

Nové výskumné a terapeutické ciele v molekulárnej genetike nádorov – naše výskumné možnosti

Mgr. Miroslav Chovanec, PhD.¹, RNDr. Božena Smolková, PhD.¹, Mgr. Viera Kajabová, PhD.¹, RNDr. Ivana Fridrichová, CSc.¹, RNDr. Alena Gábelová, CSc.¹, Mgr. Lucia Kučerová, PhD.², RNDr. Ján Sedlák, DrSc.²

¹Oddelenie genetiky, Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

²Oddelenie onkológie, Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

Výskum v oblasti nádorových ochorení za posledné obdobie priniesol veľmi veľa poznatkov, ktoré v budúcnosti môžu pomôcť pri ich cielenej a personalizovanej liečbe. Genómová instabilita patrí k jednej z charakteristík, ktoré sú zodpovedné za vznik neoplastického procesu a umožňujú jeho ďalší rozvoj. Výskum mechanizmov zodpovedných za odpoveď bunky na poškodenie DNA a jeho opravu priniesol nové poznatky, ako účinne kombinovať liečivá pri protinádorovej terapii. Zmeny v expresii génov navodené epigenetickými mechanizmami, ktoré sú špecifické pre nádorové bunky, sa skúmajú nielen ako potenciálne biomarkery pre diagnostické účely, ale aj terapeutické ciele. Podobne aj identifikácia mikroRNA (miRNA) molekúl prítomných v exozómoch v periférnej krvi má potenciál na využitie v diagnostike ako tekutá biopsia nádoru. Veľký rozvoj v onkológii nastal aj v oblasti nanomedicíny, kde sa očakáva prínos nových možností pre efektívnejšiu a cieleňú liečbu nádorov nielen látkami dlhodobo využívanými v klinickej praxi, ale aj novými molekulami.

Kľúčové slová: oprava poškodení DNA, instabilita genómu, epigenetika, biomarkery, mikroRNA, nanomedicina.

New research and therapeutic targets in molecular genetics of tumors – our research potential

Over the last few years, our knowledge on cancer disease has progressed substantially. This knowledge may help target tumor treatment as well as personalize therapy. Genomic instability was recognized as one of the crucial factors causing malignant cell transformation and subsequent tumor development. Research in the field of DNA damage response and repair succeeded in advances in unraveling the effective drug combinations for the antitumor treatment. Alterations in the gene expression mediated by epigenetic regulations, which are specific for tumor cells, are subject of research for their potential use as biomarkers and therapeutic targets. Similarly, the identification of microRNA (miRNA) molecules present in the peripheral blood exosomes has the potential to be used in diagnostics as liquid biopsy of tumor. In addition, a substantial advance in the field of nanomedicine in oncology has recently been achieved, bringing new possibilities for the more effective and targeted tumor therapy with the drugs, which have been used in the clinic for a long time, but also introducing new molecules.

Key words: DNA repair, genomic instability, epigenetics, biomarkers, microRNA, nanomedicine.

Onkológia (Bratisl.), 2015; roč. 10(1): 14–18

Úvod

Na pochopenie rozsiahlej diverzity neoplázií je dôležité si uvedomiť, že nádorové bunky majú niekoľko kľúčových spoločných charakteristických vlastností. Sú to síce odlišné, ale navzájom komplementárne biologické znaky, ktoré umožňujú rast nádoru a metastatický rozsev. Genomická instabilita a zmeny v schopnosti opraviť poškodenie DNA sa považujú za jednu z tých charakteristík, ktoré vytvárajú predpoklad na vznik genetických zmien, vedúcich následne k nádorovej progresii. V regulácii expresie génov má veľmi dôležitú úlohu aj epigenetická regulácia, ktorej aberácie v nádoroch sa sledujú s cieľom využitia v diagnostike aj v samotnej liečbe.

