

IN VITRO MODELY NEMALOBUNKOVÉHO KARCINÓMU PLŮC – NÁSTROJ NA TESTOVANIE HYPOXICKEJ SIGNALIZÁCIE A PREDKLINICKÉ ANALÝZY POTENCIÁLNYCH LIEČIV

In vitro models of non-small cell lung cancer – a tool for testing hypoxic signaling and preclinical analysis of potential drugs

Silvia FEČÍKOVÁ¹, Petra BELVONČÍKOVÁ², Barbora PUZDEROVÁ², Lucia CSÁDEROVÁ², Monika BARÁTHOVÁ²

¹Národný ústav tuberkulózy, pľúcnych chorôb a hrudnej chirurgie, Vyšné Hágy

²Virologický ústav, Biomedicínske centrum SAV v. v. i., Bratislava

Abstrakt

Úvod: Karcinóm pľúc patrí v súčasnosti medzi malígne ochorenia s najvyššou mortalitou u nás aj vo svete. Preto je dôležité venovať pozornosť nielen skorej diagnostike, ale aj in vitro výskumným aktivitám zameraným na odhaľovanie nových špecifických markerov a terapeutických cieľov. Karbonická anhydráza IX, nádorovo asociovaný, hypoxiou indukovaný enzým predstavuje dôležitú súčasť nádorového mikroprostredia. Expresia CA IX bola dokázaná aj pri karcinóme pľúc. In vitro analýzy predstavujú nevyhnutnú súčasť predklinického výskumu a je veľmi dôležité, aké modelové systémy sú v takomto výskume používané. 3D modely kokultivačných nádorových sféroïdov lepšie reflektujú heterogénne nádorové tkanivo in vitro.

Metódy: Nádorová bunková línia A549 derivovaná z adenokarcinómu pľúc a nádorová bunková línia H1299 odvodená z lymfatickej uzliny nemalobunkového karcinómu pľúc boli kultivované v kultivačnom médiu DMEM pri 37 °C a 5 % CO₂ v termostate s kontrolovanou vlhkosťou. Bunky boli kultivované v monovrstve alebo vo forme sféroïdov. V prípade kokultivačných modelov sme bunkové línie kultivovali s pľúcnyimi fibroblastami MRC5, ako aj s mononukleárnymi bunkami derivovanými z periférnej krvi.

Výsledky: Pripravili sme 3D modely homotypických a heterotypických sféroïdov z adenokarcinómových nádorových buniek A549 a pľúcnych fibroblastov MRC5. V heterotypickom modeli A549/MRC5 sme testovali cytotoxické efekty chemoterapeutika Pemetrexed. Dokázali sme retardáciu rastu sféroïdov, pokles v hladine proteínu CA IX a aktiváciu apoptózy vplyvom Pemetrexedu. Zaviedli a optimalizovali sme komplexný model kokultivačných sféroïdov s imunitnými bunkami izolovanými z periférnej krvi darcov. Potvrdili sme zvýšenie penetrácie imunitných buniek dovnútra sféroïdov pôsobením Pemetrexedu, ako aj zvýšenie cytotoxického účinku a stimuláciu apoptotickej signalizácie.

Záver: Kokultivačné modely nádorových bunkových sféroïdov s ďalšími zložkami nádorového prostredia – pľúcnyimi fibroblastami a s imunitnými bunkami izolovanými z periférnej krvi predstavujú vyšší stupeň modelov vernejšie odrážajúci he-

Abstract

Introduction: Lung cancer is currently one of the malignant diseases with the highest mortality both in our country and in the world. Therefore, it is important to pay attention not only to early diagnosis, but also to in vitro research activities aimed at discovering new specific markers and therapeutic targets. Carbonic anhydrase IX, a tumor-associated, hypoxia-induced enzyme, is an important part of the tumor microenvironment. The expression of CA IX has also been proven in lung cancer. In vitro analyses are an essential part of preclinical research and it is very important what model systems are used in such research. 3D models of co-culture tumor spheroids better reflect heterogeneous tumor tissue in vitro.

Methods: The lung adenocarcinoma-derived A549 tumor cell line and the non-small cell lung carcinoma-derived H1299 tumor cell line were cultured in DMEM culture medium at 37°C and 5% CO₂ in a humidity-controlled thermostat. The cells were cultured in monolayers or as spheroids. In the case of co-culture models, we cultured the cancer cell line with MRC5 lung fibroblasts as well as with peripheral blood-derived mononuclear cells.

Results: We prepared 3D models of homo- and heterotypic spheroids from adenocarcinoma tumor cells A549 and lung fibroblasts MRC5. In the heterotypic A549/MRC5 model, we tested the cytotoxic effects of the chemotherapy drug Pemetrexed. We demonstrated retardation of spheroid growth, a decrease in the level of CA IX protein and activation of apoptosis due to Pemetrexed. We introduced and optimized a complex model of co-cultivation of spheroids with immune cells isolated from the peripheral blood of donors. We confirmed the increase in the penetration of immune cells into the spheroids by the action of Pemetrexed, as well as an increase in the cytotoxic effect and stimulation of apoptotic signaling.

Conclusion: Co-cultivation models of tumor spheroids with other components of the tumor microenvironment – lung fibroblasts and with immune cells isolated from peripheral blood represent a higher level of models that faithfully reflect the heterogeneous tumor environment. 3D co-culture model

terogénne nádorové prostredie. 3D kokultivačné systémy predstavujú vhodnejší systém v predklinickom štádiu testovania inovatívnych liekov alebo v základnom výskume zameranom na odhaľovanie nových markerov nádorových ochorení (obr. 4, lit. 50). Text v PDF www.lekarsky.herba.sk.
KLÚČOVÉ SLOVA: nemalobunkový karcinóm pľúc, karbonická anhydráza IX, hypoxia, sféroidy, nádorové mikroprostredie.
Lek Obz 2025, 74 (5): 184-194

represents a more suitable system in the preclinical stage of testing innovative drugs or in basic research aimed at discovering new markers of cancer diseases (Fig. 4, Ref. 50). Text in PDF www.lekarsky.herba.sk.
KEY WORDS: non-small cell lung cancer, carbonic anhydrase IX, hypoxia, spheroids, tumor microenvironment
Lek Obz 2025, 74 (5): 184-194

Úvod

Nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC) patrí medzi molekulovo veľmi heterogénne ochorenie. Podobne ako pri iných malignitách je tvorené subpopuláciami buniek alebo klonov s rôznymi molekulovými znakmi, čo vedie k významnej intratumorálnej heterogenite asociovanej s progresiou ochorenia, s invazívnosťou a metastázovaním. Ochorenie je diagnostikované vo väčšine prípadov v pokročilom štádiu. Klinické štúdie, imunohistochemické, molekulovogenetické analýzy s cieľom zavedenia personalizovanej liečby u pacientov v počiatočnom aj v pokročilom štádiu ochorenia, odhalili potrebu zlepšenia morfolologickej diagnostiky, ale zároveň aj potrebu nových inovatívnych liečebných stratégií. Na základe odporúčaní Svetovej zdravotníckej organizácie z roku 2017 sa ako štandard používa morfologická klasifikácia. Medzi hlavné typy NSCLC patria skvamocelulárny karcinóm (30 %), adenokarcinóm (40 %), veľkobunkový karcinóm (15 %), ale aj neuroendokrinný karcinóm (NET), adenoskvamózny a sarkomatoidný karcinóm. Okrem týchto typov WHO uvádza aj ďalšie podtypy (1). Veľká rôznorodosť histopatologických typov odráža heterogenitu karcinómu pľúc, ktorá ovplyvňuje samotnú diagnostiku, patogenézu, prognózu ochorenia, ale aj terapeutickú stratégiu (2).

