnézu ochorenia (Familiárna forma ALS) a najčastejšie súvisí s dominantnou mutáciou. Vek nástupu familiárnej formy je približne o desaťrocie skôr ako u sporadickej formy ochorenia, postihuje rovnako mužov i ženy a má kratšie prežitie. [3] Zvyšok prípadov ALS nemá rodinnú anamnézu, preto je klasifikovaná ako sporadická forma ochorenia a môže vzniknúť ako dôsledok zatiaľ neidentifikovanej environmentálnej expozície alebo genetických mutácií. [4] Nástup ALS môže byť taký jemný, že sa príznaky prehliadnu, ale postupne sa tieto príznaky rozvinú do zjavnejšej slabosti alebo atrofie, ktorá môže spôsobiť, že lekár bude mať podozrenie na ALS. Medzi prvé príznaky patrí: fascikulácie v ruke, nohe, ramene alebo jazyku, svalové kŕče, spasticita, svalová slabosť postihujúca ruku, nohu, krk alebo bránicu, nezrozumiteľná a nazálna reč. Tieto sprevádzajú ťažkosti so žuvaním a prehĺtaním, ktoré sťažujú normálne stravovanie a zvyšuje sa riziko udusení. Pacienti s ALS taktiež spaľujú kalórie rýchlejšie než zdravá časť populácie. Vďaka týmto faktorom majú pacienti s amyotrofickou laterálnou sklerózou tendenciu rýchlo chudnúť, čo môže viesť až k podvýžive. U mnohých jedincov sa prvé príznaky ALS objavujú v ruke alebo na paži, kedy možno pozorovať ťažkosti s jednoduchými úlohami, ako je zapínanie gombíkov na košeli, písanie alebo otáčanie kľúčom v zámku. Spočiatku dochádza k postihnutiu napr. jednej z nôh, kedy jedinci pociťujú nepríjemné pocity pri chôdzi

alebo behu, častejšie zakopávajú bez príčiny. Bez ohľadu na to, v ktorej časti tela sa príznaky objavia prvý raz, svalová slabosť a atrofia sa šíria postupne s progresiou ochorenia aj do ďalších častí tela. Individuálne sa môžu vyskytnúť problémy s pohybom, dysfágia, dyzartria a dyspnoe. Keďže ľudia s ALS si zvyčajne zachovávajú svoju schopnosť vykonávať vyššie mentálne procesy, ako sú uvažovanie, zapamätanie si, porozumenie a riešenie problémov, sú si vedomí svojej postupnej straty funkcie a môžu prepadať úzkosti a depresii. U všetkých pacientov s ALS sa postupne vyvinú ťažkosti s dýchaním, nakoľko svaly dýchacieho systému slabnú. Postihnutí taktiež čelia zvýšenému riziku zápalu pľúc v neskorších štádiách ochorenia. Okrem svalových kŕčov, ktoré môžu spôsobovať nepohodlie, sa u niektorých osôb s ALS môže vyvinúť bolestivá neuropatia. ALS je primárne diagnostikovaná na základe podrobnej anamnézy symptómov a znakov pozorovaných lekárom počas fyzického vyšetrenia spolu so sériou testov na vylúčenie iných podobných ochorení. Prítomnosť symptómov horného a dolného motorického neurónu je silným prediktorom ochorenia, hoci v počiatočných štádiách ochorenia môžu javiť ako príznaky širokej škály iných, lepšie liečiteľných chorôb alebo porúch. V liečbe pacientov s ALS je registrovaný jediný liek riluzol. Predpokladá sa, že redukuje poškodenie motorických neurónov znížením hladiny glutamátu, ktorý prenáša informácie medzi nervovými bunkami a motorickými neurónmi. Klinické skúšky u ľudí s ALS ukázali, že riluzol zvyšuje prežívanie pacientov o niekoľko mesiacov, najmä v bulbárnej forme ochorenia, avšak nie je schopný obnoviť už spôsobené poškodenie motorických neurónov. Avšak popri jeho dokázanej klinickej prospešnosti pretrvávajú otázky vzhľadom na vysoké náklady, relatívne nízkej účinnosti a obavy z vedľajších účinkov. Porozumenie a následné objasnenie možných bunkových mechanizmov, ktoré sú príčinou tohto ochorenia môžu napomôcť k objaveniu nových terapeutických prístupov u pacientov s ALS.

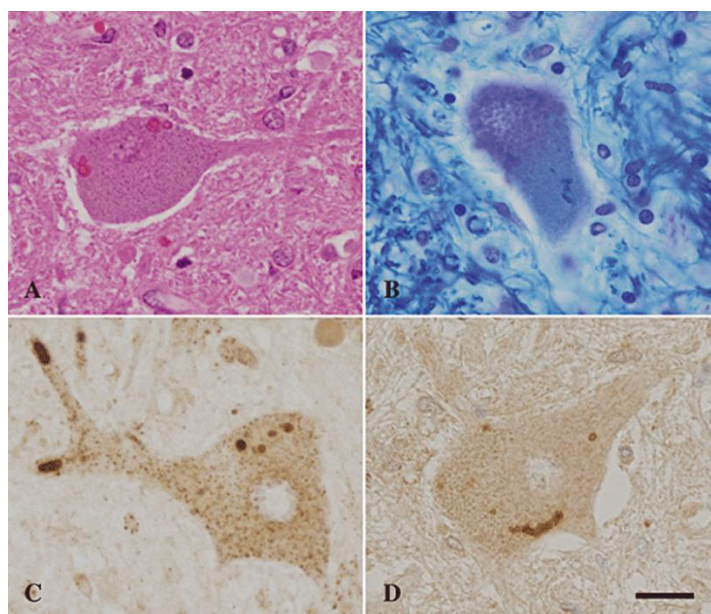
Všeobecné histologické zmeny

Medzi histologické zmeny pozorované pri ALS patrí strata neurónov a axónov. Strata myelinizovaných axónov v bočných a predných stĺpcoch miechy a zmenšovanie veľkosti predného rohu miechy. Bola pozorovaná degenerácia a samotná strata veľkých motorických neurónov v prednom rohu miechy, dolné kraniálne motorické jadrá mozgového kmeňa a Betzove bunky v motorickej kôre. Morfometrické štúdie miechového predného rohu ukázali globálnu redukciu všetkých neurónov v prednom rohu, nielen veľkých alfa motorických neurónov. [5] Taktiež existujú dôkazy o znížení veľkosti neurónov, ako aj o strate a atrofii nervových vlákien. Medzi ďalšie patologické znaky ALS patrí vakuolizácia, veľké prázdne miesta v blízkosti neurónov a spongióza, mikroskopické otvory, ktoré majú za následok vzhľad špongie.