Oprava DNA a instabilita genómu

DNA je permanentne vystavená vplyvu rôznych látok a procesov, ktoré v nej môžu vyvolať široké spektrum poškodení – chemických

a fyzikálnych štrukturálnych modifikácií. Ich rôznorodosť je taká vysoká, že evolučne sa bunkám vyvinulo viacero molekulárne rozdielnych mechanizmov opravy DNA. Niektoré z nich sú pomerne jednoduché a dokonca jednokrakové, ako je oprava alkylovanej DNA, pri ktorej dochádza k jednoduchému prenosu alkylovej skupiny z DNA na opravný proteín, ktorý je následne inaktivovaný a degradovaný. Pri veľkej väčšine opravných procesov DNA však dochádza k vyštípeniu dlhšieho jej úseku, ktorý nesie aj miesto samotného poškodenia. Tento typ opravy sa nazýva excízna oprava DNA a zahŕňa 1. nukleotidovú excíznu opravu (NER), ktorá je zodpovedná za opravu poškodení DNA indukovaných UV svetlom, 2. báзовú excíznu opravu (BER), ktorej substrátom sú prevažne oxidačné poškodenia DNA endogénneho pôvodu a 3. opravu chybné spáovaných báзовých párov, ktorá koriguje chyby replikácie DNA. Ďalším typom

poškodenia DNA sú také poškodenia, ktoré buď narušujú celistvosť jej vlákien, alebo ich kovalentne spájajú. Prvé predstavujú zlomy DNA (jednovláknové a dvojláknové) a druhé krížne väzby DNA (vnútroreťazcové a medzireťazcové). Jednovláknové zlomy DNA sú opravované prostredníctvom BER, zatiaľ čo dvojláknové zlomy sú substrátom pre sofistikovanejšie mechanizmy: homologickú rekombináciu (HR) a spájanie nehomologických koncov DNA. Vnútroreťazcové krížne väzby sú rozpoznávané NER systémom. Kooperácia viacerých opravných dráh, zahrnujúca NER a HR, je potrebná na opravu medzireťazcových krížnych väzieb DNA.

Ak poškodenia zostanú v DNA neopravené alebo sú opravené chybné, môžu spôsobiť instabilitu genómu, ktorá sa považuje za charakteristický znak nádorových buniek. Instabilita genómu nádorových buniek je okrem samotných poškodení DNA spôsobená aj poruchami

v génoch zodpovedných za odpoveď buniek na poškodenie DNA a jeho opravu, ako aj neschopnosťou týchto buniek zastaviť progresiu bunkového cyklu, aby sa zabránilo prenosu poškodenej DNA do dcérskej bunky. Z uvedených faktov nie je prekvapivé, že nádorové bunky sú často citlivejšie k látkam poškodzujúcim DNA ako normálne bunky. Aj preto má veľká väčšina látok používaných v protinádorovej terapii za primárny farmakologický cieľ práve DNA.

Synergia špecifického typu poškodenia DNA navodeného terapeutickou látkou a neschopnosti buniek účinne ho opraviť sa využíva v klinickej onkologickej praxi už polstoročie bez toho, aby sa spočiatku poznala jeho molekulárna podstata. Tá je už v súčasnosti dobre známa a sú ňou poruchy v mechanizmoch zodpovedných za odpoveď buniek na poškodenie DNA a jeho opravu. Elegantným príkladom takejto synergie, ktorá sa nazýva aj syntetická letalita a dnes je cielene dizajnovaná na základe molekulárnych podkladov, je použitie inhibítorov enzýmu, ktorý katalyzuje poly(ADP-ribozyl)áciu (PARP) niektorých proteínov zahrnutých v metabolizme DNA a architektúre chromatinu (1). Inhibítory PARP selektívne a veľmi účinne zabíjajú nádorové bunky s poruchou v HR (napríklad bunky nesúce mutácie v génoch *BRCA1* alebo *BRCA2*), pretože spôsobujú vznik dvojláknových zlomov DNA, ktoré zostávajú v týchto bunkách neopravené, keďže HR patrí k esenciálnym mechanizmom zodpovedným za opravu dvojláknových zlomov DNA v ľudských bunkách. Neopravené dvojláknové zlomy DNA následne vedú k ich smrti buniek prostredníctvom apoptózy. Selektivita účinku inhibítorov PARP pri zabíjaní buniek s poruchou v HR je dokumentovaná faktom, že v podmienkach *in vitro* sú bunky nesúce mutáciu v *BRCA1* alebo *BRCA2* géne 1000-násobne citlivejšie k takýmto inhibítorm ako bunky bez poruchy v HR (2). PARP inhibítory sú v predklinickej a klinickej fáze testovania.