Genetická analýza NSCLC sa zameriava preferenčne na mutácie receptora epidermálneho rastového faktora (EGFR). Približne 90 % mutácií v NSCLC tvoria delécie exónu 19 a L858R v exóne 21, ktoré sú citlivé na inhibítory tyrozínkináz (TKI) (3). Medzi ďalšie vyšetované zmeny patrí prestavba v kináze anaplastického lymfómu (ALK), ktorá aktivuje rast buniek (4). Zmeny boli opísané v prípade receptora protoonkogénu tyrozínkinázy ROS1. Celková prevalencia prestavby ROS1 v NSCLC je 2 – 5 % (5). NSCLC nesúce mutácie v receptore 2 ľudského epidermálneho rastového faktora (HER2) sa považujú za odlišný molekulový podtyp. Pri NSCLC je HER2 aktivovaný génovými mutáciami (1 – 4 %), amplifikáciou (2 – 5 %) a nadmernou expresiou proteínov (2 – 30 %) s rôznymi prognostickými a prediktívnymi výsledkami (6). Inzercie exónu 20 ovplyvňujúce kinázovú doménu sú najčastejšími mutáciami HER2 (96 %). Sú podobné aktivačným mutáciám EGFR (iných ako T790M), ktoré sú spojené s rezistenciou voči prvej, ako aj druhej generácii TKI. Amplifikácia cMET, ktorá vedie k aktivácii tumorigenézy, sa zistila v 2 – 5 % NSCLC (7). Mutácie KRAS patria medzi najčastejšie faktory ovplyvňujúce NSCLC. Vyskytujú sa približne v 25 – 30 % pľúcneho adenokarcinómu, zriedkavo sa vyskytujú pri skvamocelulárnom karcinóme. Viac ako 80 %

mutácií KRAS možno nájsť v kodóne 12, najčastejšie KRAS G12C (40 %), KRAS G12V (18 – 21 %) a KRAS G12D (17 – 18 %). Na rozdiel od iných typov mutácií sú mutácie KRAS zvyčajne spojené s fajčením (8).

Nádorové mikroprostredie (TME – tumor microenvironment) NSCLC je veľmi heterogénne a charakteristické dynamickými interakciami medzi jeho jednotlivými zložkami. Má zásadnú úlohu v procese tumorigenézy a významne ovplyvňuje odpoveď nádorových buniek na liečbu (9). TME sa skladá z nádorových a nenádorových zložiek, ktoré sa vzájomne ovplyvňujú, stimulujú a uľahčujú nekontrolovanú bunkovú proliferáciu (10). Z histologického hľadiska sa na tvorbe nádoru podieľa nádorová stróma a vlastné nádorové bunky. Stromálne komponenty predstavujú krvné cievy, podporné tkanivá, extracelulárny matrix, fibroblasty a imunitné bunky. Hypoxia, nízka koncentrácia kyslíka v tkanive a acidóza vyvolaná hypoxiou spúšťajú signálne dráhy vedúce k adaptácii nádorových buniek na zmenené podmienky. Hypoxia aktivuje fenotypové zmeny vznikajúce v dôsledku transkripčného a translačného preprogramovania, podporuje konverziu normálnych pľúcnych fibroblastov na nádorovo asociované fibroblasty (11), aktivuje expresiu génov súvisiacich s imunopresiou a poklesom cytotoxicity. Pri hypoxii je aktivovaná hypoxická signalizácia reprezentovaná hypoxiou indukovanými faktormi HIF1 a HIF2. Tieto spúšťajú expresiu génov zapojených do regulácie metabolizmu, pH, angiogenézy, imunitnej odpovede (12). Pri NSCLC je vysoká aktivita transkripčného faktora HIF1 spojená s negatívnym vplyvom na celkové prežívanie (13), v dôsledku extracelulárnej acidózy dochádza k blokovaniu aktivácie, proliferácie a cytotoxicity NK buniek (14). Onkogénny metabolizmus vedie k produkcii množstva „kyslých“ metabolitov a k acidóze, ktorá predstavuje silný selekčný tlak prispievajúci k vzniku agresívnych, terapeuticky odolných klonov. Acidóza zvyšuje aj nestabilitu genómu prostredníctvom chromozómových zlomov alebo translokácií (15). Dôležitou súčasťou TME je aj karbonická anhydráza IX (CA IX). Je to transmembránový, hypoxiou indukovaný proteín majúci zásadnú úlohu v udržiavaní homeostázy vnútrobunkového pH_i a zároveň prispievajúci k acidifikácii extracelulárneho pH_e v TME prostredníctvom extracelulárne orientovanej katalytickej domény. CA IX je súčasťou transportného metabolónu, kde kooperuje s inými proteínmi s cieľom adaptovať nádorové bunky na zmeny spôsobené hypoxiou a acidózou. Katalyzuje reverzibilnú premenu oxidu uhličitého na hydrogénuhličitanový anión a protón. Zároveň svojou lokalizáciou v invadopódiách prispieva k invazívnosti

a metastázovaniu (16, 17). Prítomnosť CA IX je asociovaná preferenčne s nádormi, pričom v korešpondujúcom nenádorovom tkanive sa CA IX nenachádza. Prirodzená expresia CA IX je v normálnom nenádorovom tkanive limitovaná na tkanivá žalúdka a hrubého čreva. Transkripcia génu CA IX je aktivovaná preferenčne v hypoxii a je riadená najmä transkripčným faktorom HIF1 (18).

V karcinóme pľúc koreluje prítomnosť proteínu CA IX s vysokým štádiom, nekrozou a nízkou účinnosťou terapie (19, 20). Vo viacerých publikáciách bola opísaná zvýšená hladina CA IX v resekátoch NSCLC dokonca aj v ranom štádiu. Vysoká hladina CA IX je častá najmä pri skvamocelulárnom karcinóme (SCC) pľúc. Korelácia medzi vysokou hladinou transkriptu CA IX a horšou prognózou pacientov bola opísaná pri skvamocelulárnom karcinóme, ako aj pri pacientoch s adenoskvamocelulárnym karcinómom pľúc a tiež u pacientov s pokročilým NSCLC (pacienti s G2-G3, T2-T3, štádium 2 - 3 a pN+) (21). Prítomnosť CA IX bola potvrdená aj v práci Kim a kol. 2004 (22) v 72 % skorých štádií nádorov NSCLC (štádium I a II), kde bola CA IX asociovaná zároveň aj s vyššou proliferáciou buniek hodnotenou indexom Ki-67. Imunohistochemická analýza potvrdila prítomnosť CA IX v 62 % vzoriek NSCLC (23), kde hladina CA IX ako aj HIF1 α boli vyššie v SCC ako v adenokarcinóme. Anderson a kol. (24) opísali vysokú hladinu CA IX v SCC s tendenciou k negatívnej prognóze. Súčasne vykonali rozsiahlu analýzu nádorových biopsií obsahujúcich neoplastické epitelové bunky a biopsie nádorovej stromy, kde porovnávali prognostické dopady proteínov HIF1 α a HIF2 α (alfapodjednotka hypoxiou indukovaného faktora HIF1 a HIF2), GLUT1 (glukózový transportér 1), LDH5 (laktátdehydrogenáza 5) a CA IX podľa ich lokalizácie v nádorových a stromálnych bunkách. Prítomnosť HIF1 α bola v nádorových bunkách nezávislým prediktorom zlej prognózy, naopak vysoká stromálna expresia HIF1 α naznačovala dobrú prognózu. Tieto výsledky jasne poukazujú na významnú úlohu TME v progresii pľúcnych karcinómov a dôležitosť interakcií medzi jednotlivými komponentami TME.

Práce opísané v predchádzajúcom odseku dokumentujú prítomnosť proteínu CA IX v NSCLC, ktorá je často asociovaná s vyšším a agresívnejším štádiom ochorenia, ako aj so zlou prognózou a závisí od zloženia TME, ktoré je veľmi dynamické a citlivo reaguje na zmeny. Preto sme sa zamerali na prípravu vhodných in vitro modelov, ktoré by boli relevantné nielen v rámci zisťovania a charakterizácie nových markerov, ale aj v predklinických testoch potenciálnych nových terapeutík.

Materiál a metódy

Bunkové línie

Komerčné nádorové bunkové línie A549 (CCL185, ATCC) - línia odvodená z adenokarcinómu pľúc, bunková línia H1299 (CRL 5803, ATCC) - NSCLC línia pripravená z pozitívnej lymfatickej uzliny pacienta s NSCLC. Primárne fibroblasty MRC-5 izolované z normálneho tkaniva pľúc.

Kultivačné podmienky

Bunky A549 a MRC-5 sme kultivovali v kultivačnom médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s pridaním fetálneho bovinneho séra (FBS) (finálna koncentrácia 10 %) (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) a antibiotík Gentamicin 0,1 % (Sandoz, Švajčiarsko). Bunkovú líniu H1299 sme kultivovali v kultivačnom médiu RPMI-1640 s prídavkom 10 % fetálneho bovinneho séra (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) a 0,1 % Gentamicinu (Sigma Aldrich). Bunky sme kultivovali v termostate s regulovanou vlhkosťou (95 %) pri teplote 37 °C s 5 % CO₂. Použitá pracovná koncentrácia chemoterapeutika Pemetrexed bola 0,8 μ M.

Kultivácia buniek v hypoxii

Hypoxické podmienky sme simulovali kultiváciou buniek v hypoxickej stanici s regulovanou koncentráciou kyslíka (Ruskin Technologies, Bridgend, UK). Bunky v monovrstve sme vysievali na sterilné kultivačné misky v koncentrácii 300 000 buniek/ ϕ 6 cm a kultivovali 24 h v atmosfére s 1 % O₂, 5 % CO₂, 10 % H₂ a 84 % N₂ pri teplote 37 °C a vlhkosti 95 %.

