

MOLEKULARNE IN TRANSKRIPCijske SPREMEMBE TUMORSKIH ENDOTELIJSKIH CELIC PO OBSEVANJU PRI MIŠIH

Iva Šantek^{1,2}, Tim Božič¹, Gregor Serša^{1,3}, Boštjan Markelc^{1,3}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: isantek@onko-i.si

Rak debelega črevesa in danke je drugi najpogostejši rak pri ženskah in tretji pri moških. Običajni načini zdravljenja raka debelega črevesa so kirurgija, kemoterapija in radioterapija, ki pa so pogosto neučinkoviti. Znano je, da radioterapija ne vpliva le na tumorske celice, temveč tudi na tumorsko mikrookolje, vključno z endotelijskimi celicami (EC), ki se lahko glede na prejeto dozo aktivirajo ali poškodujejo (1). Po aktivaciji z odmerki, višjimi od 2 Gy, se EC spremenijo in preidejo v pro-vnetno stanje. Pomembno je, da EC v pro-vnetnem stanju povečajo izražanje kemokinov, citokinov in adhezijskih molekul, ki povečajo infiltracijo imunskih celic v tumorje, s tem pa okrepijo imunski odziv in povzročijo zmanjšanje tumorja. Nasprotno pa so pri obsevanju (engl. irradiation, IR) z odmerki, višjimi od 15 Gy, poročali o smrti tumorskih EC (2,3). Zato smo želeli *in vitro* ter *in vivo* oceniti učinek različnih odmerkov IR na transkripcijski ravni, s poudarkom na aktivaciji EC in infiltraciji imunskih celic. Najprej smo obsevali humane endotelijske linije EA.hy926 in Hulec5a ter mišje endotelijske linije bEnd.3, 2H11 in SVEC-4-10 z enkratnim odmerkom 0, 2, 4, 6, 8 in 10 Gy. Rezultati so pokazali, da so vsi uporabljeni odmerki IR zmanjšali proliferacijo EC in povečali odstotek mrtvih celic, pri čemer so imeli večji odmerki večji učinek. Preživele EC pa so bile še vedno sposobne proliferacije. Da bi ugotovili učinek IR na ravni *in vivo*, smo spremljali rast podkožno nasajenih mišjih tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa MC38 in CT26 v miših C57BL/6 ali Balb/c, po enkratnem obsevanju z dozo 15 Gy ali frakcionirano dozo 5 x 5 Gy. Obe shemi IR sta upočasnili rast tumorjev v primerjavi s kontrolnimi, neobsevanimi tumorji. Nazadnje smo želeli obravnavati učinek IR z enkratnim odmerkom 15 Gy na tumorske EC na transkripcijski ravni, s poudarkom na genih in signalnih poteh, povezanih z aktivacijo endotelija in imunskim odzivom. Da bi odgovorili na to vprašanje, smo naredili RNAseq analizo tumorskih EC, izoliranih iz obsevanih in kontrolnih tumorjev MC38. Z uporabo programske opreme R in diferencialne analize izražanja genov smo v obsevanih vzorcih odkrili 533 genov z značilno povečanim izražanjem (P vrednost < 0,05) in 236 genov z značilno zmanjšanim izražanjem. Naši rezultati kažejo, da IR neposredno vpliva na globalno izražanje genov v tumorskih EC pri miših. Nato smo se osredotočili na gene, povezane z aktivacijo EC in imunskim odzivom. Analiza diferencialnega izražanja genov je pokazala bistveno večje izražanje genov Vcam-1, Vwf, Cd47, Il6, Irf7 in drugih genov pomembnih pri aktivaciji EC. Nato smo z analizo obogatitve genskih nizov

opredelili odvisnosti biološko pomembnih signalnih poti od IR. Med 145 signalnimi potmi, pomembno obogatenimi v obsevanih vzorcih, so bile poti, kot so angiogeneza, preoblikovanje zunajceličnega matriksa, signalizacija interferonov in interlevkinov, ki so vse povezane z aktivacijo EC in imunskim odzivom. V naši raziskavi smo potrdili, da IR zmanjšuje proliferacijo in preživetje EC. Poleg tega enkratno obsevanje tumorjev z dozo 15 Gy spremeni izražanje genov, povezanih z aktivacijo EC, te spremembe pa vplivajo na signalne poti, ki lahko podpirajo aktivacijo EC in okrepijo protitumorski imunski odziv.

Literatura

1. Guipaud O, Jaillet C, Clément-Colmou K, François A, Milliat F. The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy. *Br J Radiol.* 2018;91(1089):20170762.
2. Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Kułach N. Tumor microenvironment as a “game changer” in cancer radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3212.
3. Kozin S V., Duda DG, Munn LL, Jain RK. Neovascularization after irradiation: What is the source of newly formed vessels in recurring tumors? *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(12):899-905.

P17