Nielen znížená, ale aj zvýšená účinnosť mechanizmov zodpovedných za odpoveď buniek na poškodenie DNA a jeho opravu koliduje s liečbou onkologických pacientov, pretože predstavuje bariéru v ich liečbe. Dnes je už známe, že rezistencia niektorých typov nádorov k aplikovanej terapii je spôsobená zvýšenou expresiou génov zodpovedných za odpoveď buniek na poškodenie DNA a jeho opravu. V takýchto prípadoch sa veľmi nádejnou ukazuje ich inhibícia. Najlepším príkladom v tomto kontexte je proteín nazývaný *O*⁶-alkylguanín DNA alkyltransferáza (*O*⁶-ATáza, kódovaná génom *MGMT*), ktorý odstraňuje z DNA alkylačné poškodenia. Tento

proteín je vo zvýšenej miere veľmi často exprimovaný v nádorových bunkách v porovnaní s normálnymi bunkami. Inhibícia tohto proteínu, cez jeho inaktiváciu prostredníctvom väzby na pseudosubstráty, sa ukazuje ako schodná cesta k navodeniu citlivosti nádorov so zvýšenou expresiou *O*⁶-ATázy. Inhibítory *O*⁶-ATázy sú vo fáze II klinického testovania (3).

Na základe uvedeného klasifikácia nádorov podľa účinnosti mechanizmov zodpovedných za odpoveď buniek na poškodenie DNA a jeho opravu sa javí perspektívnym prístupom v liečbe onkologických ochorení. Použitie profilov génov determinujúcich tieto mechanizmy a identifikácia molekulárnych a funkčných biomarkerov týchto génov bude znamenať veľmi užitočnú informáciu pre klinikov, ktorí by na ich základe mohli racionalizovať a zlepšiť terapiu nádorového ochorenia, takzvané personalizovať onkologickú liečbu (4). V dnešných časoch, keď získanie sekvencie celého genómu bunky nie je časovo náročné a stáva sa zo dňa na deň finančne reálnejšie, sa informácia o mechanizmoch odpovede bunky na poškodenie DNA a jeho oprave dá získať aj celogenómovým sekvenovaním. Na základe sekvencie genómu nádorových buniek získaných z biopsie a následnej identifikácie patogénnych mutácií sa bude dať konkrétne určiť, ktoré z týchto mechanizmov sa na ich vytváraní podieľali. Tiež sa bude dať odhadnúť rozsah poškodenia genómu a faktory, ktoré ho spôsobili. Ukázalo sa, že nádory s poruchou v HR majú charakteristické mutačné spektrum, ktoré vyplýva z využitia iných dráh pri oprave dvojláknových zlomov DNA (5). Preto sekvencie genómu nádorov, v ktorých sa identifikuje porucha v HR, môžu byť nápomocným faktorom pri zvažovaní použitia PARP inhibítorov pri ich liečbe. Aj použitie iných metodík, ako je microarray a mikroRNA (miRNA) array, môže byť veľmi nápomocné pri klasifikácii nádorov z hľadiska ich defektu v procesoch odpovede buniek na poškodenie DNA a jeho opravy. Dnes už je veľmi dobre známe, že expresia niektorých miRNA korešponduje s účinnosťou protinádorovej liečby, a že mnohé gény determinujúce faktory odpovede buniek na poškodenie DNA a jeho opravy sú regulované práve týmito RNA (6).

Vo svetle nových, molekulárne dobre definovaných súvislostí medzi onkologickým ochorením a mechanizmami odpovede bunky na poškodenie DNA a jeho opravy, ako aj vďaka rýchlemu napredovaniu v oblasti celogenómových analýz a ich využití v medicíne, je už dnes evidentné, že nádorová taxonómia založená na klinických a histopatologických vlastnostiach

nádoru a na mieste jeho primárneho výskytu bude musieť byť pre koncept personalizovanej liečby prinajmenšom doplnená o sekvenčné a expresné profily génov determinujúcich tieto mechanizmy, ako aj o molekulárne a funkčné biomarkery týchto génov.

Epigenetická deregulácia a zmeny expresie génov

Epigenetické mechanizmy, medzi ktoré sa zaraďujú metylácia DNA a modifikácia histónov a s nimi súvisiaca remodelácia chromatinu, patria spolu s nekódujúcimi RNA ku kľúčovým regulátormi expresie génov. Vo fyziologických podmienkach hrajú dôležitú úlohu v udržiavaní normálnej funkcie bunky a bunkovej identity. Aberantné epigenetické procesy vedú k významným zmenám v profiloch génovej expresie, ktorých dôsledkom môže byť vznik malígneho fenotypu.