Príprava homotypických sféroidov

Homotypické sféroidy tvorené z buniek A549 rástli v 96-jamkovej platničke s neprilnavým povrchom (ULA platničky, ultra low attachment plate). Bunky A549 sme vysievali do jamiek v koncentrácii 5000 buniek/jamka. K bunkovej suspenzii sme pridali kultivačné médium DMEM s 10 % FBS v objeme 150 μ l/jamka. Po 5 dňoch kultivácie sa v každej jamke vytvoril 1 sféroid.

Príprava heterotypických sféroidov

Heterotypické sféroidy sme pripravovali z nádorových buniek A549 a pľúcnych fibroblastov MRC5 zmiešaných v pomere 2 : 1. Bunkovú suspenziu A549 a MRC5 sme vysievali do ULA platničky v koncentrácii 5000 buniek/jamka. Heterotypické sféroidy rástli po dobu 5 dní.

Izolácia mononukleárných buniek z periférnej krvi

Periférnu krv s antikoagulačným činidlom sme zmiešali v pomere 1 : 1 s Dulbeccovým fosfátovým tlmivým roztokom (DPBS) (Biotech). Nariedenú krv sme navrstvili na hladinu Ficollu (Cytiva) v pomere Ficoll : krv 2,4 : 3 a centrifugovali pri 400 x g 35 minút. Gradient vytvorený centrifugáciou obsahoval vo vrchnej vrstve plazmu, spodnú vrstvu predstavoval Ficoll a v strednej časti sa nachádzala vrstva s PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell). Suspenziu PBMC sme 3x premyli s DPBS a centrifugovali 10 min pri 180 x g. Sediment sme resuspendovali v DMEM. Izolované PBMC sme použili v kokultivačnom modeli s heterotypickými sféroidmi.

Polyakrylamidová gélová elektroforéza, western blot a imunodetekcia komplexov

Bunky kultivované v monovrstve, ako aj sféroidy sme lyzovali lyzačným roztokom RIPA (1 mM EDTA; 0,1 % SDS; 50 mM Tris-HCl; pH 7,4; 150 mM NaCl;

1 % Triton X100; 0,05 % deoxycholát sodný). Koncentráciu proteínov sme stanovili pomocou kitu BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Následne sme 30 µg celkových proteínov z každej vzorky zmiešali s 2x koncentrovaným roztokom Laemmliho (0,005 % brómfenolová modrá; 30 mM Tris-HCl pH 6,8; 10 % glycerol; 0,01 % SDS; 5 % β-mercaptoetanol) a naniesli na 10 % SDS-PAGE gél, kde prebiehala elektroforetická separácia pri napätí 95 V. Po separácii sme proteíny preniesli na PVDF membránu (Milipore). Po blokovaní nešpecifických väzieb (5 % odtučnené mlieko, 1 h pri izbovej teplote) sme membránu inkubovali s primárnymi protilátkami riedenými v TBST (3 % BSA; 0,1 % Tween20; 20 mM Tris pH 7,6; 140 mM NaCl) cez noc pri 4 °C. Na detekciu proteínu CA IX sme použili myšiu protilátku M75 riedenú 1 : 3, HIF1α sme detegovali pomocou myšej protilátky anti-HIF1α (BD Transduction Laboratories) riedenej 1 : 200, štiepený PARP sme testovali pomocou králičej protilátky štiepený PARP (Cell Signalling) riedenej 1 : 1000. Ako vnútornú kontrolu sme použili analýzu hladiny proteínu β-aktín, ktorého expresia nie je ovplyvnená hypoxiou. Použili sme myšiu protilátku anti-β-aktín riedenú 1 : 10 000. Po premytí sme membránu inkubovali so sekundárnymi protilátkami anti-myšia IgG/HRP (Dako) alebo anti-králičia IgG/HRP (Dako) riedenými 1 : 5000 v 5 % odtučnenom mlieku pri izbovej teplote 1 h. Po premytí sme signál vyvolávali pomocou chemiluminiscenčného substrátu (ECL) a signál sme exponovali na röntgenové filmy (FUJI).

Meranie rastu sféroïdov

Rast sféroïdov sme zaznamenávali prostredníctvom mikroskopických snímok. Sféroïdy kultivované v ULA platničke sme každý deň sledovali a snímali mikroskopom ZEISS, Axiovert 40 CFL, objektív 10x. Každé meranie sme uskutočnili v šesťplikách. Rast sféroïdov sme sledovali počas 5 dní.

Fixácia sféroïdov a príprava parafrínových rezov

Sféroïdy sme fixovali v 4 % paraformaldehyde pri izbovej teplote a po dobu 1 h. Po premytí fyziologickým roztokom sme sféroïdy odvodňovali radom alkoholov nasledovne: 30 % etanol 5 min, 50 % etanol cez noc, 70 % etanol 5 min, 70 % etanol s eoziénom 1 min, 70 % etanol 2x5 min, 80 % etanol 5 min, 96 % etanol 15 min, izopropanol 10 min, xylén 2x5 min. Po presýtení parafrínom 2x 30 min sme sféroïdy zalievali do parafrínu prostredníctvom zalievacej stanice Leica EG1150H. Sféroïdy v parafrínových bločkoch sme narezali na rezy s hrúbkou 4 µm použitím mikrotómu (Leica RM2125RT) a umiestnili na polylyzínové sklíčka (Thermo Scientific).

Imunohistochemia

Rezy sféroïdov sme odparafrinovali a rehydratovali nasledovne: xylén I 5 min, xylén II 5 min, 96 % etanol I 5 min, 96 % etanol II 5 min, 70 % etanol 5 min, dH₂O 5 min. Imunohistochemické značenie sme uskutočnili prostredníctvom kitu EnVision FLEX+ (DAKO) podľa

protokolu odporúčaného výrobcom Po blokovaní endogénnej peroxidázovej aktivity (5 min) a premytí sme rezy sféroïdov inkubovali 1 h s primárnou protilátkou špecifickou voči CA IX M75 riedenou 1 : 100 v Dako REAL™ Antibody Diluent a po premytí so sekundárnou anti-myšou protilátkou EnVision FLEX /HRP 30 min. Signál sme vyvolávali 1 min pomocou EnVision FLEX DAB+ Chromogen. Jadrá sféroïdov sme doznačili hematoxylínom EnVision FLEX, Hematoxylin (link) po dobu 6 min. Po fixácii rezov prostredníctvom montovacieho média Aquatex sme pozitívny signál pozorovali pomocou mikroskopu Leica DM4500 B.

Detekcia apoptotických buniek

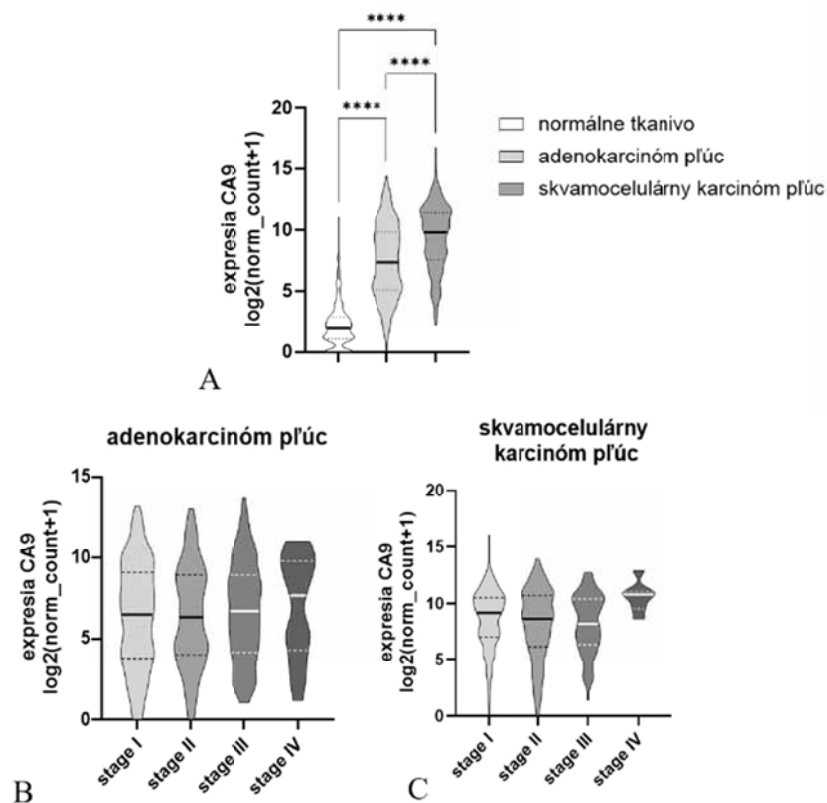
Na detekciu a monitorovanie apoptotických buniek sme použili konfokálnu mikroskopiu. Cytotoxický efekt liečiva Pemetrexed sme testovali v kokultivačných sféroïdoch A549/MRC5 a A549/MRC5/PBMC. Apoptotické bunky sme značili prostredníctvom apoxínu – zelený fluorescenčný signál (Ex/Em = 490/525 nm). Merali sme celkovú intenzitu fluorescenčného signálu apoptotických buniek v objeme sféroïdu.