Buninove telieska

Buninove telieska, ktoré sú viditeľné ako malé eozinofilné intraneuronálne inklúzie v zostávajúcich dolných motorických neurónoch, sú všeobecne považované za špecifický patologický znak amyotrofickej laterálnej sklerózy. Tieto telieska boli prvýkrát opísané Buninou v roku 1962 v dvoch prípadoch familiárnej formy ALS, [6] a neskôr boli pozorované aj u ostatných pacientov s ALS, z ktorých špecifickú skupinu tvoria obyvatelia ostrova Guama, kde v polovici 50 rokov 20 storočia zaznamenali mimoriadne vysoký výskyt ALS. [7] Aj keď sú ich morfológické štruktúry dobre známe, ich povaha, pôvod a význam zostávajú nejasné. Skutočnosť, že buninové telieska sa objavili nielen v degenerujúcich neurónoch, ale aj v normálne vyzerajúcich neurónoch, naznačuje, že telieska sú počiatočnou zmenou alebo reakciou motorických neurónov. Z tohto dôvodu by mohli predstavovať primárne a esenciálne patologické zmeny

pozorované v bunkách predného rohu u ALS, ako je narušený metabolizmus proteínov. Buninové telieska sa dajú ľahko vizualizovať svetelným mikroskopom pomocou farbenia hematoxilín-eozín ako jasne ružové, malé, okrúhle, oválne eozinofilné intraneuronálne inklúzie, ktoré niekedy vykazujú jasné oblasti v strede a vytvárajú zhluky. Majú priemer 3–5 mikrónov a ich počet sa líši v jednotlivých neurónoch. Sú prítomné v cytoplazme aj v dendritoch, avšak v axoplazme nie sú viditeľné. Pri použití toluidínovej modrej sú telieska viditeľné ako jasné fialové granule. Buninové telieska boli častejšie pozorované v bedrovej šnúre než v krčných a hrudných šnúrach, s vyššou frekvenciou výskytu u pacientov s relatívne krátkou dĺžkou ochorenia. ALS pacienti s pridruženou demenciou majú zvyčajne väčšie Buninové telieska v dolných motorických neurónoch oproti pacientom s klasickou formou ochorenia, pričom najčastejšie sa vyskytujú v cytoplazme motorických neurónov, ale príležitostne sú prítomné aj v dendritoch.[8] Ich počet na neurón je veľmi variabilný, niekedy môžu vytvárať reťazce a zhluky. Zriedka sú viditeľné v Betzových bunkách, neurónoch okulomotorických jadier a Onufových jadrách. [9]



Obr. 1 Buninové telieska v bunkách predného rohu v bedrovej šnúre amyotrofickéj laterálnej sklerózy. (A) HE farbenie; (B) farbenie Klüver-Barrera; (C) imunoreaktivity cystatínu C sú viditeľné v bunkách Buniny v bunke predného rohu a jej dendritoch; (D) transferínové imunoreaktivity sú vidieť v bunkách Bunina. (Mierka = 20 µm; podľa [15])

Astrocyty

Astrocyty, najrozšírenejší typ gliálnych buniek v centrálnom nervovom systéme, sú zodpovedné za hlavné ochranné funkcie pre motorické neuróny, ako je uvoľňovanie trofických faktorov a odstraňovanie glutamátu zo synaptickej štrbiny. Postupne sa dostáva do povedomia odbornej verejnosti význam aktivovaných astrocytov pri ALS. Tieto vykazujú, tak u ľudí ako aj na zvieracích modeloch ALS, zníženú expresiu glutamátového transportéra, ktorá favorizuje glutamátom-indukovanú excitotoxicitu. [10] Bunkové kultúry astrocytov nesúce mutančný SOD1 uvoľňujú do extracelulárneho priestoru metabolity a/alebo proteíny, ktoré sú selektívne toxické pre motorické neuróny. [11] Navyše, v *in vivo* podmienkach sa aktívne podieľajú na patológii, čo podporilo použitie týchto buniek ako terapeutického cieľa. [12]

Astrocyty reagujú na poškodenie CNS, ako je trauma, infekcia, ischémia a neurodegenerácia, procesom nazývaným astroglióza. [13] Tento proces spôsobuje

abnormálne zvýšenie počtu astrocytov v dôsledku deštrukcie blízkych neurónov z centrálného nervového systému. Astroglióza je všeobecne charakterizovaná zvýšenou reguláciou GFAP proteínu (gliový fibrilárny acidický proteín), vimentínu a re-expresiou nestínu. Tieto zmeny sprevádza hypertrofia bunkových procesov, biochemické zmeny exprese proteáz, cytokínov a rastových faktorov. Aj keď sa astroglióza tradične považuje za stereotypnú odpoveď typu všetko alebo nič, predstavuje zložitú prestavbu biológie astrocytov.

Na základe závažnosti a vzdialenosti od miesta poškodenia môžu byť u reaktívnych astrocytov prítomné rôzne zmeny, ktoré sa pohybujú od reverzibilných zmien v génovej expresii a bunkovej hypertrofii až po výraznú bunkovú proliferáciu s kompaktnou tvorbou jaziev. Avšak mierna astroglióza môže byť neuroprotektívna. Dokonca aj tradičná predstava, že tvorba gliálnych jaziev je škodlivá pre regeneráciu axónov, bola spochybnená nedávnymi zisteniami, ktoré ukazujú, že tvorba jaziev skôr napomáha regenerácii axónov v CNS. [14] Aj keď je ťažké predpovedať presné následky reaktívnej astrogliózy, strata normálnej funkcie alebo získané nové charakteristiky astrocytov môžu mať priamy vplyv na osud neurónov. Terapeutický potenciál astrocytov v ALS možno ilustrovať priaznivým účinkom substitučných terapií zameraných na obnovenie normálnej funkcie astrocytov alebo stratégií, ktoré menia biológiu astrocytov a následne modifikujú interakciu astrocytov a motorických neurónov. Pochopenie úlohy astrocytov v neurodegeneratívnom procese a ich interakcia s neuronálnymi a ne-neuronálnymi bunkami poskytuje koncepčný rámec, ktorý zdôrazňuje potenciál astrocytov ako ohniska terapeutického úsilia. Centrálna úloha, ktorú astrocyty zohrávajú v ALS, naznačuje, že terapie zamerané na moduláciu biológie astrocytov môžu prispieť k rozvoju integrálnych terapeutických prístupov schopných zastaviť progresiu ochorenia.

Zhrnutie a záver

Amyotrofická laterálna skleróza (ALS) je charakterizovaná progresívnou degeneráciou motorických neurónov v mieche, mozgovom kmeni a motorickej kôre. V posledných desaťročiach sa chápanie patológie ALS významne rozvinulo. Avšak identifikácia terapeutických prístupov, ktoré v konečnom dôsledku zlepšujú príznaky a životnosť pacientov s ALS je v súčasnosti nedostatočná. Preto pochopenie histopatologických zmien u pacientov s ALS by mohlo významne napomôcť pri vývoji nových terapeutických postupov, ktoré by zabránili doposiaľ ireverzibilnej progresii tohto ochorenia. Taktiež identifikácia histopatologických zmien by mohla byť nápomocná pri včasnej a jednoznačnej diagnostike tohto závažného ochorenia.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore grantu UK/302/2021 a v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: "Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení", ITMS kód projektu: 26220220153, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Chio, *Neuroepidemiology*. **2013**, 41:118–130.
- [2] Arthur, *Nat Commun*. **2016**, 7:12408.
- [3] Veltema, *J Neurol Sci*. **1990**, 97:93–115.
- [4] Renton, *Nat Neurosci*. **2014**, 17:17–23.
- [5] Stephens, *Journal of the Neurological Sciences*. **2006**, 244:41–58.
- [6] Bunina, *J Neuropathol Psychiatry*. **1962**, 62:1293–1299.
- [7] Hirano, *Arch Neurol*. **1962**, 7:227–42.
- [8] Kuroda, *Acta medica Okayama*. **1990**, 44:41–45.
- [9] Okamoto, *Neuropathology*. **2008**, 28:109–115.

- [10] Howland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99:1604–1609.
- [11] Aebischer, *Cell Death Differ.* **2011**, 18:754–768.
- [12] Wang, *Hum Mol Genet.* **2011**, 20:286–293.
- [13] Sofroniew, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2014**, 7:a020420.
- [14] Anderson, *Nature.* **2016**, 532:195–200.
- [15] Okamoto, *Neuropathology.* **2008**, 28:109–115.

Intersomatické klieťky s integrovanou dlahou v liečbe degeneratívneho ochorenia krčnej chrbtice

Hanzel, R.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine a Univerzitná nemocnica Martin, Neurochirurgická klinika, Martin
hanzelradoslav@gmail.com

Abstract

Anterior cervical discectomy and fusion (ACDF) represents the golden standard in surgical treatment for degenerative disc disease of the cervical spine. Since the description of the anterior approach for cervical discectomy and fusion by Robinson and Smith in 1955, anterior cervical procedures have become quite common with generally good clinical results. The plate-cage construct applied in ACDF has become the standard method of anterior reconstruction to allow complete immediate stability, thereby improving clinical outcomes. However, plate - cage use is associated with complications such as dysphagia and adjacent segment degeneration. To minimize these issues, some authors have advocated for treatment involving some new anterior internal fixation system – intersomatic cage with integrated plate.

Keywords: anterior cervical discectomy, cage with integrated plate, zero profile spacer, anchored cage

Úvod

Predná krčná diskektómia a indukcia intersomatickej fúzie je najčastejším operačným výkonom pre degeneratívne ochorenie krčnej chrbtice (ACDF). Zlatým štandardom ošetrenia pohybového segmentu krčnej chrbtice po prednej krčnej diskektómii je rekonštrukcia výšky medzistavcového priestoru a následná indukcia intersomatickej fúzie. Použitie syntetickej náhrady medzistavcovej platničky bez istenia predstavuje riziko jej zanorenia a následnej straty operačne získanej segmentovej lordózy a distrakcie. Vzhľadom k tomu bolo okrem úrazových indikácií do praxe zavedené použitie predných krčných dlah. Nevýhodou použitia prednej krčnej dlahy je nutnosť väčšieho operačného prístupu, a tým aj tendencia k tvorbe rozsiahlych fibroadhezívnych zmien. Intímna vzdialenosť medzi okrajmi prednej krčnej dlahy a príľahlými medzistavcovými priestormi môže viesť k osifikácii uvedených segmentov. Použitie klieťky s integrovanou dlahou prináša možnosť bezpečného ošetrenia intervertebrálneho priestoru a indukcie intersomatickej fúzie pri súčasnej eliminácii nevýhod konvenčnej krčnej dlahy a má predpoklady stať sa optimálnou voľbou pre ošetrenie intervertebrálneho priestoru po prednej krčnej diskektómii. Dizajn klieťky s integrovanou dlahou predpokladá redukciu výskytu osifikácie príľahlého segmentu a minimalizáciu operačného prístupu s redukciou tvorby fibroadhezívnych zmien [1-3]. Nulový profil uvedených implantátov predpokladá elimináciu iritácie hypofaryngu a ezofágu [1,2,4-10].

Benefity intersomatických klieťky s integrovanou dlahou

Nesporňou výhodou dizajnu klieťky s integrovanou dlahou je nulový profil implantátu (vlastný implantát neprominuje pred úroveň predných plôch tiel príľahlých stavcov) pri jeho zachovanej bezpečnej stabilizácii v intervertebrálnom priestore. Uvedené riešenie odstraňuje nevýhody prednej krčnej dlahy a zachováva jej prednosti. Scholz et al.

v biomechanickej štúdii na kadaveroch zistili menšiu stabilitu kliečky Zero Profile® v anteflexii a retroflexii v porovnaní s kliečkami istenými konvenčnou pednou krčnou dlahou, rozdiel však nebol signifikantný [3]. Menšia flekčno- extenčná stabilita kliečky s integrovanou dlahou je pravdepodobne príčinou rýchlejšieho nástupu kostnej fúzie v porovnaní s implantáciou kliečky istenej konvenčnou krčnou dlahou [1, 3]. Dostatočnú biomechanickú stabilitu kliečok s integrovanou dlahou referujú aj štúdie autorov Majid et al. a Stein et al. [11, 12]. Klinické štúdie udávajú úspešnosť fúzie 90 - 100 % po ACDF v jednom segmente a 70 - 100 % po dvojsegmentovej ACDF [13-15]. Scholz et al. udávajú po použití kliečky s integrovanou dlahou a nulovým profilom incidenciu fúzie v období 12 mesiacov po operačnom výkone na úrovni 97 % [16]. Dysfágia je častá komplikácia po ACDF. Medzi preventívne opatrenia redukujúce výskyt pooperačnej dysfágie patrí šetrná operačná technika, dôsledná hemostáza počas operačného výkonu a aplikácia drénu na konci operačného výkonu pre elimináciu výskytu hematómu v operačnej rane. Lee et al. skúmali význam dizajnu prednej krčnej dlahy ako rizikového faktoru. Vo svojej prospektívnej štúdii zistili, že použitie konvenčnej krčnej dlahy Zephir® (Medtronic, Sofamor Danek, USA) je spojené s nižšou incidenciou pooperačnej dysfágie ako použitie dlahy Atlantis® od rovnakého výrobcu. Autori vysvetľujú uvedené zistenie hladším povrchom a nižším profilom krčnej dlahy Zephir [17]. Fogel et al. referujú v retrospektívnej analýze pacientov s perzistujúcou poruchou prehĺtania po implantácii konvenčnej dlahy regresiu dysfágie po jej odstránení v 55 % prípadov. Peroperačne nachádzali autori rozsiahle adhézie medzi pažerákom a dlahou, prípadne prevertebrálnou fasciou [18]. Výhodné je použitie kliečok s integrovanou dlahou pri ošetrovaní degeneratívnych zmien segmentu priľahlého k segmentu s indukovanou fúziou pomocou kliečky istenej konvenčnou krčnou dlahou, pretože nie je nutné jej odstránenie. Rovnako je vhodné ich použitie pri hybridných implantáciách v kombinácii s totálnou artroplastikou. Elimináciou konvenčnej krčnej dlahy sa znižuje incidencia osifikácie priľahlých segmentov. Park et al. referujú že incidencia osifikácie priľahlých segmentov je nepriamo úmerná vzdialenosti konca dlahy a intervertebrálneho disku priľahlého segmentu [19].

Zero Profile®

Prvým implantátom s integrovanou dlahou bola kliečka Zero Profile® (Zero-P, DePuy Synthes, Švajčiarsko, obr. 1), ktorá sa skladá z tela (polyéteréterketón alebo titán), integrovanej titánovej dlahy a štyroch uzamykateľných fixačných skrutiek. Dutinu kliečky je možné vyplniť spongióznou kosťou alebo syntetickým osteokonduktívnym materiálom. Kliečka sa vyrába v troch tvarových vyhotoveniach – konvexné, lordotické a paralelné. Medzi kontraindikácie použitia kliečky Zero-P® patria ťažká osteoporóza, nádorové a zápalové ochorenia chrbtice a úrazy chrbtice.



Obr. 1 Intersomatická klieťka Zero Profile® (DePuy Synthes, Švajčiarsko; zdroj: <https://i.pinimg.com/originals/9b/2e/f3/9b2ef3c06ad6b043efcedb2ca43cea8f.jpg>)

Azab et al. vo svojej prospektívnej štúdii hodnotili výsledky liečby pacientov po implantácii klieťky Zero-P® a uvádzajú, že je dobrou alternatívou k iným fúznym technikám, zaznamenali nízku incidencia pooperačnej dysfágie (žiadny pacient neudával poruchu prehĺtania 3 mesiace po operácii) a nezaznamenali komplikácie vo vzťahu k implantátu [20]. Dhir et al. retrospektívne hodnotili rádiologické nálezy krčnej chrbtice po implantácii klieťky Zero-P® a nezistili žiadne komplikácie vo vzťahu k implantátu (dislokáciu skrutiek alebo klieťky). Zanorenie implantátu bolo prítomné vo všetkých skúmaných prípadoch, ale signifikantné zanorenie (>3 mm) bolo verifikované len vo 2 % prípadov po 6 mesiacoch od výkonu [21]. Vzhľadom k tomu, že klieťka Zero-P® má v tele integrovanú dlahu, eliminuje nedostatok stand-alone klieťok – extenčnú instabilitu. Zavedenie 4 fixačných skrutiek istiacich klieťku v medzistavcovom priestore má divergentný smer, čo podmieňuje určitý stupeň segmentovej distrakcie vo ventrálnej časti segmentu, a tým aj významnejší lordotizačný efekt v porovnaní s istením klieťky pomocou konvenčnej krčnej dlahy. Pri použití konvenčnej dlahy dochádza skôr ku kompresii vo ventrálnej časti medzistavcového priestoru, a tým aj k redukcii segmentovej lordózy. Vaněk et al. uvádzajú, že v období 6 týždňov po ACDF dochádza k významnému poklesu medzistavcového priestoru ošetrovaného klieťkou Zero-P®, na čom sa spolupodieľa okrem axiálneho zaťaženia aj už spomínaná nižšia biomechanická stabilita uvedenej klieťky v anteflexii a retroflexii. Rovnaký mechanizmus viedol k zvýšeniu segmentovej lordózy v období 6 týždňov po ACDF v skupine pacientov po implantácii konvenčnej krčnej dlahy v dôsledku toho, že fyziologické zaťaženie pôsobilo proti ťahu dlahy. Pri neskorších kontrolách však nebol prítomný rozdiel medzi oboma skupinami v segmentovom sagitálnom profile. Celkový sagitálny profil nebol ovplyvnený vzhľadom k tomu, že išlo o implantácie v jednom alebo dvoch segmentoch [1]. Tento nález potvrdila aj štúdia autorov Barsu a Suchomela, ktorí sledovali vývoj sagitálneho profilu krčnej chrbtice po implantácii klieťky neistenej dlahou [22]. Klieťku Zero-P® sme používali na našom pracovisku od uvedenia implantátu do klinickej praxe v roku 2009. Použitie štyroch fixačných skrutiek zabezpečuje síce dostatočnú primárnu stabilitu klieťky, pri viac ako dvojsegmentových implantáciách však predlžuje dobu operačného výkonu. Použitie uvedeného implantátu v intervertebrálnom priestore C2/3 je technicky limitované a pri implantácii v segmente C3/4 bolo technicky niekedy obtiažne zaviesť fixačné skrutky do tela stavca C4 v dôsledku konfliktu trajektórie aplikácie skrutky s mandibulou. Podobný problém vznikol aj v segmentoch C6/7 a C7/T1 u pacientov s hyperstenickým habitom

a veľkým obvodom hrudníka, keď bolo obtiažne implantovať fixačné skrutky do tela proximálneho príslušného stavca v dôsledku konfliktu trajektórie aplikácie fixačnej skrutky s manubriom sternu.

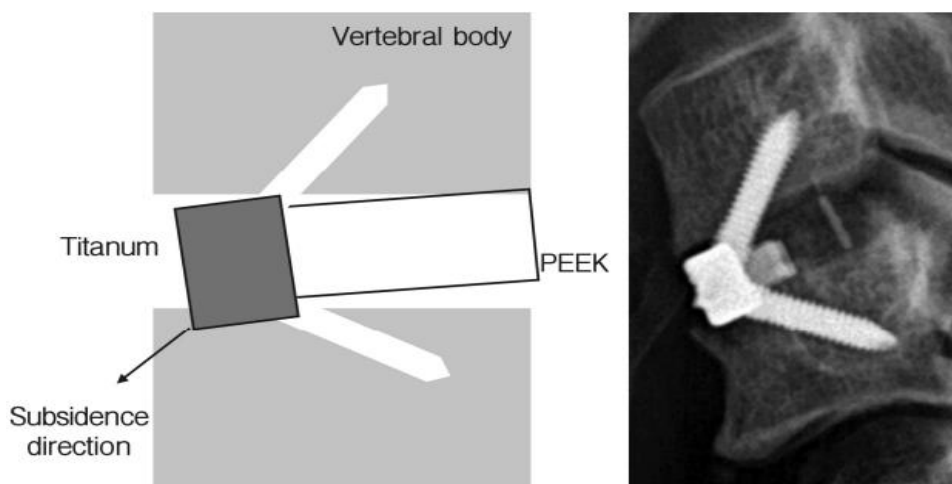
Zero Profile Variable angle®

Zero Profile Variable angle® (Zero-P VA®, DePuy Synthes, Švajčiarsko, obr. 2) predstavuje novú generáciu kietky s integrovanou dlahou. Rovnako ako pri kietke Zero-P sa vyrába v troch tvarových vyhotoveniach (konvexné, lordotické a paralelné). Ku fixácii kietky však slúžia len dve skrutky, ktoré sa dajú zaviesť pod variabilným uhlom a ich počet skracuje operačný čas pri ošetrovaní viacerých pohybových segmentov. Zavedenie skrutiek pod variabilným uhlom umožňuje použitie kietky pre ošetrovanie pohybového segmentu príslušného k primárne ošetrovanému segmentu pomocou konvenčnej krčnej dlahy. Na druhej strane však počet skrutiek znižuje primárnu stabilitu implantátu v porovnaní s kietkou Zero-P. Medzi vylepšenia patrí aj zmena dizajnu integrovanej titánovej dlahy, ktorej tvar determinuje presnú ventrodorzálnu inzerciu kietky a eliminuje možnosť dorzálnej dislokácie. Po nástupe kostnej fúzie je možné realizovať odstránenie dlahy a skrutiek, pri súčasnom ponechaní vlastného tela kietky v intervertebrálnom priestore.