K najlepšie preštudovaným epigenetickým mechanizmom patrí metylácia DNA, pri ktorej dochádza k prenosu metylovej skupiny na pyrimidín cytozín, umiestnený v molekule DNA pred guanozínom (CpG dinukleotid). Dvojice CpG dinukleotidov sú roztrúsené nerovnomerne v genóme človeka, často sú lokalizované v rozsiahlych repetitívnych sekvenciách alebo v oblastiach nazývaných CpG ostrovčeky, ktoré sa vyskytujú takmer pri 60 % génov kódujúcich proteíny. Výskyt CpG ostrovčekov je charakteristický pre tie časti génov, ktoré kontrolujú génovú expresiu – napríklad promótorov. Promótorové CpG ostrovčeky sú väčšinou nemetylované, čím je umožnená ich transkripcia za prítomnosti príslušných transkripčných faktorov a ostatných komponentov transkripčného komplexu. Repetitívne sekvencie sú, naopak, vysokometylované, čo zabraňuje aktivácii endoparazitických sekvencií a zvyšuje ochranu chromozomálnej integrity. Metylácia DNA má rozhodujúcu úlohu vo viacerých fyziologických procesoch, ako sú diferenciácia tkanív, inaktivácia X chromozómu, genomický imprinting a ochrana pred reaktiváciou transpozónov. Pre tumorigenézu sú typické globálna hypometylácia genómu, paradoxne sprevádzaná hypermetyláciou promótorových sekvencií génov (7).

V epigenetickej regulácii génovej expresie sú ďalšími kľúčovými hráčmi modifikácie histónov. Histónové proteíny, okolo ktorých je tesne zbalená DNA, tvoria nukleozóm. Na ich koncoch sa nachádza množstvo miest pre modifikácie, ako sú acetylácia, metylácia, fosforylácia, SUMOylácia, ubiquitinácia alebo ATP ribozylácia (8). Kombinácia histónových modifikácií pod-

mieňuje interakciu DNA a histónu, ktorá vedie buď k uvoľneniu chromatinovej štruktúry, umožňujúcej aktívny prepis génu, alebo, naopak, ku kompaktnnej chromatinovej štruktúre spojenjej s potlačením transkripcie. Počas tumorigenézy prechádzajú bunky globálnymi zmenami v modifikáciách histónov ako aj v distribúcii histónových variantov, ktoré prispievajú k aberantnej expresii génov (9).

V posledných rokoch došlo k významnému nárastu množstva poznatkov o epigenetických zmenách v nádoroch a o ich možnom využití v klinickej praxi ako nádorové biomarkery. Napríklad hodnotenie metylácie DNA by mohlo byť použité pri včasnej diagnostike nádorov, v určovaní prognózy a odpovede pacientov na liečbu. Napriek rozsiahlemu výskumu v tejto oblasti len malé množstvo výsledkov preniklo do klinickej praxe. Pri karcinóme prostaty k histopatológii, ktorá býva často falošne negatívna, je možné uskutočniť doplnkový diagnostický test, pri ktorom sa zisťuje metylácia génov *GSTP1* a *APC* na potvrdenie prítomnosti onkologického ochorenia. Ďalším z mála je testovanie prítomnosti metylácie *MLH1* génu ako doplnkový diagnostický test pri dedičnej nepolypóznej rakovine hrubého čreva (10). Testovanie metylácie promotora génu *MGMT* je klinicky využívané u pacientov s glioblastómom mozgu, ako dôležitý prognostický a prediktívny biomarker na predpovedanie efektivity chemoterapie a dĺžky prežívania.

Nádorovo špecifické epigenetické zmeny je možné detegovať nielen vo vzorkách tkanív nádorov, ale aj vo voľnej DNA v krvnej plazme a iných telesných tekutinách. Majú významný potenciál byť využité ako diagnostické alebo prognostické biomarkery pre ich nízku invazívnosť a možnosť sledovať priebeh epigenetických zmien aj po odstránení primárneho nádoru. V praxi sa však stretávame s mnohými metodologickými problémami, predovšetkým nízkou senzitivitou a špecifitou týchto vyšetrení. Metylácia promotora tumor-supresorového génu *SEPT9* vo voľnej DNA z krvnej plazmy pri kolorektálnom karcinóme je jediným klinicky dostupným skriningovým biomarkerom v USA a v Európe, ktorý vykazuje 90 % senzitivitu a 88 % špecifitu (11).