Výsledky

In silico analýza expresie proteínu CA IX v NSCLC

V úvode práce sme sa zamerali na in silico analýzu expresie génu CA9 v adenokarcinóme a v skvamocelulárnom karcinóme pľúc. Analýzu sme uskutočnili prostredníctvom platformy Xena, on-line nástroja na analýzu verejne dostupných súborov klinických a multiomických dát (25). Výsledky na obrázku 1A dokumentujú signifikantne zvýšenú expresiu génu CA9 kódujúceho proteín CA IX v adenokarcinóme pľúc, ako aj vo skvamocelulárnom karcinóme pľúc v porovnaní s nenádorovým pľúcnyim tkanivom. Analýza zároveň ukázala signifikantne vyššiu expresiu CA9 vo skvamocelulárnom karcinóme v porovnaní s adenokarcinómom pľúc. Zamerali sme sa aj na identifikáciu rozdielov v expresii génu CA9 medzi jednotlivými štádiami (stage I – IV) v adenokarcinóme, ako aj vo skvamocelulárnom karcinóme pľúc. Výsledky (obr. 1B, C) dokumentujú vysokú hladinu transkriptu CA9 naprieč štádiami s posunom mediánu k vyšším hodnotám pri štádiu IV pri oboch analyzovaných subtypoch NSCLC. Výsledky prezentované na obrázku 1 jasne dokazujú vysokú hladinu transkriptov pre proteín CA IX v adenokarcinóme pľúc, ako aj vo skvamocelulárnom karcinóme pľúc.

Obrázok 1. In silico analýza expície génu CA9 kódujúceho proteín CA IX realizovaná prostredníctvom platformy Xena s následným spracovaním v programe GraphPad Prism 10. Graf (A) porovnáva expíciu génu CA9 v adenokarcinóme pľúc (n = 515), v skvamocelulárnom karcinóme (n = 498) s nenádorovým normálnym tkanivom pľúc (n = 288). Grafy expície génu CA9 v jednotlivých štádiách (stage I - IV) ochorenia v adenokarcinómoch (B) a v skvamocelulárnych karcinómoch pľúc (C).



Proteín CA IX je v bunkách A549 aktivovaný pri nízkej koncentrácii kyslíka

Výsledky prezentované v obrázku 1 nás viedli k in vitro testom zameraným na sledovanie expície CA IX v komerčne dostupných, dobre charakterizovaných bunkových líniiach. Pracovali sme s nádorovými bunkami A549 a H1299. Bunky A549, derivované z adenokarcinómu pľúc, sme kultivovali v monovrstve v normoxii a v hypoxii (1 % O₂) počas 24 h. Prostredníctvom western blotu s následnou imunodetekciou sme zisťovali hladinu proteínu CA IX, ako aj hladinu regulačnej podjednotky – transkripčného faktora HIF1. Zistili sme, že v normoxických podmienkach je v bunkách A549 hladina CA IX veľmi nízka a výrazne stúpa práve v hypoxických podmienkach s regulovanou koncentraciou kyslíka (1 % O₂) (obr. 2A). Zároveň sme potvrdili aj vysokú hladinu podjednotky HIF1 α , ktorá je stabilizovaná iba v hypoxii a v normoxii nebola detegovateľná kvôli rýchlej degradácii proteazómovým systémom. Ako vnútornú kontrolu sme použili β -aktín, ktorého expresia nie je ovplyvnená hypoxiou. Pri kultivácii buniek v monovrstve sú uniformne všetky bunky vystavené rovnakým podmienkam, teda normoxii alebo hypoxii. Ďalšou testovanou líniiou boli bunky H1299 derivované z pozitívnej lymfatickej uzliny pacienta s NSCLC. Aj v týchto bunkách sme analyzovali hladinu CA IX a HIF1 α v normoxii a v hypoxii (1 % O₂) (obr. 2A). Na rozdiel od buniek A549 v tomto prípade sme proteín CA IX nedeťovali napriek tomu, že HIF1 α bola stabilizovaná.

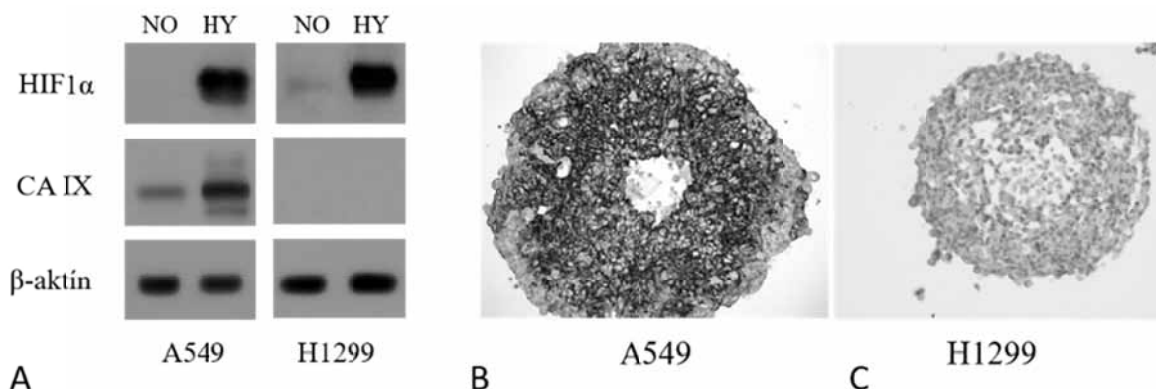
Obe bunkové línie sme použili aj v 3D modeli homotypických sféroidov, kde vzniká hypoxia prirodzene v dôsledku gradientu kyslíka spôsobeného rastom bu-

niek vo vrstvách sféroidu, čím smerom dovnútra klesá hladina kyslíka. Ako dokumentuje výsledok imunohistochemického značenia proteínu CA IX v rezoch sféroidov, vo sféroidoch A549 sme zistili nielen vysokú hladinu, ale aj intenzitu značenia proteínu CA IX (obr. 2B). Pri značení rezov sféroidov H1299 sme opätovne nepotvrdili prítomnosť proteínu CA IX (obr. 2C). V oboch prípadoch je pozorovateľná centrálna nekrotická časť, ktorá je v prípade sféroidov A549 vypadnutá. Sféroidy H1299 preukazujú zmenenú morfológiu buniek v centrálnej oblasti. V ďalších experimentoch sme preto používali iba nádorové bunky A549, pretože v bunkách derivovaných z lymfatickej uzliny je expresia proteínu CA IX narušená a nereaguje na hypoxiu.

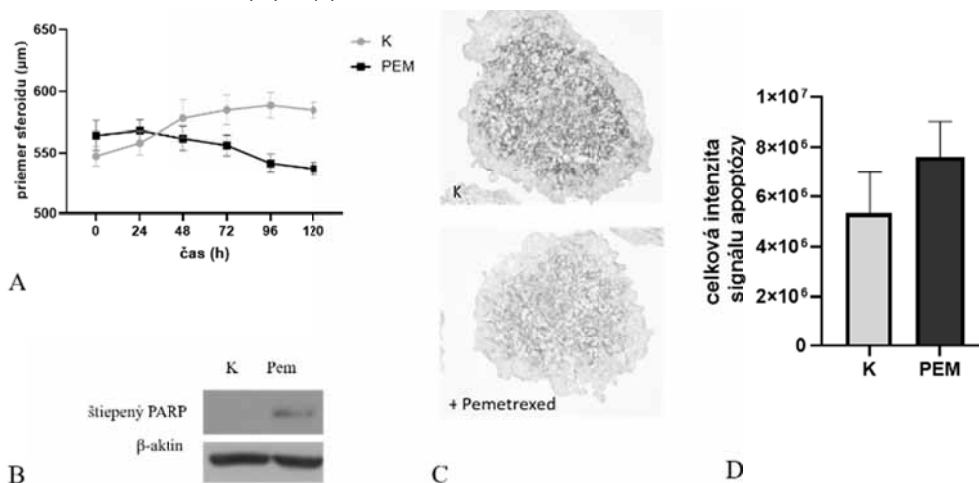
Príprava heterotypických sféroidov a sledovanie cytotoxického efektu chemoterapeutika Pemetrexed

