

Uticaj ekstracelularnih vezikula poreklom iz trofoblastnih ćelija na modulaciju apoptoze u kulturi ćelija karcinoma jajnika tretiranih cisplatinom

UVOD

Karcinom jajnika je heterogeni skup neoplazmi raznovrsne histopatološke građe, gde dominantni tip predstavlja epitelni maligni tumor jajnika koji čini oko 80-90% svih slučajeva (1). Ovaj ginekološki malignitet ima visoku stopu mortaliteta, uzrokovanu kasnom dijagnostikom u odmaklim stadijumima bolesti i čestom pojavom relapsa nakon inicijalne terapije. Standardni terapijski pristup kod većine pacijenata sa naprednim karcinomom jajnika uključuje citoreduktivnu hirurgiju i sistemsku primenu hemioterapijskog tretmana cisplatinom ili karboplatinom u kombinaciji sa taksanom, pri čemu su inicijalne stope odgovora visoke (70–80%), ali većina pacijenata kasnije razvije relaps koji je često povezan sa sticanjem rezistencije na platinske lekove (1,2).

Pojava rezistencije na cisplatinu kod karcinoma jajnika je složena i višestruka, i obuhvata promene u transportu leka, povećanu detoksifikaciju, izmene u mehanizmima popravke oštećenja DNK, izbegavanje apoptoze i promene u apoptotskim signalnim putevima, kao i metaboličke adaptacije ćelija i promene u redoks homeostazi (1,2). Trenutne strategije koje kombinuju cisplatinu sa ciljanim terapijama imaju ograničen uticaj na dugoročno preživljavanje. Uprkos značajnom napretku u razumevanju pojedinih mehanizama rezistencije na platinu, neophodna su dalja istraživanja radi sagledavanja njihove međusobne povezanosti i razvoja novih terapijskih pristupa za prevazilaženje rezistentnog fenotipa.

Tokom razvoja i progresije maligniteta ispoljavaju se izvesne karakteristike malignih ćelija koje su univerzalne za sve tipove karcinoma, poput metaboličke adaptacije, zaštite od reakcije imunskog sistema domaćina, indukcije angiogeneze, kao i sposobnosti migracije ćelija. U pogledu ovih osobina, maligno transformisane ćelije i normalne ćelije trofoblasta čoveka pokazuju mnoge sličnosti. Naime, trofoblast kao jedna od primarnih struktura placente razvija se tokom rane trudnoće u hipoksičnim uslovima tokom usađivanja embriona u endometrijum. Tada dolazi do intenzivne proliferacije i invazije ćelija ekstravilusnog trofoblasta (EVT) duž gradijenta kiseonika prema uterinim arterijama, pri čemu postoji značajna sličnost sa diseminacijom malignih ćelija tokom njihovog širenja kroz tkiva domaćina. Pojedini molekularni mehanizmi koji regulišu funkciju ćelija trofoblasta tokom formiranja placente, takođe učestvuju i u širenju kancerskih ćelija tokom tumorogeneze. Oba ćelijska tipa poseduju visok proliferativni potencijal, sposobnost migracije i invazije ćelija, kao i remodelovanja lokalne mikrosredine (3). Iako trofoblastne ćelije poseduju slične mehanizme opstanka kao maligne ćelije, treba naglasiti da je osnovna razlika u tome što su ćelijski i molekularni procesi tokom modulacije funkcija trofoblasta strogo regulisani i prostorno i vremenski, dok se maligna invazija i diseminacija ćelija odvija nekontrolisano (4).

Smatra se da bi se znanja proistekla iz istraživanja regulacije ćelija trofoblasta tokom formiranja placente mogla koristiti za identifikaciju regulatornih puteva koji bi mogli imati primenu u terapiji karcinoma. Jedan od mogućih pravaca istraživanja predstavljaju molekulski putevi regulacije ćelijskog fenotipa posredovani ekstracelularnim vezikulama (5). Ekstracelularne vezikule (EV) su membranske vezikule koje ćelije otpuštaju u vanćelijski prostor i nose brojne molekule, poput proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Imaju važnu ulogu medijatora u međućelijskoj komunikaciji u brojnim fiziološkim i patološkim procesima u organizmu, zbog sposobnosti isporuke velikoj broja različitih biomolekula do ciljnih ćelija, prenoseći im informacije i utičući na promenu njihove funkcije (6). U poslednje vreme, EV se sve više istražuju kao potencijalni terapijski pristup u onkologiji zahvaljujući njihovoj stabilnosti u cirkulaciji, niskoj imunogenosti i sposobnosti ciljanja specifičnih ćelija putem površinskih molekula poput tetraspanina i integrina (6).

Sve veći broj podataka ukazuje da vezikule poreklom iz različitih ćelija mogu da interaguju sa ili da uđu u ciljne ćelije recipijente iz drugih tkiva, menjajući njihov fenotip. EV iz različitih izvora mogu modulisati ćelijske puteve odgovorne za preživljavanje, apoptozu i invaziju tumorskih ćelija (6). U kontekstu karcinoma jajnika, posebno su interesantne placentalne EV, jer tokom trudnoće imaju važnu ulogu u regulaciji adaptacije majčinog organizma putem modulacije imunskog i vaskularnog sistema, što ukazuje da sadrže bioaktivne molekule sposobne da utiču na ove ćelijske procese (7). Poznato je da broj porođaja (paritet) ima zaštitni efekat i značajno smanjuje rizik od raka jajnika, što se objašnjavalo prvenstveno hormonskim promenama u trudnoći (povećanim nivoom progesterona i smanjenim brojem ovulacija) (8). Međutim, ove hormonske promene same po sebi ne mogu u potpunosti objasniti dugotrajnu zaštitu, posebno kod tumora koji nisu direktno zavisni od estrogena. S obzirom na to da je placenta fetalni organ koji tokom trudnoće uspostavlja komunikaciju sa majčinim organizmom i oslobađa veliki broj EV već od najranijih nedelja gestacije, postavljena je hipoteza da upravo placentalne EV mogu posredovati u ovom protektivnom efektu (9,10).

Preliminarna istraživanja su ukazala da EV poreklom iz eksplanata placente utiču na ćelijski ciklus i inhibiraju proliferaciju ćelija karcinoma jajnika *in vitro*, što je pokazano na ćelijskoj liniji SKOV-3 (9). Takođe, u životinjskim modelima sa SKOV-3 tumorskim ksenograftima, pokazano je da EV izolovane iz trofoblasta prvog trimestra trudnoće, koje sadrže pro-apoptotske proteine i regulatorne mikro RNK, imaju sposobnost da inhibiraju rast tumora (11,12). Ovi nalazi ukazuju da specifičan anti-tumorski efekat placentalnih EV proizlazi iz njihovog jedinstvenog molekularnog sadržaja, kao i da signalni molekuli koje dostavljaju imaju mogućnost da ciljano utiču na fenotip tumorskih ćelija, što ih čini obećavajućim kandidatima za dalje istraživanja u kontekstu terapijske primene kod karcinoma jajnika. Osim toga, bioinformatičke analize su pokazale da pojedine mikro RNK koje su identifikovane u EV izolovanim iz uzoraka plazme trudnica kao i u EV iz placente, mogu imati ulogu u regulaciji molekulskih puteva od značaja za metastaziranje tumora kao i imunološkoj supresiji (13). Stoga, EV iz placente imaju potencijal u razvoju terapija za karcinom jajnika, a imajući u vidu da su njihovi precizni mehanizmi dejstva za

sada nerazjašnjeni, neophodna su njihova dalja eksperimentalna ispitivanja i validacija njihovih anti-tumorskih efekata.

RADNA HIPOTEZA

Tretman A2780 ćelija ovarijalnog karcinoma u kulturi sa ekstracelularnim vezikulama poreklom iz trofoblasta (tEV) moduliše osetljivost ćelija karcinoma jajnika na cisplatinu, pri čemu se potencijalni sinergistički efekat ostvaruje kroz promene u apoptotskim putevima i ekspresiji markera ćelijske invazivnosti.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati ukupni apoptotski odgovor A2780 ćelija karcinoma jajnika primenom protočne citometrije, nakon tretmana tEV, cisplatinom i njihovom kombinacijom.
2. Ispitati nivo ekspresije iRNK povezanih sa apoptozom (*BAX* i *BCL2*) i markerima invazivnosti ćelija (*ITGB1*, *ITGA5*, *TGFβ*, *MMP2*, *MMP9*) primenom RT-qPCR metode nakon tretmana tEV, cisplatinom i njihovom kombinacijom.
3. Ispitati nivo ekspresije 35 proteina povezanih sa apoptozom primenom *Proteome Array* metode nakon tretmana tEV, cisplatinom i njihovom kombinacijom.
4. Identifikovati mikro RNK iz tEV koje utiču na ekspresiju odabranih anti-apoptotskih gena putem *in silico* pristupa.
5. Ispitati uticaj tretmana tEV na nivo odabranih mikroRNK u A2780 ćelijama, kako bi se utvrdilo da li uočene promene ukazuju na prenos mikroRNK iz tEV u ćelije.

MATERIJAL I METODE

Dizajn studije

In vitro eksperimentalna studija sa kontrolisanim tretmanima i najmanje tri nezavisna (biološka) ponavljanja svakog eksperimenta.

U okviru planirane *in vitro* studije, koristiće se komercijano dostupne ćelijske linije čoveka, pa samim tim nema potrebe za posebnim odobrenjem etičke komisije u smislu kliničkih istraživanja. Etička komisija Instituta za primenu nuklearne energije-INEP dala je odobrenje za korišćenje ćelijskih linija HTR-8/SVneo i A2780 za potrebe istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, broj odobrenja: 1489-07-013/003/2025. Dobijena je i saglasnost za predmetno istraživanje Upravnice Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju MFUB (u prilogu).

Ćelijske linije

Za potrebe studije koristiće se ćelijska linija A2780, model karcinoma jajnika, koja će biti kultivisana u kompletnom DMEM/F12 medijumu sa 10% FBS i 1% antibiotika/antimikotika na 37 °C, sa 5% CO₂. Za izolovanje EV koristiće se kondicionirani medijum HTR-8/SVneo ćelija, koje predstavljaju imortalizovanu ćelijsku liniju trofoblasta čoveka poreklom iz placente prvog trimestra, a koje će biti kultivisane u kompletnom RPMI 1640 medijumu sa 10% FBS i 1% antibiotika/antimikotika na 37 °C, sa 5% CO₂.

Izolacija i karakterizacija EV

EV će biće izolovane iz kondicioniranog medijuma ćelija HTR-8/SVneo gajenim bez seruma, metodom diferencijalnog ultracentrifugiranja. Dobijene tEV biće okarakterisane pomoću analize praćenja nanočestica (*eng. Nanoparticle Tracking Analysis - NTA*) radi određivanja veličine i koncentracije vezikula, imunoobeležavanjem markera ekstracelularnih vezikula (CD9, CD63, CD81) i merenjem ukupne koncentracije proteina metodom BCA (bicinhoninska kiselina) u cilju validacije i standardizacije materijala za eksperimente. Ultrastrukturalna analiza, tj morfološka karakterizacija tEV biće urađena pomoću transmise elektronske mikroskopije (TEM).

Ispitivanje uticaja tEV na vijabilnost i citotoksičnost

Za ispitivanje uticaja tEV na vijabilnost A2780 ćelija nakon 24 i 48 sati inkubacije sa različitim koncentracijama izolovanih tEV, koristiće se MTT test za procenu citotoksičnih efekata. Ćelije A2780 će biti zasejane u ploče sa 96 bunara (2×10^4 ćelija po bunaru), a nakon određivanja optimalne koncentracije vezikula za dalje eksperimente biće podeljene u četiri eksperimentalne grupe:

1. Kontrola (netretirane ćelije)
2. Ćelije tretirane tEV
3. Ćelije tretirane samo cisplatinom (tretman dodat nakon 24 sata zbog paralelizma)
4. Ćelije prethodno kondicionirane tEV (24 sata), a zatim tretirane cisplatinom

Određivanje ukupnog apoptotskog odgovora ćelija

Za analizu ukupnog apoptotskog odgovora, A2780 ćelije će biti zasejane u ploče od 24 mesta, i tretmani će biti postavljeni prema gore opisanim uslovima. Nakon 24 sata tretmana

tEV, a zatim izlaganja cisplatini tokom 24 sata, ćelije će biti odvojene pomoću tripsina i isprane PBS-om. Nakon toga, izvršiće se bojenje ćelija sa rastvorom Annexin V-FITC i propidijum-jodida, a apoptoza ćelija analiziraće se korišćenjem BD[®] LSR II protočnog citofluorimetra (*Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA*) i *FlowJo* softvera v10.10. (*TreeStar Inc., Ashland, OR, USA*).