Opšénák et al. zaznamenali po implantácii ukotvenej kietky Zero - P VA dlhodobý pokles intenzity bolesti šije, bolesti horných končatín a zlepšenie kvality života pacientov. Incidencia intersomatickej fúzie bola porovnateľná s kietkami istenými konvenčnou krčnou dlahou a nebol dokázaný žiadny rizikový faktor ovplyvňujúci úspešnosť fúzie. Výskyt a charakter pooperačných komplikácií v súvislosti s operačným prístupom bol podobný ako u iných implantátov. Nepotvrdil sa preventívny efekt nulového profilu implantátu na incidencia pooperačnej dysfágie. Jediným rizikovým faktorom pre incidencia pooperačnej dysfágie bola preexistujúca dysfágia. Dislokácia kietky alebo fixačných skrutiek a zlomenie implantátu neboli zaznamenané. Nepotvrdil sa preventívny efekt stabilizácie kietky v intervertebrálnom priestore pomocou fixačných skrutiek na zanorenie implantátu. Zanorenie kietky nemalo významný vplyv na efekt operačnej liečby a incidencia intersomatickej fúzie (obr. 3). Rizikovým faktorom pre zanorenie kietky bola denzitometricky verifikovaná osteoporóza alebo osteopénia [2, 23].



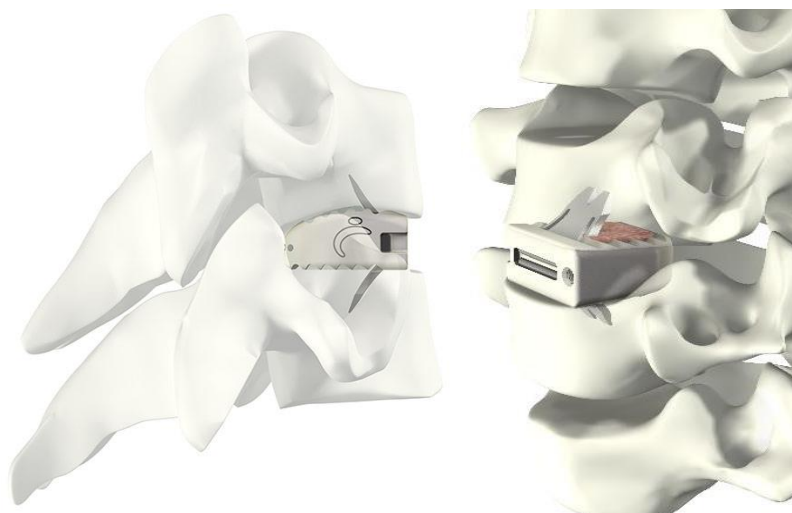
Obr. 2 Nová generácia kietky s integrovanou dlahou - Zero Profile Variable angle® (zdroj: https://www.jnjmedicaldevices.com/sites/default/files/2019-07/H1_1.png)



Obr. 3 Zanorenie intersomatickej kietky (zdroj: <https://www.thenerve.net/upload//thumbnails/nv-5-2-33f5.gif>)

ROI – C®

Zaujímavé riešenie primárnej stability kietky prináša kietka *ROI-C®* (LDR, Francúzsko, obr. 4) vo forme technológie VerteBRIDGE®. Jedná sa o unikátny systém ukotvenia kietky v intervertebrálnom priestore pomocou dvoch fixačných kotiev, ktorých implantácia je veľmi jednoduchá. Nedochádza ku konfliktom s anatomickými štruktúrami pri ich implantácii v porovnaní s kietkami Zero-P® a Zero-P VA®. Nedostatkom systému VerteBRIDGE® je však nemožnosť odstránenia fixačných kotiev pri revíziných výkonoch bez porušenia integrity kietky a znehodnotenia implantátu. Konštrukcia kietky umožňuje menší operačný prístup ako implantácia konvenčnej prednej krčnej dlahy, ale aj ako implantácia iných typov kietok ukotvených pomocou skrutiek. Grasso et al. v roku 2018 v prospektívnej štúdii so sledovaním 9 rokov potvrdzuje bezpečnosť uvedenej kietky aj pri dlhodobých kontrolách [24]. Bucci et al. rovnako dokazujú pri používaní systému *ROI-C* vysokú incidenciu fúzie a nízky výskyt dysfágie (2,3%). Poukazujú najmä na výhody pri fúzii v úrovni C7/T1, kde nie je nutné zasahovať kaudálnejšie ako po samotný disk [25]. Len málo štúdií porovnáva klinické a rádiologické výsledky ACDF medzi intersomatickými kietkami Zero-P a ROI-C. Wu et al. uvádzajú, že medzi kietkami ROI-C a Zero-P nebol významný rozdiel v incidencii dysfágie ani v incidencii zanorenia kietky. Výsledky ich práce potvrdzujú, že oba uvedené implantáty dosahujú podobné klinické a rádiologické výsledky. Priemerná doba operačného výkonu bola však dlhšia pri kietke Zero-P, čo vedie k zvýšenému riziku pooperačnej dysfágie (dlhšia doba trakcie hypofaryngu a ezofágu). Pokiaľ neboli zaradené do štatistického hodnotenia operované segmenty C3/4 a C6/7, nebol medzi uvedenými kietkami významný rozdiel v trvaní chirurgického výkonu. Z dlhodobého hľadiska pri kietke *ROI - C* dochádzalo k väčšej strate operačne získanej segmentovej lordotizácie [26].



Obr. 4 Klietka ROI-C® (LDR, Francúzsko) ukotvená pomocou technológie VerteBRIDGE® (zdroj: <http://fr.ldr.com/english/Products/Cervical/ROIC%C2%AECervicalCage>)

Záver

Intersomatické klietky s integrovanou dlahou a nulovým profilom predstavujú významný posun v operačnej liečbe degeneratívneho ochorenia krčnej chrbtice. Poskytujú dostatočnú biomechanickú stabilitu a indukciu fúzie porovnateľné s konvenčnými fixačnými systémami. Medzi ich výhody patrí redukcia incidencie a závažnosti pooperčnej dysfágie, kratší operačný čas a nižšia incidencia osifikácie priľahlých segmentov.