Predmetom nášho výskumu je identifikácia nových epigenetických markerov, ktoré by sa mohli využívať na skoré odhalenie onkologického ochorenia, presnejšiu diagnostiku, stanovenie prognózy a monitorovanie účinnosti liečby. Zameriavame sa na detekciu nádorovo špecifických epigenetických zmien, a to nielen

v nádorových tkanivách, ale aj v periférnej krvi. Jedným z našich cieľov je objasnenie príčin vzniku metastatického ochorenia prostredníctvom štúdia génov regulujúcich procesy metastázovania a invazivity (12, 13). Snažíme sa identifikovať mechanizmy, prostredníctvom ktorých nádorové bunky z primárneho nádoru uskutočnia jednotlivé kroky metastatickej kaskády. Pokúšame sa odlišiť epigenetické zmeny typické pre metastázovanie hematogénnou cestou, analýzou cirkulujúcich nádorových buniek a metastázovanie prostredníctvom lymfatických ciev, štúdiom metastáz z lymfatických uzlín. Reverzibilný charakter metylácie DNA a histónových modifikácií nám dáva šancu na aplikáciu epigenetickej terapie, ktorá sa už začína využívať v praxi pre rôzne typy onkologických ochorení (Vidaza, Dacogen, Decitabin, Zebularin, Vorinostat a Istdox). Pochopenie epigenetických procesov a identifikácia nových terapeutických cieľov umožnia rozvoj personalizovanej medicíny a efektívnejší transfer výsledkov základného výskumu do klinickej praxe.

Exozómová miRNA – málo známy regulátor medzibunkovej komunikácie

miRNA zohrávajú významnú úlohu v posttranskripčnej regulácii génovej expresie (14). Bolo publikovaných viac ako 800 cieľových sekvencií pre miRNA a predpokladá sa, že mnoho ďalších bude ešte objavených. Kým v normálnych bunkách je expresia miRNA prísne regulovaná, pre tumorigenézu je typická deregulácia ich expresie, čo môže ovplyvniť riziko vzniku rakoviny, účinnosť liečby, a teda prognózu pacientov. Funkčné prepojenie miRNA s karcinogénozou, ich veľkosť a potenciál vplývať súčasne na množstvo génov ich robí jedinečnými kandidátmi na epigenetické biomarkery. miRNA môžu byť sekretované z bunky viazané na lipoproteíny alebo v extracelulárnych vezikulách, ako sú exozómy.

Exozómy sú bunkami produkované vezikuly s veľkosťou 40 – 100 nm, ktoré sa nachádzajú prakticky vo všetkých telesných tekutinách. Ich náklad (RNA a miRNA), kompozícia membrány, ako aj pohyblivosť v cievnom systéme im umožňujú byť potentnými medzibunkovými komunikátormi nielen v mikroprostredí, ale aj so vzdialenými bunkami, ako bolo ukázané pri T bunkovej aktivácii pomocou exozómov z dendritových buniek (15). Sú dôkazy, že nádorové exozómy ovplyvňujú angiogénu a formovanie premetastatickej niky. Existujú experimentálne dôkazy, že formovanie mikroprostredia

v miestach budúcich vzdialených metastáz sú dôsledkom účinku exozómov produkovaných nádorovými bunkami (TEX – tumor exosomes) (16). Exozómy sa viažu na cieľové bunky pomocou adhezívnych molekúl, ktoré zahŕňajú tetraspanínové komplexy (tetraspanin – proteín so štyrmi transmembránovými úsekmi). miRNA v exozómov pohlenených bunkou je plne funkčná, preto môže po prestupe do cytoplazmy ovplyvniť stabilitu aktuálne syntetizovaných miRNA hostiteľskej bunky. Napríklad miR-150, ktorá sa nachádza v exozómov produkovaných bunkami akútnej myeloblastovej leukémie, po vstupe týchto exozómov do hematopoetických prekursorov zníži hladinu expresie chemokínového receptora 4 (CXCR4) a zabráni ich migrácii v niku (17). Nastáva tak situácia, že napriek absencii mutácie v určitom géne a aktívnemu prepisu genetickej informácie do miRNA nie je v bunke prítomný produkt – proteín, ktorý je kódovaný daným génom. Exozómy malígnych buniek ovplyvňujú imunitný systém napríklad stimuláciou apoptózy aktivovaných cytotoxických lymfocytov, znížením vyzrievania dendritových buniek alebo indukciou myeloidných supresorových buniek a T regulačných buniek (18). Ale aj opačne, exozómy stromálnych buniek môžu ovplyvniť rast nádorových buniek. Stróma zdravých ľudí produkuje exozómy obsahujúce tumor supresorovú miRNA (miR-15), ktorá zabraňuje translácii onkogénov v myelómových bunkách, avšak jej hladina v exozómov strómy pacientov s mnohopočetným myelómom je nízka, čo pomáha prežívaniu malígnych buniek (19).