V rámci testovania vhodných in vitro 3D modelov sféroidov sme pripravili heterotypické sféroidy tvorené nádorovými epitelovými bunkami A549 a primárnymi fibroblastami MRC5 izolovanými z normálneho nenádorového tkaniva pľúc. Okrem morfológie a rastových charakteristík sme sledovali sme aj cytotoxické efekty antifolátového chemoterapeutika Pemetrexed, ktoré sa stále používa v liečbe neskvamózneho NSCLC. Kokultivačný model zahŕňajúci aj stromálnu zložku predstavuje vyšší stupeň simulácie nádorového prostredia. Prostredníctvom merania priemeru sféroidov v čase sme analyzovali vplyv Pemetrexedu na rast sféroidov A549/MRC5. Rastové krivky (obr. 3A) dokumentujú retardáciu rastu heterotypických sféroidov vplyvom antifo-

Obrázok 2. Western blot analýza s detekciou imunokomplexov dokumentuje aktiváciu expície proteínu CA IX v bunkovej línii A549 kultivovanej v monovrstve v hypoxických podmienkach s regulovanou koncentráciou kyslíka (1% O₂). V normoxii je expresia CA IX veľmi nízka (A). V hypoxii sme dokázali prítomnosť regulačnej podjednotky – transkripčného faktora HIF1 (A). V bunkovej línii H1299 kultivovanej v monovrstve nedochádza k expresii proteínu CA IX ani v hypoxických podmienkach napriek tomu, že je prítomný proteín HIF1α (A). V 3D modeli homotypických sféroidov A549 s prirodzeným gradientom kyslíka sme imunohistochemicky dokázali vysokú hladinu CA IX (B). V homotypických sféroidoch H1299 nedochádza k aktivácii expície CA IX (C) ani pri prirodzene sa tvoriacom gradiente kyslíka.



Obrázok 3. Využitie heterotypických sféroidov A549/MRC5 pri testovaní účinku chemoterapeutík. Rastové krivky dokumentujú spomalenie rastu sféroidov vplyvom pôsobenia chemoterapeutika Pemetrexed (A). Cytotoxický efekt Pemetrexedu sme dokázali zvýšením hladiny štiepenej formy proteínu PARP western blot analýzou s imunodetekciou (B). Pokles hladiny proteínu CA IX po pôsobení chemoterapeutika Pemetrexed v rezoch sféroidov dokazuje výsledok imunohistochemického značenia CA IX (C) Konfokálnou mikroskopiou a analýzou intenzity fluorescenčného signálu apopxínu sme dokázali aktiváciu apoptózy posobením Pemetrexedu (D).



látového chemoterapeutika. Spomalenie rastu sféroidov dokumentuje aj schopnosť chemoterapeutika prenikať dovnútra sféroidov, čo je nevyhnutné pre testovanie efektov potenciálnych liečiv. Výsledky proteínovej analýzy prostredníctvom western blotu s imunodetekciou ukázali, že vplyvom chemoterapeutika Pemetrexedu dochádza k zvýšeniu hladiny štiepenej formy PARP (obr. 3B), čo sa považuje za charakteristický znak apoptózy. V heterotypických sféroidoch sme analyzovali aj vplyv Pemetrexedu na rozsah a intenzitu značenia proteínu CA IX v rezoch sféroidov prostredníctvom imunohistochemie. Zistili sme pokles v intenzite značenia CA IX po 5-dňovom pôsobení chemoterapeutika Pemetrexed (obr. 3C). Cytotoxický efekt Pemetrexedu sme analyzovali aj prostredníctvom konfokálnej mikroskopie, kde sme merali intenzitu zeleného fluorescenčného signálu senzora apopxínu. Ide o metódu, pri ktorej sledujeme translokáciu fosfatidylserínu, ktorý sa pri apoptóze pre-

nesie do vonkajšej časti plazmatickej membrány. Výskyt fosfatidylserínu na bunkovom povrchu je univerzálnym indikátorom počiatočných/stredných štádií bunkovej apoptózy a možno ho zistiť skôr, ako možno pozorovať morfológické zmeny. Naše výsledky jasne dokazujú cytotoxický efekt Pemetrexedu na bunky sféroidu A549/MRC5 a aktiváciu bunkovej smrti prostredníctvom apoptózy (obr. 3D).

Imunitné bunky ako súčasť in vitro 3D modelov

Pretože imunitné bunky predstavujú neoddeliteľnú súčasť nádorového mikroprostredia, našim cieľom bolo pripraviť 3D model, ktorý by v in vitro modeloch zahŕňal aj imunoprostredie. Heterotypické sféroidy tvorené nádorovými bunkami a fibroblastami sme kokultivovali s mononukleárnymi bunkami izolovanými z periférnej krvi (PBMC) zdravých darcov. Zisťovali sme, či sú PBMC schopné nielen prenikať do vnútorných vrstiev heteroty-

pických sféroidov, ale či je toto prenikanie ovplyvnené cytotoxickým účinkom Pemetrexedu. Sériou experimentov sme testovali rôzne pomery PBMC vo vzťahu k počtu nádorových a stromálnych buniek. Zistili sme, že pre náš model heterotypických sféroidov je ideálny pomer A549/MRC5 : PBMC 2,5 : 1. Prostredníctvom konfokálnej mikroskopie sme sledovali prenikanie PBMC do jednotlivých vrstiev sféroidov A549/MRC5. Výsledky (obr. 4A, B) jasne dokumentujú signifikantne zvýšené prenikanie imunitných buniek do sféroidov po pôsobení Pemetrexedu. Cytotoxický efekt chemoterapeutika naruší krehkú rovnováhu mikroprostredia sféroidu, v dôsledku čoho sú imunitné bunky schopné prenikať do hlbších vrstiev sféroidov. Zároveň sme testovali aj cytotoxický efekt Pemetrexedu v takomto kombinovanom modeli so zahrnutím imunitných buniek. Sledovali sme množstvo apoptotických buniek prostredníctvom detekcie intenzity senzora apoptínu. Z výsledkov (obr. 4C) vyplýva, že vplyvom chemoterapeutika dochádza k aktivácii apoptotickej signalizácie. Pri porovnaní intenzity apoptotického signálu medzi heterotypickými sféroidmi A549/MRC5 a A549/MRC5/PBMC sme zistili zvýšenie množstva apoptotických buniek vo sféroidoch, ktoré boli vystavené pôsobeniu Pemetrexedu.

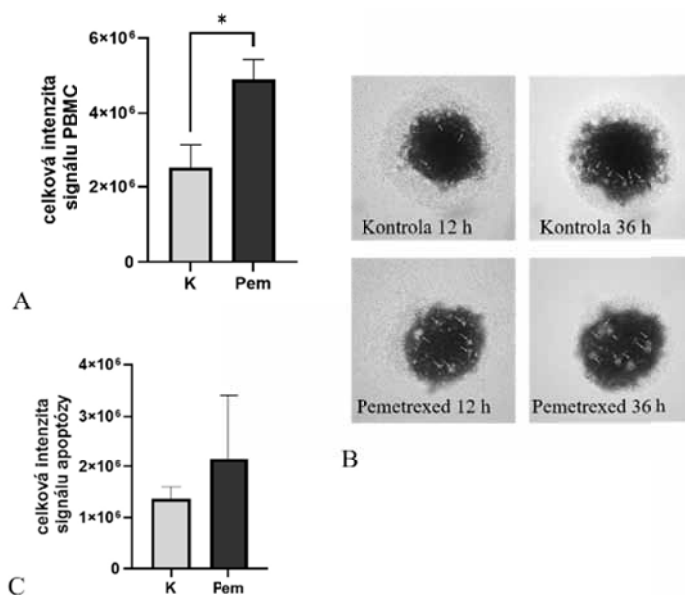
Diskusia

Súčasný trendy v modernej experimentálnej onkológii sú zamerané na zavedenie modelov, ktoré by boli schopné realistickejšie zachytiť intratumorálnu a intertumorálnu heterogenitu nádorov a zároveň aj dynamiku interakcií jednotlivých komponentov TME. Intratumorálna heterogenita charakterizuje prítomnosť buniek v nádore s rôznym stupňom morfológie, rýchlosti proliferácie, schopnosti metastázovať, citlivosti na liečivá, závislosti od rastových signálov. Dlhodobý je uznávaná ako charakteristický znak väčšiny karcinómov a vo veľkej miere súvisí s relapsom nádorového ochorenia. Genotypovú aj fenotypovú diverzitu v rámci nádorov je poháňajú nielen genetické mutácie a epigenetické zmeny, ale aj

vplyv nádorového mikroprostredia. V dôsledku expanzie agresívnejších klonov, hierarchiou diferenciácie nádorových a nenádorových kmeňových buniek vzniká široká diverzita buniek v rámci každého nádoru (26). K tomu sa prirodzene vzťahuje aj intertumorálna heterogenita charakterizujúca individuálne rozdiely medzi nádormi u rôznych pacientov. Úspešnosť nových, účinnejších a inovatívnych prístupov v onkologickej liečbe závisí aj od schopnosti simulovať nádor ako veľmi komplexný a dynamický ekosystém aj v in vitro podmienkach.

Dlhodobý používaný 2D modely bunkových kultúr predstavujú efektívny nástroj na analýzu bunkovej signalizácie, ako aj na prvotné analýzy účinnosti potenciálnych liečiv. Bunky kultivované v monovrstve majú takmer rovnaký prístup k živinám a rastovým faktorom, čo umožňuje homogénny rast a proliferáciu buniek. Stále sú atraktívnym a často používaným modelom pre ich efektívnosť a jednoduchosť (27). Pri komerčne dostupných nádorových bunkách je veľmi dôležitý správny výber bunkovej línie vzhľadom na študované mechanizmy a signálne dráhy. Takéto bunkové línie sú detailne charakterizované aj z pohľadu genetickej záťaže, morfológie, pôvodu a kultivačných podmienok. V našich experimentoch sme použili dve bunkové línie NSCLC s cieľom sledovať hypoxickú signalizáciu a os HIF1-CA IX. Bunková línia A549 je derivovaná z primárneho nádoru adenokarcinómu pľúc, bunky línie H1299 boli derivované z pozitívnej lymfatickej uzliny pacienta s NSCLC. Je známe, že NSCLC exprimujú proteín CA IX a majú tiež aktívnu hypoxickú signalizáciu v odpovedi na pokles v koncentrácii kyslíka v nádorovom tkanive (21, 24). Viaceré práce dokazujú, že v bunkových líniách A549 a H1299 dochádza k stabilizácii podjednotky HIF1 α v hypoxii a k aktivácii expresie HIF1 cieľových génov (28 - 30). Pri základnej charakterizácii týchto buniek v monovrstve sme zistili, že napriek tomu, že hypoxická signalizácia prostredníctvom transkripčnej aktivity HIF1 je v oboch typoch buniek aktívna a obe línie majú v hypoxii proteín HIF1 α , k expresii CA IX

Obrázok 4. Kombinovaný kokultivačný model heterotypických sféroidov A549/MRC5 s PBMC. Pemetrexed aktivoval zvýšenú penetráciu imunitných buniek izolovaných z periférnej krvi do vnútra sféroidov A549/MRC5 (A). Prenikanie PBMC sme sledovali v čase a fluorescenčné obrázky (B) dokazujú signifikantne zvýšené prenikanie PBMC po 36 h kokultivácie v prítomnosti Pemetrexedu. Vplyvom imunitných buniek smer dokázali zvýšený cytotoxický efekt Pemetrexedu v kombinovaných sféroidoch A549/MRC5/PBMC (C).



dochádza iba v bunkách A549 (obr. 2A). Toto zistenie sme overovali aj v 3D modeli homotypických sféroidov, kde dochádza prirodzene k tvorbe gradientu kyslíka, nutričných, odpadových látok a pH smerom dovnútra sféroidu (31). V rezoch sféroidov sme overovali prítomnosť proteínu CA IX. Podobne ako pri detekcii CA IX v lyzátoch buniek H1299 kultivovaných v monovrstve, ani v rezoch sféroidov H1299 sme nedetegovali proteín CA IX. Naopak v rezoch sféroidov A549 bola intenzita značenia vysoká (obr. 2B). Vzhľadom na tieto skutočnosti sme v ďalších experimentoch používali iba bunkovú líniu A549. Naše výsledky dokumentujú dôležitosť správneho výberu bunkovej línie a zároveň aj potrebu detailného overovania prítomnosti testovaných proteínov.

Nádorové bunkové línie kultivované v monovrstve predstavujú neoddeliteľnú a dôležitú súčasť experimentálnej onkológie. Majú však viacero nedostatkov najmä v prípade študovania nádorového mikroprostredia *in vitro*, pretože nedostatočne odzrkadľujú vzájomné interakcie, priestorovú architektúru a dynamiku v rámci TME (32). Najväčším nedostatkom 2D kultúr je absencia strómy a extracelulárneho matrixu, ako aj nezohľadňovanie bunkovej heterogenity, gradientu živín, kyslíka a pH a interakcií medzi bunkami (31). 3D modely sféroidov predstavujú vyšší stupeň organizácie nádorových buniek s definovanou priestorovou geometriou. Sú schopné lepšie napodobniť nielen *in vivo* morfológiu, ale aj bunkové prepojenia, polaritu, génovú expresiu a tkanivovú architektúru. Okrem toho sú sféroidy zložené z buniek s rôznymi fenotypmi, ako sú proliferujúce, neproliferujúce, apoptotické a nekrotické bunky (33, 34). Pri dosiahnutí veľkosti okolo 500 μm preukazujú charakteristické znaky avaskulárnych nádorov a mikrometastáz s vonkajšou proliferujúcou zónou, vnútornou zónou neproliferujúcich hypoxických buniek a nekrotickým jadrom, ktoré vznikajú v dôsledku gradientov živín a kyslíka (35). Sféroidy tvorené jedným typom nádorových epitelových buniek, známe aj ako homotypické sféroidy, sme použili aj v našich experimentoch. Výsledky prezentované na obrázku 2B dokazujú vysokú expresiu CA IX vo sféroidoch A549 s centrálnou vypadnutou nekrotickou časťou a s proliferujúcimi povrchovými dostatočne okysličenými bunkami (svetlé bunky v povrchových vrstvách sféroidu). Takéto 3D modely zabezpečujú správne interakcie bunka-bunka a bunka-prostredie s cieľom imitovať štruktúru nádorového tkaniva. Bunky môžu zároveň prijímať stimuly z lokálneho prostredia tak, ako je to v *in vivo* podmienkach (36, 37). Okrem toho sa v 3D kultúrach zachováva morfológia a polarita buniek (38) a špecifická vnútorná architektúra vznikajúca v dôsledku apoptózy v centrálnej časti sféroidov. Bunková proliferácia pritom závisí od lokalizácie bunky vo sféroide a je vyššia v periférnej časti 3D štruktúr, čo dokumentuje aj obrázok 2B.

Pretože nádorová masa nie je tvorená iba jedným typom buniek, je nevyhnutné pripraviť taký experimentálny 3D model, ktorý by spoľahlivejšie simuloval stav nádoru *in vivo* a bol by zároveň vhodný na štúdium

vzájomných vzťahov nádor-stróma. V rámci našej experimentálnej práce sme pripravili model heterotypických sféroidov, kde sme kokultivovali súčasne dva typy buniek – bunky pľúcneho adenokarcinómu A549 a pľúcne fibroblasty MRC5. Inkorporácia pľúcnych fibroblastov predstavuje ďalší krok smerom k obohateniu mikroprostredia sféroidu stromálnymi zložkami. Takýto prístup predstavuje vyššiu úroveň 3D *in vitro* modelov. Komplexné heterotypické sféroidové modely obsahujú dva alebo viac typov buniek. V takomto modeli možno analyzovať rôzne pomery nádorovej a stromálnej zložky, ktoré sa pri NSCLC menia v závislosti od štádia nádoru, ako aj od mutačnej záťaže (39). Prítomnosť fibroblastov začlenených do sféroidu A549 zabezpečila produkciu extracelulárneho matrixu a s tým súvisiace zmeny v TME. Fibroblasty sú hlavnými zložkami nádorového mikroprostredia a vo väčšine pevných nádorov sa vplyvom stimulácie nádorovými bunkami aktivujú na nádorovo asociované fibroblasty (CAF) podporujúce nielen rozvoj a progresiu nádoru, ale aj chemorezistenciu (40). Produkciu vlastných proteínov môžu remodelovať extracelulárny matrix a tým aj TME (41). Dôkazom relevantnosti nášho modelu v testovaní terapeutík sú aj výsledky, kde sme heterotypické sféroidy A549/MRC5 použili na sledovanie cytotoxického efektu chemoterapeutika Pemetrexed, ktoré sa v súčasnosti stále používa v liečbe neskvamóznych NSCLC. Účinnosť a cytotoxický efekt chemoterapeutika sme sledovali na viacerých úrovniach. Zisťovali sme vplyv Pemetrexedu na rast sféroidov prostredníctvom kontinuálneho monitorovania rastu sféroidov. Rastové krivky jasne dokazujú retardáciu rastu sféroidov A549/MRC5 vplyvom Pemetrexedu. Pretože majú tieto sféroidy veľkosť nad 500 μm , predstavujú zároveň aj model avaskulárnych nádorov alebo mikrometastáz (35). Účinnosť Pemetrexedu sme dokázali na proteínovej úrovni prostredníctvom western blotu s následnou imunodetekciou hladiny štiepeného PARP (Poly (ADP-ribose) polymeráza), markera apoptózy. PARP je enzým majúci dôležitú úlohu v oprave DNA, v modulácii chromatinu, ale aj v programovanej bunkovej smrti. Práve jeho štiepená forma je prejavom apoptických procesov, v našom prípade indukovaných antifolátovým chemoterapeutikom. Kým v kontrolných sféroidoch nebol štiepený PARP detegovateľný, zvýšenú hladinu sme pozorovali v Pemetrexedom ošetrovaných vzorkách. Cytotoxický efekt tohto liečiva sme potvrdili aj prostredníctvom konfokálnej mikroskopie, kde sme sledovali prostredníctvom indikátora apoptózy zmeny v intenzite fluorescenčného žiarenia. Opätovne sa nám potvrdila aktivácia apoptózy vplyvom Pemetrexedu.

V súčasnosti je v centre pozornosti úloha imunitného systému nielen v tumorigenéze a progresii ochorenia, ale aj v odpovedi na protinádorovú liečbu. Úloha kontrolných bodov imunitného systému a imunoterapia zameraná na niektoré z nich je aj súčasťou liečebných stratégií NSCLC. Vývoj inhibítorov imunitných kontrolných bodov prostredníctvom blokujúcich protilátok namierených napr. proti CTLA-4 alebo PD-1/PD-L1 výrazne zlepšili liečbu viacerých typov nádorov. Miera

objektívnej odpovede prostredníctvom takejto blokády je však v súčasnosti približne len 20 % (42 – 44). Viaceré štúdie odhalili, že NSCLC obsahujú rôzne typy imunitných buniek vrátane T-buniek, B-buniek, makrofágov, NK buniek a dendritických buniek a hustota imunitných buniek súvisí s prežívaním pacientov (45 – 49). Preto je potrebné zavádzať nové spoľahlivé metódy na charakterizáciu imunitnej odpovede aj pri NSCLC. Pre testovanie nových potenciálnych liečiv je výhodné pracovať s charakterizovanými nádorovými epitelovými bunkami, kde vieme presne genetické pozadie, ako aj typ karcinómu, z ktorého bola línia pripravená. V našom prípade sme pripravili kokultivačný imunomodel A549/MRC5/PBMC. PBMC zahŕňajú viaceré typy imunitných buniek vrátane T-lymfocytov a B-lymfocytov, NK buniek, monocytov a dendritických buniek. Analyzovali sme nielen efekty Pemetrexedu, ale tiež sme sledovali, či prítomnosť imunitných buniek v tomto modeli ovplyvní cytotoxický efekt použitého chemoterapeutika v porovnaní s modelom bez prítomnosti PBMC. Naše výsledky ukázali, že PBMC sú schopné prenikať dovnútra heterotypických sféroidov A549/MRC5. Zároveň sme zistili, že Pemetrexed zvyšuje schopnosť PBMC prenikať do sféroidov. Naše zistenia sú v súlade publikovanými výsledkami Okimoto a kol., 2020 (50), ktorí zistili, že Pemetrexed je schopný senzitivizovať bunky NSCLC prostredníctvom modulácie imunoregulačných molekúl. Naše výsledky analýzy apoptotického signálu v tomto modeli ukázali, že pri PBMC zvyšujú cytotoxický efekt Pemetrexedu. Kombinovaný experimentálny model zahŕňajúci viaceré zložky TME – okrem nádorových buniek aj fibroblasty a imunitné bunky predstavuje experimentálny systém vhodný na testovanie účinnosti nových potenciálnych liečiv využiteľných pri liečbe NSCLC. V ére personalizovanej terapie sa do popredia dostáva príprava nádorových organoidov, ktoré sú pripravené priamo z nádorového tkaniva pacienta a predstavujú systém vhodný na stratifikáciu pacientov na najúčinnjšiu terapiu. Výhodou je, že organoidy si udržiavajú mutačnú záťaž a základné charakteristiky pôvodného nádorového tkaniva a rekapitulujú nádor v in vitro podmienkach.

Záver

TME má zásadnú úlohu vo všetkých procesoch tumorigenézy prostredníctvom expície špecifických markerov, genetických zmien a dokonca aj v odpovedi na protinádorovú liečbu. Poznanie jeho jednotlivých súčastí, ich vzájomných väzieb a interakcií preto predstavuje veľmi dôležitý krok nielen k presnejšej diagnostike, ale aj k cielej personalizovanej terapii. Sféroidy NSCLC preukazujú viaceré fyziologické a molekulové charakteristiky nádorového tkaniva a predstavuje vhodný model na testovanie účinnosti nových potenciálnych liečiv. 3D modely nádorov odrážajú celkovú bunkovú heterogenitu a plasticitu nádorov a sú relevantným prístupom v experimentálnej onkológii. Výsledky našich experimentov jasne dokazujú adekvátnosť 3D modelov homotypických a heterotypických sféroidov v experimentálnej

onkológii. V závislosti od študovaných bunkových procesov sú sféroidy vhodné na testovanie nielen signálnych dráh, fyzikálno-chemických komponentov TME, ale aj stromálnych zložiek, interakcií bunka-bunka, bunka-stróma. Kokultivačným modelom s účasťou imunitnej zložky sme zaviedli vyšší stupeň experimentálnych modelov umožňujúci študovanie komplexných mechanizmov a vzťahov v dobre definovaných modelových systémoch s inkorporáciou viacerých bunkových a nebunkových súčastí TME.*

*Tento článok neobsahuje žiadne štúdie na ľudských alebo zvieracích objektoch.

Autori publikácie vyhlasujú, že nemajú žiaden konflikt záujmov

Podakovanie. Táto práca bola podporená z grantov VEGA2/0113/24 a VEGA2/0095/23.

Literatúra

1. YANG X, LIN D. Changes of 2015 WHO Histological Classification of Lung Cancer and the Clinical Significance. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2016, 19: 332 – 336. <https://doi.org/10.3779/j.issn.1009-3419.2016.06.06>.
2. DE SOUSA VML, CARVALHO L. Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology* 2018, 85: 96 – 107. <https://doi.org/10.1159/000487440>.
3. LEE CK, BROWN C, GRALLA RJ, HIRSH V, THONGPRASERT S et al. Impact of EGFR Inhibitor in Non-Small Cell Lung Cancer on Progression-Free and Overall Survival: A Meta-Analysis. *JNCI* 2013, 105: 595 – 605. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt072>.
4. SHAW AT, YEAP BY, MINO-KENUDSON M, DIGUMARTHY SR, COSTA DB et al. Clinical Features and Outcome of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009, 27: 4247 – 4253. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.6993>.
5. D'ANGELO A, SOBHANI N, CHAPMAN R, BAGBY S, BORTOLETTI C et al. Focus on ROS1-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Crizotinib, Resistance Mechanisms and the Newer Generation of Targeted Therapies. *Cancers* 2020, 12: 3293. <https://doi.org/10.3390/cancers12113293>.
6. RIUDAVETS M, SULLIVAN I, ABDAYEM P, PLANCHARD D. Targeting HER2 in non-small-cell lung cancer (NSCLC): a glimpse of hope? An updated review on therapeutic strategies in NSCLC harbouring HER2 alterations. *ESMO Open* 2021, 6: 100260. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100260>.
7. DAVIES KD, NG TL, ESTRADA-BERNAL A, LE AT, ENNEVER PR et al. Dramatic Response to Crizotinib in a Patient with Lung Cancer Positive for an HLA-DRB1-MET Gene Fusion. *JCO Precis Oncol* 2017, 1: 1 – 6. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00117>.
8. FERRER I, ZUGAZAGOITIA J, HERBERTZ S, JOHN W, PAZ-ARES L et al. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer* 2018, 124: 53 – 64. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013>.
9. CHEN Z, FILLMORE CM, HAMMERMAN PS, KIM CF, WONG K-K. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 2014, 14: 535 – 546. <https://doi.org/10.1038/nrc3775>.
10. MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A, BALKWILL F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, 454: 436 – 444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>.

11. ZHANG Y, BIAN Y, WANG Y, WANG Y, DUAN X et al. HIF-1 α is necessary for activation and tumour-promotion effect of cancer-associated fibroblasts in lung cancer. *J Cell Mol Med* 2021, 25: 5457 – 5469. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16556>.
12. SEMENZA G. L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 88 (4): 1474 – 1480. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1474>.
13. PÖTZL J, ROSER D, BANKEL L, HÖMBERG N, GEISHAUSER A et al. Reversal of tumor acidosis by systemic buffering reactivates NK cells to express IFN γ and induces NK cell-dependent lymphoma control without other immunotherapies. *Int J Cancer* 2017, 140: 2125 – 2133. <https://doi.org/10.1002/ijc.30646>.
14. VAUPEL P, MULTHOFF G. Adenosine can thwart antitumor immune responses elicited by radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 2016, 192: 279 – 287. <https://doi.org/10.1007/s00066-016-0948-1>.
15. MORITA T, NAGAKI T, FUKUDA I, OKUMURA K. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 1992, 268: 297 – 305. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90235-T](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90235-T).
16. PASTOREK J, PASTOREKOVA S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Seminars in cancer biology* 2015, 31: 52 – 64. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.08.002>.
17. SVASTOVÁ E, HULÍKOVÁ A, RAFAJOVÁ M, ZAT'OVICOVÁ M, et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS letters* 2004, 577 (3): 439 – 445. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.043>.
18. WYKOFF CC, BEASLEY NJ, WATSON PH, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer research* 2000, 60 (24): 7075 – 7083.
19. KON-NO H, ISHII G, NAGAI K, YOSHIDA J, NISHIMURA M, et al. Carbonic anhydrase IX expression is associated with tumor progression and a poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2006, 54: 409 – 418. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.08.017>.
20. HUSSAIN SA, GANESAN R, REYNOLDS G, GROSS L, STEVENS A et al. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *Br J Cancer* 2007, 96: 104 – 109. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603530>.
21. SIMI L, VENTURINI G, MALENTACCHI F, GELMINI S, ANDREANI M et al. Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006, 52: 59 – 66. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.11.017>.
22. KIM SJ, RABBANI ZN, VOLLMER RT, SCHREIBER E-G, OOSTERWIJK E et al. Carbonic Anhydrase IX in Early-Stage Non – Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 7925 – 7933. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0636>.
23. LEE JH, PARK WY, JEONG SM, LEE MK, KIM YD et al. Relationship between the Endogenous Hypoxic Markers Hypoxia Inducible Factor-1 α , Carbonic Anhydrase IX, and Epithelial Mesenchymal Transition Regulator TWIST Expression in Non-small Cell Lung Cancer. *Korean J Pathol* 2010, 44: 469 – 476. <https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2010.44.5.469>.
24. ANDERSEN S, EILERTSEN M, DONNEM T, AL-SHIBLI K, AL-SAAD S et al. Diverging prognostic impacts of hypoxic markers according to NSCLC histology. *Lung Cancer* 2011, 72: 294 – 302. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.10.006>.
25. GOLDMAN MJ, CRAFT B, HASTIE M, REPEČKA K, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nature biotechnology* 2020, 38 (6): 675 – 678. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>.
26. NEELAKANTAN D, DRASIN DJ, FORD HL. Intratumoral heterogeneity: Clonal cooperation in epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis. *Cell Adhesion & Migration*. 2015, 9 (4): 265 – 276. Doi 10.4161/19336918.2014.972761.
27. DUVAL K, GROVER H, HAN LH, MOU Y, PEGORARO AF et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology* (Bethesda) 2017, 32: 266 – 277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
28. Wu Z, Xu B, He Q, Hu Z, Yu Z. Tetrastigma hemsleyanum Ethanolic Extract Inhibited the Growth of Nonsmall Cell Lung Cancer Cells by Suppressing Hypoxia-Inducible Factor-1 α -Dependent Glycolysis and Angiogenesis. *Natural Product Communications*. 2023, 18 (1). DOI: 10.1177/1934578X221142796
29. HUANG Y, CHEN Z, LU T et al. HIF-1 α switches the functionality of TGF- β signaling via changing the partners of smads to drive glucose metabolic reprogramming in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2021, 40: 398. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02188-y>.
30. MORENO ROIG E, GROOT AJ, YAROMINA A, et al. HIF-1 α and HIF-2 α Differently Regulate the Radiation Sensitivity of NSCLC Cells. *Cells* 2019, 8, 45. <https://doi.org/10.3390/cells8010045>.
31. COSTA EC, MOREIRA AF, DE MELO-DIOGO D, GASPAR VM, CARVALHO MP, et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv* 2016, 34: 1427 – 1441. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>.
32. IMAMURA Y, MUKOHARA T, SHIMONO Y, FUNAKOSHI Y, CHAYAHARA N, et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* 2015, 33: 1837 – 1843. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>.
33. KIM JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol* 2005, 15: 365 – 377. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.002>.
34. FANG Y, EGLEN RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov* 2017, 22: 456 – 472. <https://doi.org/10.1177/1087057117696795>.
35. RODRIGUES T, KUNDU B, SILVA-CORREIA J, KUNDU SC, OLIVEIRA JM et al. Emerging tumor spheroids technologies for 3D in vitro cancer modeling. *Pharmacol Ther* 2018, 184: 201 – 211. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.018>.
36. CAWKILL D, EAGLESTONE SS. Evolution of cell-based reagent provision. *Drug Discov Today* 2007; 12: 820 – 825. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.08.014.
37. LEE J, CUDDIHY MJ, KOTOV NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 2008, 14: 61 – 86. DOI: 10.1089/teb.2007.0150.
38. YAMADA K, CUKIERMAN E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007, 130: 601 – 610. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.006.
39. HU H, PIOTROWSKA Z, HARE PJ, CHEN H, MULVEY HE, et al. Three subtypes of lung cancer fibroblasts define distinct therapeutic paradigms. *Cancer Cell* 2021, 39: 1531 – 1547.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.09.003>.
40. SOCOVICH A.M., NABA A. The cancer matrixome: From comprehensive characterization to biomarker discovery. *Semin. Cell Dev Biol* 2019, 89: 157 – 166. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.06.005.

-
41. CARTER EP, ROOZITALAB R, GIBSON SV, GROSE RP. Tumour microenvironment 3D-modelling: simplicity to complexity and back again. *Trends in cancer* 2021, 7 (11): 1033 – 1046. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.06.009>.
42. TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, GETTINGER SN, SMITH DC, MCDERMOTT DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti – PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012, 366: 2443. DOI: 10.1056/NEJMoa1200690.
43. BRAHMER JR, DRAKE CG, WOLLNER I, POWDERLY JD, PICUS J, SHARFMAN WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010, 28: 3167. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.7609.
44. SANTARPIA M, GIOVANNETTI E, ROLFO C, KARACHALIOU N, GONZÁLEZ-CAO M, ALTAVILLA G, et al. Recent developments in the use of immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Respir Med* 2016, 10: 781. DOI: 10.1080/17476348.2016.1182866.
45. AL-SHIBLI KI, DONNEM T, AL-SAAD S, PERSSON M, BREMNES RM, BUSUND LT. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008, 14: 5220. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0133.
46. DIEU-NOSJEAN MC, ANTOINE M, DANIEL C, HEUDES D, WISLEZ M, POULOT V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 2008, 26: 4410. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.0284.
47. OHRI CM, SHIKOTRA A, GREEN RH, WALLER DA, BRADDING P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J* 2009, 33: 118. DOI: 10.1183/09031936.00065708.
48. AL-SHIBLI K, AL-SAAD S, DONNEM T, PERSSON M, BREMNES RM, BUSUND LT. The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 2009, 55: 301. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2009.03379.x.
49. SCHALPER KA, BROWN J, CARVAJAL-HAUSDORF D, MCLAUGHLIN J, VELCHETI V, SYRIGOS KN, et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non – small cell lung cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2015, 107. DOI: dju435. 10.1093/jnci/dju435.
50. OKIMOTO T, KOTANI H, IIDA Y, KOYANAGI A, TANINO R, TSUBATA Y, ISOBE T, HARADA M. Pemetrexed sensitizes human lung cancer cells to cytotoxic immune cells. *Cancer Sci* 2020, 111 (6): 1910-1920. DOI: 10.1111/cas.14401.

Do redakcie došlo 14. 2. 2025.

**Adresa pre korešpondenciu:
RNDr. Monika Baráthová, PhD.**

Virologický ústav BMC SAV
Dúbravská cesta 9
845 05 Bratislava