Literatúra

- [1] Vaněk, *Acta Chir Orthop Traumatol Czech*. **2011**, 78(6):562–567.
- [2] Opšenák, *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2018, 81(6):669–677.
- [3] Scholz, *Spine (Phila Pa 1976)*. **2009**, 34(2):156–60.
- [4] Opšenák, *Rozhledy v chirurgii*. **2019**, 98(3):115–120.
- [5] Hofstetter, *J Spinal Disord Tech*. **2015**, 28:E284–290.
- [6] Opšenák, *Gastroenterologie a hepatologie*. **2017**, 71(2):150–155.
- [7] Opšenák, *Neurologia pre prax*. **2017**, 18(2):92–95.
- [8] Xiao, *Eur Spine J*. **2017**, 26:975–84.
- [9] Hofstetter, *J Spinal Disord Tech*. **2015**, 28:E284–E290.
- [10] Yue, *Eur Spine J*. **2005**, 14:677–682.
- [11] Majid, *Clin Biomech*. **2012**, 27:532–536.
- [12] Stein, *Spine J*. **2014**, 14:128–136.
- [13] Rudinský, *Spinálna chirurgia*. Bratislava: Slovak Academic Press. **2006**, 36–147.
- [14] Martin, *Spine (Phila Pa 1976)*. **1999**, 24(9):852–858.
- [15] Thalgott, *Spine (Phila Pa 1976)*. **1999**, 24(13):1295–1299.
- [16] Scholz, *Acta Orthop Belg*. **2014**, 80(4):558–566.
- [17] Lee, *CSRS 32nd annual meeting*. **2004**, Edited, Boston, MA.
- [18] Fogel and McDonnell, *Spine Journal*. **2005**, 5(2):140–144.
- [19] Park, *J Bone Joint Surg Am*. **2005**, 87:558–563.
- [20] Azab, *Turk. Neurosurg*. **2012**, 22(5):611–617.
- [21] Dhir, *J Bone Joint Surg Br*. **2012**, 94(Suppl.):142.
- [22] Barsa and Suchomel, *Eur Spine J*. **2007**, 16:1395–1400.
- [23] Opšenák, *Neurologia*. **2019**, 14(1):20–23.
- [24] Grasso, *Eur Spine J*. **2014**, 23(Suppl 6):650–7.
- [25] Bucci, *Med Devices (Auckl)*. **2017**, 10:61–9.
- [26] Wu, *[ahead of print]*. **2019**, 11, <https://doi.org/10.21203/rs.2.12368/v1>.

Autofágia (Autofágová bunková smrť)

Adamkov, M.¹, Csizmárová, S.¹, Mešťanová, V.¹, Krajňáková, B.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
marian.adamkov@uniba.sk

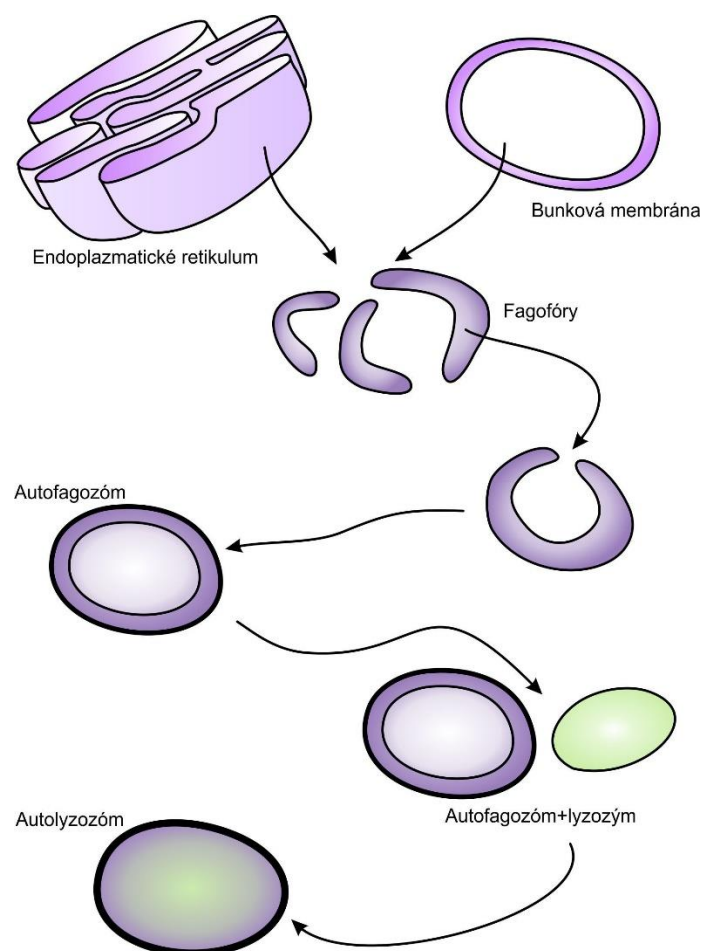
Abstract

Autophagy is a self-degradative intracellular mechanism that plays a key role to remove damaged organelles and other dysfunctional cell constituents. It is involved in maintenance of cellular homeostasis and normal cellular physiology under various stresses. Regardless of autophagy type, it is considered as cleaning system of cells. Autophagy is controlled by co-operation of different autophagy-related genes (ARGs). Autophagy dysregulation can cause many pathological consequences, including neurodegeneration, malignant tumors, Crohn's disease, etc. Paradoxically, autophagy sometimes plays both negative and positive roles in immunity, metabolism, cancer, development of nervous system, infection, cardiovascular diseases, and other clinico-morphological entities. This short review represents the introduction to unique type of cell death called autophagy with basic information which may arise well-deserved interest in deeper study of topic in question.

Keywords: autophagy, ARGs, cancers

Slovo autofágia je odvodené z dvoch gréckych slov: „auto“ znamená „seba-“ alebo „sám-“ a „phagein“ znamená „jesť“. Autofágia je spôsob bunkovej smrti, kedy eukaryotické bunky rozkladajú svoju vlastnú cytoplazmu a organely. Tento proces sa deje nezvyčajným mechanizmom, keď bunky dokážu uzavrieť niektoré zo svojich vnútrobunkových komponentov do membránového systému, čím sa vytvoria malé vezikuly. Ďalej sú potom vezikuly transportované do lyzozómov. Autofágia teda pôsobí ako zvláštny mechanizmus bunkovej smrti. Ale na druhej strane, niekedy má aj homeostatickú funkciu a to pri neletálnom bunkovom poškodení, kedy chráni už poškodenú bunku pred nedostatočným zásobením nutričnými látkami recykláciou vlastných proteínov a tým navodiť jej obnovu.

Podstatnú úlohu pri autofágii zohrávajú autofagozómy s dvojitou membránou. Prekurzorovými štruktúrami autofagozómov sú tzv. fagofóry (phagophores). Fagofóry sú derivované hlavne z ER (endoplazmatické retikulum) alebo z bunkovej membrány. Sú definované ako novovznikajúce dvojité membrány, ktorých predlžovaním a uzatváraním v konečnom dôsledku vznikajú autofagozómy. Formovanie autofagozómov si však vyžaduje lipidové a proteínové substancie, ktoré sú produkované ďalšími bunkovými organelami, napr. mitochondriami a Golgiho komplexom [1, 2, 3]. Vznik autofagozómov a autolyzozómov znázorňuje schematický Obr. 1.



Obr. 1 Schematický obrázok vzniku autofagozómu a autolyzozómu

Akonáhle sú autofagozómy vytvorené, tak začínajú pohlcovať niektoré bunkové komponenty, napr. poškodené proteíny alebo organely. Napokon autofagozómy splývajú s lyzozómami a vytvárajú autolyzozómy, kde nastáva degradácia ich obsahu. Autofágia dokáže tiež eliminovať baktérie a vírusy, čo prenikli do cytoplazmy buniek [4]. Autofágiu priamo vykonávajú tzv. autofagíny, napr. fosfatidylinositol 3-kináza, rodina cysteinových proteáz a smrť – asociované proteíny [5]. Hlavnou morfológickou črtou buniek odumretých na autofágiu je teda akumulácia autofágových vakuol lyzozomálneho pôvodu. Odumreté bunky sú len v malej miere (alebo vôbec nie) fagocytované makrofágmi alebo okolitými bunkami [6, 7].

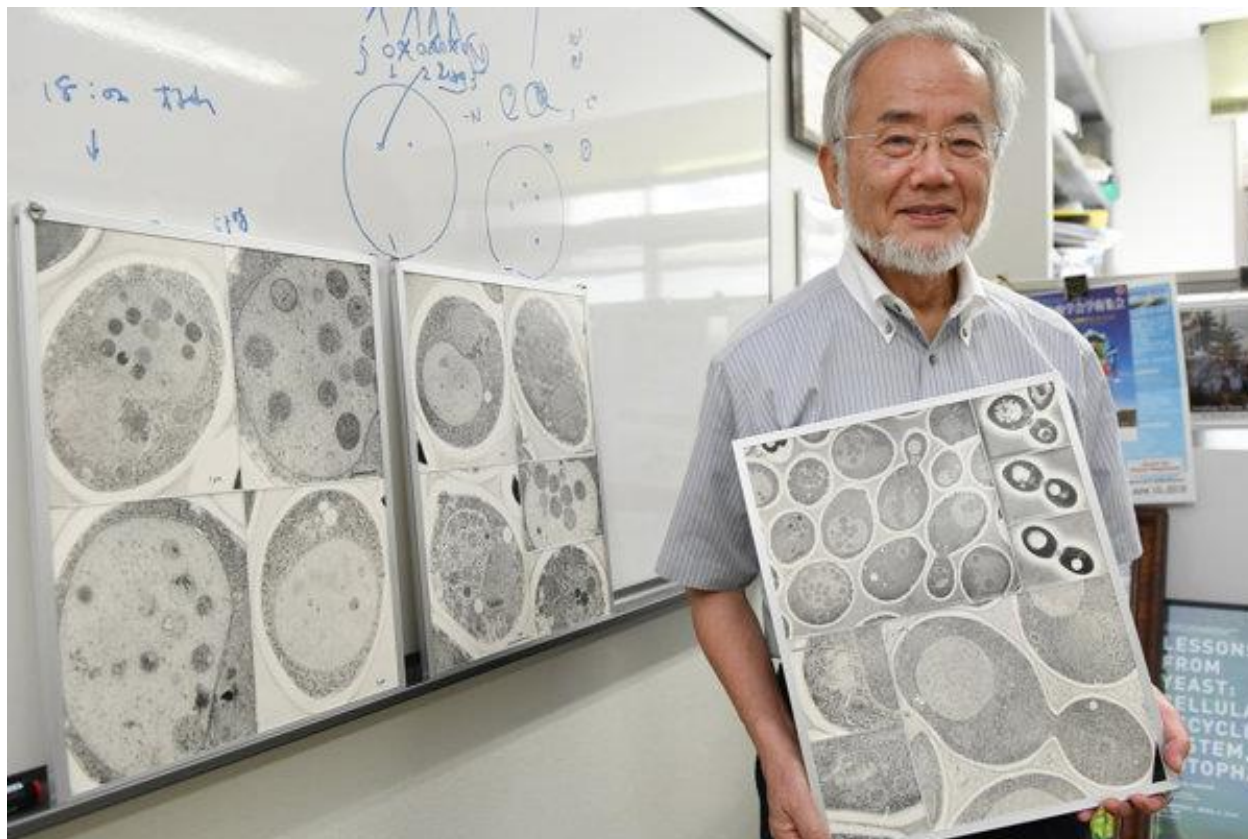
Cesty autofágovej a apoptotickej bunkovej smrti sa v niektorých častiach prekrývajú. Autofágia môže zablokovat apoptózu sekvestráciou mitochondrií. Keď sú však autofágické kapacity znížené, postihnuté bunky odumierajú apoptoticky. Inhibícia molekúl, ktoré sa zúčastňujú apoptózy, zmení spôsob bunkovej smrti a to cez autofágový mechanizmus [7, 8].

Podľa Clarkeovej klasifikácie je autofágia tiež nazývaná ako typ II PCD (programmed cell death). Autofágia predstavuje enormne dôležitý mechanizmus programovanej bunkovej smrti, napr. pri vývoji neuronálnej bunkovej populácie [9].

Udržiavanie bunkovej homeostázy za fyziologických podmienok nie je teda hlavnou úlohou autofágie. Autofágia zohráva podstatnú úlohu v tých bunkách, ktoré sú stimulované rôznymi extracelulárnymi a intracelulárnymi faktormi, napr. patogénmi, hypoxiou, nedostatkom nutričných látok, oxidačnými procesmi, a pod. [10, 11, 12].

Vo všeobecnosti možno konštatovať, že autofágia predstavuje dynamický katabolický mechanizmus, ktorý odstraňuje hlavne nepotrebné a nefunkčné organely a proteíny buniek [13].

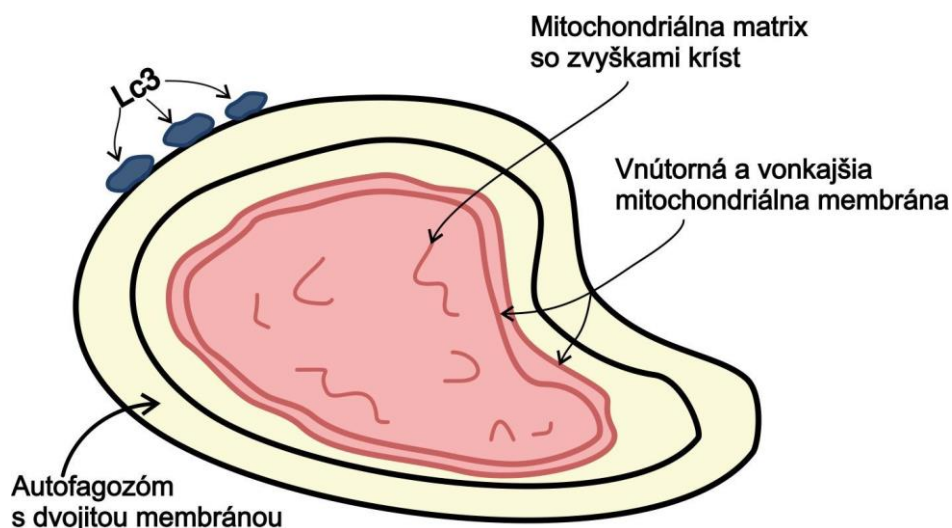
Za objasnenie mechanizmu autofágie získal japonský profesor Yoshinori Ohsumi Nobelovu cenu za fyziológiu a medicínu v r. 2016 (Obr. 2).



Obr. 2 Yoshinori Ohsumi

Mitofágia

Mitofágia reprezentuje zvláštnu formu autofágie, pri ktorej sú selektívne odstraňované poškodené mitochondrie (Obr. 3). Ide o veľmi dôležitý kontrolný mechanizmus mitochondrií, pretože defektná mitofágia spôsobuje akumuláciu nefunkčných / poškodených mitochondrií s následnou tvorbou ROS (reactive oxygen species), čo vyúsťuje v konečnom dôsledku do poškodenia bunky. Mitofágia je nezastupiteľná aj v prípadoch, kedy počet mitochondrií v bunke musí byť zredukovaný, napr. pri hypoxii alebo erytropoéze [14, 15].



Obr. 3 Schématické znázornenie mitofágie

Autosis

Autosis predstavuje podtyp autofágovej bunkovej smrti, ktorá je navodená nedostatkom nutričných látok v bunke alebo Tat-Beclin1 proteínom (pozostáva z HIV-1 Tat domény [PTD], ktorá je naviazaná na 18 aminokyselín proteínu beclin 1). Morfologickými prejavmi autosis sú fragmentované ER, zvýšená adherencia bunkových substrátov, mierna kondenzácia chromatinu a opuch v perinukleárnej zóne bunky [3].

Autofágia a nádory

Na fyziologickej úrovni predstavuje autofágia kontrolný mechanizmus bunky, ktorý odstraňuje poškodené vnútrobunkové štruktúry a proteíny hromadiace sa vplyvom rôznych stresových stimulov. Zabraňuje tým chronickému poškodeniu bunky / tkaniva. Jedným z najdôležitejších proteínov v regulačnej mašinérii autofágie je Beclin-1, pretože hrá podstatnú úlohu pri tvorbe fagofórov a autofagozómov [16, 17]. Znížené hladiny proteínu Beclin-1 boli zistené pri rôznych typoch nádorov, napr. karcinómy krčka maternice, ovária, prostaty, prsníka a ďalších [16, 18, 19]. Beclin-1 možno teda pokladať za tumor supresorový proteín. Podobnú funkciu majú aj ďalšie proteíny, tieto pôsobia v kombinácii s Beclin-1 ako nádorové supresory a pozitívne ovplyvňujú aj samotnú autofágiu, ide o Bif-1 (Bax – interacting factor 1) a UVRAG (UV radiation resistance associated gene). Ich úbytok má priamo negatívny vplyv na tvorbu autofagozómov a autofágiu, čo môže spôsobiť zvýšenie proliferatívnej aktivity v nádorových léziách žalúdka, hrubého čreva, prostaty a prsníka [20, 21, 22, 23].

Okrem Beclinu-1, aj ďalšie ATG proteíny sa zúčastňujú na regulačných / deregulačných dráhach autofágie. Napr. deficiencia ATG2, ATG5, ATG9 a tiež ATG12 bola detekovaná v karcinómoch žalúdka a hrubého čreva [24].

Dôležitú úlohu v karcinogéze zohrávajú aj mitochondrie. Ak sú poškodené, môžu výrazne zvyšovať produkciu ROS, čo má stimulačný účinok na vznik nádorových ochorení. Funkčná autofágia dokáže regulovať množstvo a účinok ROS a tým prispieva ku aktivite inhibičných mechanizmov vzniku nádoru [25, 26].

Paradoxne, v rozvinutých štádiách nádorového procesu pôsobí autofágia stimulačne na prežívanie malígnych buniek, rast nádoru a vznik sekundárnych metastáz. V podstate autofágia zmierňuje následky rôznych stresových situácií na nádorové bunky tým, že zvyšuje ich toleranciu, zabezpečí vhodné nutričné prostredie

a výrazným spôsobom vyrovnáva ich metabolické požiadavky recykláciou vlastných intracelulárnych komponentov. Ako vhodný príklad môže slúžiť fokálne hypoxické ložisko v nádorovom tkanive, kde je autofágia indukovaná ku väčšej aktivite a zabezpečuje prežívanie buniek a znižuje poškodenie nádorových elementov zápalovými procesmi [27, 28].

Možno teda konštatovať, že z pohľadu onkológie predstavuje autofágia veľmi zaujímavý typ programovanej bunkovej smrti. Prejavuje sa dvojakým spôsobom a to v závislosti od štádia onkologického ochorenia. V skorej karcinogenéze zabraňuje autofágia vzniku a progresii nádoru, avšak v neskorších štádiách stimuluje rast nádoru a prežívanie buniek. Takisto ovplyvňuje agresivitu procesu tým, že ovplyvňuje vytváranie metastáz [29].

Literatúra

- [1] Rubinsztein, *Current Biology*. **2012**, 29-34:doi:10.2016/j.cub.2011.11.034.
- [2] Humphry and Wheatley, *Biol Open*. **2018**, 7(10):doi:10.1242/bio037374.
- [3] Tang, *Cell Research*. **2019**, 29:347–364.
- [4] Portt, *Biochimica et Biophysica Acta*. **2011**, 1813:238–259.
- [5] Bursch, *Cell Death Diff*. **2001**, 8:569–581.
- [6] Kroemer, *Cell Death Differ*. **2009**, 16(1):3–11.
- [7] Fitzwalter and Thorburn, *FEBS J*, **2015**. 282(22):4279–4288.
- [8] Klionsky and Emr, *Science*. **2000**, 290:1717–1721.
- [9] Ogier-Denis and Codogno, *Biochim Biophys Acta*. **2003**, 1603:113–128.
- [10] Zhong, *Nat Cell Biol*. **2009**, 11/4:468–476.
- [11] Mazure and Pouyssegur, *Curr Opin Cell Biol*. **2010**, 22(2):177–180.
- [12] Tsvetkov, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2010**, 107(39):16982–16987.
- [13] Cheung, *Journal of Biomedical Science*. **2020**, 27:31. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-0627-5>
- [14] Nguyen, *Trends Cell Biol*. **2016**, 26:733–744.
- [15] Zimmermann and Reichert, *Biol Chem*. **2017**, 399:29–45.
- [16] Qu, *J Clin Invest*. **2003**, 112:1809–1820.
- [17] Yue, *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003**, 100:15077–15082.
- [18] Liang, *Nature*. **1999**, 402:672–676.
- [19] Shen, *Autophagy*. **2008**, 4:1067–1068.
- [20] Takahashi, *Nat Cell Biol*. **2007**, 9(10):1142–1151.
- [21] Kim, *Hum Pathol*. **2008**, 39:1059–1063.
- [22] Morselli, *Biochim Biophys Acta*. **2009**, 1793:1524–1532.
- [23] Kung, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. **2011**, 21:71–100.
- [24] Kang, *Pathol*. **2009**, 217(5):702–706.
- [25] Filomeni, *Cell Death Differ*, **2015**. 22:377–388.
- [26] Moloney and Cotter, *Semin Cell Dev Biol*. **2018**, 80:50–64.
- [27] Degenhardt, *Cancer Cell*. **2006**. 10(1):51–64.
- [28] White, *Nat Rev Cancer*. **2012**, 12:401–410.
- [29] Li, *Molecular Cancer*. **2020**, 19:12. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>

**Príspevky zborníka boli podporené projektom BIOMED
Martin (ITMS 26220220187)**



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



Agentúra
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