Ovariálne nádory patria medzi najzávažnejšie malignity u žien a dodnes chýbajú biomarkery na skorú detekciu. Takmer 70 % prípadov je diagnostikovaných v pokročilých štádiách ochorenia a iba štvrtina dosahuje 5-ročné prežívania. V prípade včasného záchytu je však prežívania vyše 90 %. Preto zlepšenie diagnostiky založenej na analýze obsahu exozómov periférnej krvi – „tekutá biopsia“ má veľký potenciál, berúc do úvahy pomerne dobrú stabilitu exozómov a schopnosť odlišiť malígne a nemalígne stavy (20, 21). Navyše, bola popísaná kombinácia miRNA, ktorá je asociovaná s rezistenciou ovariálneho karcinómu na cisplatinu a paklitaxel, keď množstvo let-7e bolo zvýšené a miR-125b znížené pri rezistencii na paklitaxel a naopak, znížené a zvýšené pri rezistencii na cisplatinu. Znížená expresia miR-30c, miR-130a a miR-335 bola pri oboch typoch rezistencie (22). Pomerne sľubným prístupom je využitie exozómov na imunizáciu, lebo TEX nesú nádorové antigény, môžu ich prezentovať T bunkám a navodiť pro-

tinádorový cytotoxický účinok (23). Uzatvára sa tak široký okruh poznatkov o exozómoch vychádzajúcich z poznávania molekulárnych dejov ich vzniku, sekrécie, interakcie a analýzy ich obsahu na využitie v diagnostike až po ciele modulovanie imunitného systému na aplikovanie v liečbe.

Nanomedicína v liečbe onkologických ochorení

Pre klinickú prax je dôležité nielen pochopenie patofyziologických mechanizmov pri oprave poškodení DNA, mechanizmov epigenetickej regulácie bunkových procesov, ktoré môžu byť novými terapeutickými cieľmi, ale kľúčovým je určite aj technologický pokrok vedúci k zlepšenému transportu liečiv a efektívnemu cielenému ovplyvňovaniu v mieste nádoru. Intenzívny biomedicínsky výskum sa zameriava najmä na vývoj 1. nanovektorov/nosičov na cielelý transport liečiv/génov, 2. mediátorov tepla pri hyper-/fototermálnej terapii alebo 3. kontrastných činidiel pre zobrazovacie techniky. V súčasnosti sa v klinickej praxi využíva viac ako 40 produktov na báze nanomateriálov (tzv. „nanoliečiv“) a mnoho ďalších je v rôznych fázach (pred)klinických testov (24). Prvým liečivom schváleným FDA v USA a uvedeným na trh v roku 1995 bol Doxil® určený na liečbu Kaposiho sarkómu. V Európe bol schválený v roku 1997 s názvom Caelyx®. Toto nanoliečivo významnou mierou zlepšilo farmakokinetiku a biodistribúciu doxorubicínu a výraznou mierou znížilo riziko kardiotoxicity v porovnaní s voľným liečivom (25). V klinickej praxi sa už taktiež dlhodobo využívajú viaceré kontrastné činidlá na báze oxidov železa, ako sú Feridex, Endorem, Gastromark, Sinerem. Uplatnenie nanotechnológií umožňuje nielen zlepšiť rozlišovacie schopnosti štandardných diagnostických postupov (MRI, PET), ale aj rozšíriť spôsoby monitorovania lézií, zavádzaním nových technológií (napríklad NIR tomografia, fotoakustická tomografia a iné).

Dominantná časť intenzívneho výskumu v oblasti nanomedicíny je zameraná na liečbu onkologických ochorení. Prvá generácia nanoliečiv využívala na cielelý transport liečiva EPR (enhanced permeability and retention) efekt, t. j. k akumulácii nanoliečiva v nádore dochádza v dôsledku chybnej *de novo* angiogenézy a nefunkčnosti lymfatického systému (pasívne zacielenie). V solídnom nádore sa týmto spôsobom akumuluje približne 10 % z podanej dávky pri molekulách väčších ako 45 kDa, kým menšie molekuly sa vracajú späť do krvného obehu. Vývoj novej generácie nanoliečiv sa zameriava