Ispitivanje uticaja tEV na nivo ekspresije proteina povezanih sa apoptozom

U cilju detaljnije analize molekularnih mehanizama apoptoze, biće određena ekspresija 35 proteina uključenih u apoptotske puteve korišćenjem komercijalnog kita *Proteome Profiler™ Human Apoptosis Array* (*R&D Systems, UK*). Nakon denzitometrijske analize, dobijeni rezultati bićeprikazani u formi „heat map“ dijagrama, čime će se omogućiti jasnija interpretacija promena u signalnim putevima apoptoze.

Analiza genske ekspresije

Ukupna RNK će biti izolovana pomoću TriZol reagensa (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) prema uputstvu proizvođača, konvertovana u cDNK i analizirana kvantitativnom PCR metodom (eng. *quantitative PCR- qPCR*) na aparatu 7500 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems, SAD*) uz korišćenje SYBR Green Master Mix-a i specifičnih prajmera. Biće ispitivana ekspresija sledećih gena: *BAX, BCL2, ITGA5, ITGB1, TGFβ, MMP2 i MMP9*. Za normalizaciju ekspresije koristiće se β-aktin kao endogeni kontrolni gen, a relativna ekspresije će biti izračunata $\Delta\Delta C_t$ metodom (14).

***In silico* analiza mikro RNK i analiza ekspresije odabranih kandidata**

In silico analizom će se identifikovati mikro RNK potencijalno prisutne u tEV, a koje mogu imati ulogu u modulaciji osetljivosti ćelija karcinoma jajnika A2780 na cisplatinu. Podaci o profilu nekodirajućih RNK iz tEV (HTR-8/SVneo) biće preuzeti iz GEO baze podataka (GSE182717), kako bi se izdvojile najzastupljenije mikro RNK. Mikro RNK koje direktno ciljaju odabrane anti-apoptotske gene biće identifikovane putem pretrage baze miRTargetLink 2.0, koja integriše podatke iz miRTarBase, miRDB i mirDIP. Zatim će biti sprovedeno poređenje sa dostupnim podacima o ekspresiji mikro RNK u ćelijskim linijama karcinoma jajnika A2780, u cilju pronalaženja kandidata sa potencijalnom ulogom u regulaciji ćelijskog preživljavanja i odgovora na cisplatinu terapiju. Odabrane mikro RNK biće uključene u konstrukciju mreža interakcija mikro RNK–iRNK korišćenjem alata miRNet 2.0. Na osnovu ovih rezultata, biće odabrani kandidati za eksperimentalnu validaciju u ćelijskoj liniji A2780, sa ciljem da se razjasni mogući doprinos odabranih mikro RNK iz tEV u regulaciji apoptotskih puteva u A2780 ćelijama.

STATISTIČKA ANALIZA

Svi eksperimenti biće izvedeni u najmanje tri nezavisna ponavljanja. Rezultati će biti prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD) za podatke sa normalnom raspodelom, odnosno kao medijana sa interkvartilnim rasponom za podatke koji ne prate normalnu raspodelu. Za deskriptivnu statistiku biće korišćeni aritmetička sredina, medijana, standardna devijacija, minimum i maksimum vrednosti. *Shapiro-Wilk* test će se koristiti za testiranje normalne distribucije. Razlike između više grupa biće analizirane jednosmernim ANOVA testom uz *Tukey post-hoc* ili *Kruskal-Wallis* test ukoliko distribucija ne bude imala normalnu raspodelu. Razlike će se smatrati statistički značajnim ukoliko je p-vrednost manja od 0,05. Analize će biti urađene pomoću softvera *GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*) i rezultati će biti prikazani u vidu grafikona i tabela.

NAUČNI DOPRINOS

Karcinom jajnika i dalje predstavlja jedan od najsmrtonosnijih ginekoloških maligniteta, prvenstveno zbog odsustva specifičnih simptoma u ranim fazama, što dovodi do čestog otkrivanja bolesti u uznapredovalim stadijumima. Na prognozu i ishod bolesti dodatno utiču faktori poput osetljivosti na hemioterapiju i volumena rezidualne bolesti nakon citoreduktivne hirurške intervencije. Međutim, i pored napretka u terapijskim strategijama, petogodišnja stopa preživljavanja za sve stadijume karcinoma jajnika i dalje ostaje relativno niska (oko 26–42%), što naglašava potrebu za razvojem novih terapijskih pristupa. Iako je ostvaren značajan napredak u razumevanju mehanizama rezistencije na cisplatinu, i dalje postoji potreba za razvojem novih strategija koje bi povećale terapijsku osetljivost i unapredile ishod lečenja pacijentkinja sa karcinomom jajnika. S obzirom na to da su dosadašnja istraživanja pokazala da ekstracelularne vezikule iz placente mogu regulisati apoptozu ćelija karcinoma jajnika, ovo istraživanje će ponuditi novi uvid u potencijal prekondicioniranja ovih ćelija pomoću tEV, u cilju njihove senzitivizacije na tretman cisplatinom i boljeg odgovora na terapiju. Ovaj pristup može doprineti boljem razumevanju mehanizama putem kojih tEV utiču na osetljivost tumorskih ćelija na cisplatinu putem modulacije apoptoze i invazivnosti ćelija karcinoma jajnika. Dodatno, na osnovu rezultata eksperimentalne analize ekspresije odabranih mikro RNK iz tEV u ćelijskoj liniji karcinoma jajnika, utvrdiće se njihov doprinos u regulaciji apoptotskih puteva i potencijal u senzibilizaciji ćelija karcinoma jajnika na cisplatinu. Dopremanjem ovih mikro RNK putem tEV u ćelije karcinoma jajnika ispitaće se moguć doprinos povećane koncentracije odabranih mikro RNK u modulaciji citotoksičnog uticaja na ćelije karcinoma jajnika, što bi ukazalo i na njihove moguće terapijske implikacije. Na taj način bi ovo istraživanje pružilo značajan doprinos fundamentalnom znanju o interakcijama između tEV i tumorskih ćelija, a u budućnosti moglo otvoriti mogućnost za razvoj novih personalizovanih terapijskih pristupa.

LITERATURA

1. Yang L, Xie HJ, Li YY, Wang X, Liu XX, Mai J. Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer (Review). *Oncol Rep*. 2022 Apr;47(4):82.
2. Ortiz M, Wabel E, Mitchell K, Horibata S. Mechanisms of chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Cancer Drug Resist* [Internet]. 2022 Apr; 5(2):304–316.
3. Piechowski J. Trophoblastic-like transdifferentiation: A key to oncogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 May;101:1–11.
4. Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update*. 2006 Nov 29;13(2):121–41.
5. Quesenberry PJ, Aliotta JM. Cellular phenotype switching and microvesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Sept;62(12):1141–8.
6. Kumar MA, Baba SK, Sadida HQ, Marzooqi SAI, Jerobin J, Altemani FH, et al. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Feb 5;9(1):27.
7. Nakahara A, Nair S, Ormazabal V, Elfeky O, Garvey CE, Longo S, et al. Circulating Placental Extracellular Vesicles and Their Potential Roles During Pregnancy. *Ochsner J*. 2020;20(4):439–45.
8. Toufakis V, Katuwal S, Pukkala E, Tapanainen JS. Impact of parity on the incidence of ovarian cancer subtypes: a population-based case-control study. *Acta Oncol*. 2021 July 3;60(7):850–5.
9. Chen Q, Rutten V, Cheng WT, Tong M, Wei J, Stone P, et al. Phagocytosis of Extracellular Vesicles Extruded From the Placenta by Ovarian Cancer Cells Inhibits Growth of the Cancer Cells. *Int J Gynecol Cancer*. 2018 Mar;28(3):545–52.
10. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med*. 2014 Dec;12(1):204.
11. Chen X, Tijono S, Tsai B, Chamley LW, Ching LM, Chen Q. A pilot *in vivo* study: potential ovarian cancer therapeutic by placental extracellular vesicles. *Biosci Rep*. 2023 Aug 31;43(8):BSR20230307.
12. Sun X, Chamley LW, Morgan T, Tijono S, Tsai B, Terblanche L, et al. Placenta-derived trophoblast extracellular vesicles promote CD169+ macrophage migration and suppress ovarian tumour growth. *J Transl Med*. 2025 Nov 17;23(1):1295.
13. Pillay P, Moodley K, Vatish M, Moodley J. