

ODPORNOST GLIOBLASTOMA NA RADIOTERAPIJO: VPLIV RAKAVIH MATIČNIH CELIC IN MIKROOLJA TUMORJA

Barbara Breznik¹, Bernarda Majc^{1,2}, Anamarija Habič^{1,2}, Urška Ušeničnik¹, Andrej Porčnik³, Roman Bošnjak³, Jernej Mlakar⁴, Marija Skoblar Vidmar⁵, Tanja Jesenko⁵, Maja Čemažar⁵, Tamara Lah Turnšek¹, Metka Novak¹

¹ *Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija*

³ *Klinični oddelek za nevrokirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁴ *Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁵ *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: barbara.breznik@nib.si

Izvleček

Glioblastom je najpogostejši možganski tumor pri odraslih z zelo slabo prognozo preživetja bolnikov. Ta je posledica odpornosti glioblastoma na standardno zdravljenje, ki vključuje radioterapijo in kemoterapijo. Z namenom načrtovanja učinkovitejših pristopov zdravljenja preučujemo biološke mehanizme odpornosti glioblastoma na radioterapijo s poudarkom na mikrookolju tumorja in rakavih matičnih celicah. V predkliničnih raziskavah uporabljamo napredne in personalizirane celične modele, ki posnemajo mikrookolje tumorja v bolnikih in z večjo natančnostjo napovedo odziv bolnika na zdravljenje. Hkrati so takšni modeli pomembni za testiranje novih pristopov za zdravljenje kot je imunoterapija.

Uvod

Glioblastom je najpogostejši in najagresivnejši primarni možganski tumor pri odraslih. Kljub napredku v onkološkem zdravljenju večine rakov v zadnjih 16 letih ni prišlo do bistvenih izboljšav pri zdravljenju glioblastoma in se pričakovana življenjska doba bolnikov v tem obdobju ni bistveno spremenila. Radioterapija skupaj s kirurško odstranitvijo tumorja in kemoterapijo predstavlja standardno zdravljenje glioblastoma (1).

Glavne izzive pri zdravljenju glioblastoma in načrtovanju novih pristopov zdravljenja predstavljajo odpornost na kemoterapijo in radioterapijo ter heterogenost glioblastoma. Glioblastom je namreč zelo heterogen tumor, tako med različnimi bolniki kot znotraj posameznega tumorja. Glioblastome klasificiramo v različne podtipе glede na molekularni profil. Ti podtipi se poleg aktivacije različnih signalnih poti med seboj razlikujejo v preživetju bolnikov in njihovemu odzivu na terapijo (1-3). Mikrookolje glioblastoma je sestavljeno iz rakavih matičnih in diferenciranih rakavih celic ter nerakavih imunskih in drugih stromalnih celic kot so makrofagi, mikroglia, limfociti,

endotelijske celice in mezenhimske matične celice. Preko medcelične komunikacije in infiltracije imunskih celic je mikrookolje ključen dejavnik pri odzivu tumorja na terapijo (3).

V raziskavah patobiologije glioblastoma na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) uporabljamo tumorske vzorce bolnikov z glioblastomom in napredne tridimenzionalne (3D) eksperimentalne tumorske modele, s katerimi posnemamo heterogenost in mikrookolje tumorjev v bolnikih. S pomočjo modelov preučujemo učinke radioterapije na rakave celice kot tudi učinke radioterapije v kombinaciji z drugimi načini zdravljenja kot je kemoterapija na mikrookolje glioblastoma.

Rakave matične celice so odporne na radioterapijo

Rakave matične celice so populacija rakavih celic, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in iniciacije tumorja. V tej populaciji celic se aktivirajo signalne poti, ki so značilne za zdrave matične celice in razvoj, ter izražajo biološke označevalce kot so CD133, SOX2, OLIG2, nestin, CD44 in CD9, ki omogočajo izolacijo in detekcijo teh celic v tumorskih tkivih. V glioblastomu je dokazano, da so rakave matične celice odporne na radioterapijo, saj imajo aktivirane različne signalne poti Hedgehog, Wnt, TGF- β , mezenhimski podtip ter odzive in popravljalne mehanizme poškodb DNA, ki omogočajo preživetje celic po obsevanju (4). V naši raziskavi smo s testom klonogenosti *in vitro* dokazali, da so glioblastomske matične celice odpornejše na obsevanjekot diferencirane glioblastomske celice. Delež preživelih celic po enkratni dozi sevanja 10 Gy je pri glioblastomskih matičnih celicah 0,3, medtem ko diferencirane glioblastomske celice niso preživele po enkratni dozi sevanja 8 Gy ali več. Enkratna nizka doza obsevanja 2 Gy je povzročila pospešeno invazijo glioblastomskih matičnih celic skozi Matrigel v Boydenovih kamricah.

Mikrookolje tumorjev štiti rakave celice pred terapijo

Fenotip in lastnosti rakavih matičnih celic so odvisne od mikrookolja, v katerem se te celice nahajajo. Pokazali smo, da se rakave matične celice v glioblastomu nahajajo v tkivnih nišah ob tumorskem žilju, kjer medsebojna celična interakcija ustvarja zaščitno mikrookolje, ki štiti rakave matične celice pred učinki terapije in imunskim odzivom. Biološke označevalce rakavih matičnih celic smo detektirali ob tumorskem žilju, kjer so prisotne endotelijske celice, gladkomišične celice in mezenhimske matične celice (5). Razumevanje niš je ključnega pomena za razvoj novih terapevtikov usmerjenih proti rakavim matičnim celicam, vendar so učinki stromalnih celic, kot so mezenhimske matične celice, na rakave matične celice slabo raziskani. Mezenhimske matične celice so odrasle ne-hematopoetske multipotentne celice, ki se nahajajo v različnih tkivih in jih telo uporablja za regeneracijo ob poškodbah, infiltrirajo pa tudi v glioblastom. Poleg tega se uporabljajo kot celični vektorji za zdravljenje različnih bolezni (6).

Postavili smo 3D model kokultur rakavih matičnih celic in mezenhimskih matičnih celic, da bi vzpostavili nišo rakavih matičnih celic *in vitro* in na takšnem modelu raziskali vpliv medsebojnih celičnih interakcij na odziv na radioterapijo.

Ugotovili smo, da se je po obsevanju (1x 6 Gy) ob prisotnosti mezenhimskih matičnih celic več rakavih matičnih celic nahajalo v fazah G₀/G₁ in S celičnega cikla in da je manjši delež rakavih matičnih celic proliferiral (Ki67+ celice) v primerjavi z obsevano

monokulturo rakavih matičnih celic. V raziskavi smo odkrili, da rakave matične celice, obsevane z nizko dozo 2 Gy, pospešeno invadirajo k mezenhimskim matičnim celicam v primerjavi z neobsevanimi celicami. Ta proces poteka pod vplivom kemokinske signalne poti CXCL12/CXCR4. Blokiranje te signale poti z antagonistom kemokinskega receptorja CXCR4 pleriksatorjem je namreč povzročilo inhibicijo invazije obsevanih rakavih matičnih celic k mezenhimskim matičnim celicam. V *in vitro* celičnih modelih smo ugotovili, da mezenhimske matične celice spremenijo odziv rakavih celic na radioterapijo.

Organoidi kot tumorski model za preučevanje odpornosti glioblastoma na terapijo in testiranje novih pristopov za zdravljenje

Na NIB-u smo skupaj s partnerji UKC Ljubljana, Onkološkim inštitutom Ljubljana, Medicinsko fakulteto UL in Inštitutom za patologijo, UL, vzpostavili regionalno raziskovalno biobanko gliomov, v sklopu katere zbiramo tumorski material in klinične podatke bolnikov z gliomi. Poleg tumorskih biopsij in izoliranih rakavih (matičnih) celic iz tumorjev bolnikov imamo vzpostavljene organoide glioblastoma. Organoidi predstavljajo napredne in personalizirane 3D tumorske modele, ki vključujejo tumorsko mikrookolje in molekularni profil tumorja bolnika, iz katerega so izolirani (7,8). Organoide vzpostavimo iz tumorskih biopsij, jih molekularno okarakteriziramo ter uporabimo v nadaljnjih eksperimentih. Na organoidih preučujemo odziv ter molekularne mehanizme odpornosti glioblastoma na radio- in kemoterapijo. Ugotovili smo, da enkratna doza obsevanja (10 Gy) v kombinaciji s kemoterapijo ne povzroči sprememb v viabilnosti ter invaziji organoidov glioblastoma. Smo pa pokazali, da pride v tretiranih organoidih do povečanega izražanja genov, ki kodirajo proteine, udeležene v regulaciji celičnega cikla in stabilizaciji signalne poti p53. Organoidi glioblastoma posnemajo ključne značilnosti ter dinamično sestavo mikrookolja tumorjev, kar omogoča raziskave odzivnosti in odpornosti glioblastoma na terapijo.

Zaključek

Glioblastom je odporen na radioterapijo, zato je potrebno raziskati biološke mehanizme odpornosti za načrtovanje učinkovitejših pristopov zdravljenja. Na radioterapijo odporne rakave matične celice in njihovo mikrookolje, ki jih ščiti pred terapijo, so pomemben dejavnik pri napredovanju glioblastoma. V raziskavah se poslužujemo naprednih tumorskih modelov, ki vključujejo mikrookolje in heterogenost tumorjev, s katerimi lahko natančneje ocenimo odziv na zdravljenje pri bolnikih.

Zahvala

Raziskave potekajo ob finančni podpori Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (P1-0245, P3-0003, J3-2526, Z3-1870, MR Bernarda Majc in Anamarija Habič) in v sklopu projekta Interreg Italija-Slovenija TRANS-GLIOMA.

Literatura

1. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;(3):170-186. doi: 10.1038/s41571-020-00447-z.

2. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
3. Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:262-273. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.10.010.
4. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60. doi: 10.1038/nature05236.
5. Hira VVV, Breznik B, Vittori M, Loncq de Jong A, Mlakar J, Oostra RJ, et al. Similarities between stem cell niches in glioblastoma and bone marrow: rays of hope for novel treatment strategies. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(1):33-57. doi: 10.1369/0022155419878416.
6. Breznik B, Motaln H, Vittori M, Rotter A, Lah Turnšek T. Mesenchymal stem cells differentially affect the invasion of distinct glioblastoma cell lines. *Oncotarget*. 2017;8(15):25482-25499. doi: 10.18632/oncotarget.16041.
7. Jacob F, Ming GL, Song H. Generation and biobanking of patient-derived glioblastoma organoids and their application in CAR T cell testing. *Nat Protoc*. 2020;15(12):4000-4033. doi: 10.1038/s41596-020-0402-9.
8. Majc B, Novak M, Kopitar-Jerala N, Jewett A, Breznik B. Immunotherapy of glioblastoma: current strategies and challenges in tumor model development. *Cells*. 2021;10(2):265. doi: 10.3390/cells10020265.