na aktívne zacielenie, t. j. aby sa liečivo selektívne akumulovalo a uvoľňovalo v nádorových bunkách alebo v jej subcelulárnych štruktúrach, čím sa zabráni predčasnému metabolizmu liečiva a znížia sa jeho vedľajšie účinky. Vďaka pokrokom v oblasti -omics technológií (genomika, proteomika, metabolomika a pod.) nanoliečivá novej generácie majú na svojom povrchu naviazané špecifické molekuly (aptaméry, peptidy, ligandy atď.) ktoré sa selektívne viažu na nádorové bunky a pomáhajú ich internalizácii (26). V súčasnosti je do predklinických testov zaradených okolo 13 perspektívnych nanoliečiv novej generácie označovaných ako ligand-targeted nanoparticles (LTN; nanočastice nesúce špecifický ligand pre nádorovú bunku). Hoci predbežné výsledky z týchto testov neukázali jednoznačne rozdiely v množstve akumulovaných nanoliečiv novej generácie v nádoroch v porovnaní s prvou generáciou nanoliečiv označovaných ako ligand-lacking nanoparticles (LLN; nanočastice bez špecifického ligandu pre nádorovú bunku), LTN nanoliečivá sú zadržované v nádore dlhšie v porovnaní s LLN nanoliečivami, čím sa zvyšuje ich terapeutický efekt (27).

Atraktívnou oblasťou výskumu je vývoj multifunkčných nanoliečiv, ktoré budú nielen terapeutikum (prípadne viac liečiv), ale aj zobrazovaciu molekulu, ktorá umožní dlhodobo sledovať účinnosť zvolenej terapie a včas odhaliť progresiu ochorenia. Vývoj multifunkčných nanoliečiv je základom teranostickej nanomedicíny, ktorá významnou mierou prispieje k rozvoju personalizovanej liečby onkologických pacientov. Základom pre vývoj multifunkčných nanoliečiv sú anorganické nanomateriály (ANMs), ako sú oxidy železa alebo zlato. Na rozdiel od tradičných nanomateriálov (lipozómy, dendriméry alebo polymérne častice), ANMs nadobúdajú cielelou úpravou veľkosti, tvaru a povrchu unikátne fyzikálno-chemické vlastnosti (optické, magnetické), ktoré sa nedajú dosiahnuť pri osvedčených nosičoch liečiv. ANMs majú širokú škálu využitia nielen v diagnostike (zobrazovacie techniky), ale aj v lokálnej (mediátory tepla) a cielenej (nanovektory) terapii onkologických ochorení (28).

Nanočastice oxidu železa (magnetit – MNPs) sa okrem magnetickej rezonancie využívajú ako suplement na liečbu anémie (Venofer, Ferrlecit, Cosmofer), sú perspektívne mediátory tepla pri hypertermálnej terapii ako aj nosiče liečiv/génov pri cielenej terapii. Ich superparamagnetické vlastnosti navyše zvyšujú efektívnosť cieleného transportu liečiva a jeho udržanie v cieľovom tkanive/orgáne prostredníctvom externého

magnetického poľa. Nanočastice zlata okrem využitia v zobrazovacích technikách rozšírili spektrum fototermálnych látok. V súčasnosti existuje niekoľko potenciálnych nanoliečiv na báze zlata, ktoré sú zaradené do klinických testov (Auroshell, Aurimmune, Auritol).

Využitie nanočastíc v diagnostike a liečbe onkologických ochorení predstavuje nepochybne veľké benefity. Výskum mechanizmov transportu nanočastíc cez cytoplazmatickú membránu, charakterizácia faktorov, ktoré tento proces ovplyvňujú, je nevyhnutný pre vývoj vhodných multifunkčných nanoliečiv novej generácie. Neoddeliteľnou súčasťou tohto výskumu je taktiež posúdenie bezpečnosti nanomateriálov pre ľudský organizmus ako aj detailné skúmanie a pochopenie zákonitostí vzájomných nano:bio (nanomateriál:bunka) interakcií, čomu sa venujeme na našom pracovisku.

Záver

Naše dnešné poznatky o onkologickom ochorení prinášajú mnohé nové možnosti pre klinickú prax. Je to aj vďaka rýchlemu napredovaniu v oblasti celogenómových prístupov a ich využitií v medicíne. Dnes je už zrejme, že nádorová taxonómia založená na klinických a histopatologických vlastnostiach primárneho nádoru bude musieť byť pre koncept personalizovanej liečby doplnená o molekulárne a funkčné biomarkery. Tieto prispievajú nielen k rozšíreniu palety diagnostických možností, ale aj k efektívnejšiemu kombinovaniu terapie u konkrétneho pacienta, čo umožní vhodnejšiu a cielenejšiu liečbu jeho onkologického ochorenia. K spomenutému nepochybne prispieje: 1. identifikácia molekulárnych a funkčných biomarkerov spomedzi faktorov zodpovedných za odpoveď bunky na poškodenie DNA a jeho opravu, 2. pochopenie epigenetických procesov majúcich za cieľ identifikáciu nových terapeutických cieľov, 3. identifikácia miRNA prítomných v exozómoch v periférnej krvi a pochopenie ich vzťahu k vzniku a priebehu onkologického ochorenia a 4. dizajn nových nanoliečiv na báze nanočastíc.

Podakovanie

Autori vyjadrujú vďaka všetkým kolegom za cenné rady, pripomienky a konštruktívnu spoluprácu pri príprave rukopisu a experimentálnej práce citovanej v rukopise. Práca a experimenty boli podporené grantmi Agentúry pre podporu výskumu a vývoja (APVV-0076-10) a Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR a SAV (VEGA 2/0056/14, 2/0143/13, 2/0169/14 a 2/0120/13), finančným príspevkom Nadácie Výskum rakoviny

RFL2009, RFL2010 a projektmi OP VaV financovanými zo zdrojov ERDF - ITMS 26240220071, ITMS – 26240220087 a ITMS 26240220074 (výzva OPVaV-2011/4.2/07-SORO).

Literatúra

1. McDermott U, Downing JR, Stratton MR. Genomics and the continuum of cancer care. *Engl J Med*. 2011;364:340–350.
2. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434:917–921.
3. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:801–817.
4. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481:287–294.
5. Stephens PJ, McBride D J, Lin, et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*. 2009;462:1005–1010.
6. Wang Y, Taniguchi T. MicroRNAs and DNA damage response: implications for cancer therapy. *Cell Cycle*. 2013;12:32–42.
7. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31(1):27–36.
8. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293(5532):1074–1080.
9. Jones PA, Baylin SB. The Epigenomics of Cancer. *Cell*. 2007;128(4):683–692.
10. Alemyehu A, Šebová K, Fridrichová I. Redundant DNA methylation in colorectal cancers of Lynch-syndrome patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(10):906–14.
11. Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(10):1707–1721.
12. Kajabová V, Smolková B, Zmetaková I. RASSF1A promoter methylation levels positively correlate with oestrogen receptor expression in breast cancer patients. *Transl Oncol* 2013;6(3):297–304.
13. Zmetaková I, Danihel L, Smolková B. Evaluation of protein expression and DNA methylation profiles detected by pyrosequencing in invasive breast cancer. *Neoplasma*. 2013;60(6):635–46.
14. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):389–402.
15. Hao S, Bai O, Yuan J, et al. Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8+ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes. *Cell Mol Immunol*. 2006;3(3):205–11.
16. Suetsugu A, Honma K, Saji S, et al. Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(3):383–90.
17. Huan J, Hornick NI, Shurtleff MJ, et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res*. 2013;73(2):918–29.
18. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol*. 2011;33(5):441–54.
19. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1542–55.
20. Liang B, Peng P, Chen S, et al. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes. *J Proteomics*. 2013;80:171–82.
21. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(1):13–21.
22. Sorrentino A, Liu CG, Addario A, et al. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2008;111(3):478–86.
23. Cho JA, Yeo DJ, Son HY, et al. Exosomes: a new delivery system for tumor antigens in cancer immunotherapy. *Int J Cancer*. 2005;114(4):613–22.
24. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, et al. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomed Nanotech Biol Med*. 2019;1–14.
25. Ryan S M, Brayden D J. Progress in the delivery of nanoparticle constructs: towards clinical translation. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;18:120–128.
26. Saenz del Burgo L, Pedraz JL, Orive G. Advanced nanovehicles for cancer management. *Drug Discov Today*. 2014;19(10):1659–1670.
27. Van der Meel R, Vehmeijer LJC, Kok RJ, et al. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: Current status. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65:1284–1298.
28. Muthu MS, Leong DT, Mei L, et al. Nanotheranostics – Application and Further Development of Nanomedicine Strategies for Advanced Theranostics. *Theranostics*. 2014;4:660–677.

Mgr. Miroslav Chovanec, PhD.

Oddelenie genetiky
Ústav experimentálnej onkológie SAV
Vlárska 7, 833 91 Bratislava
miroslav.chovanec@savba.sk
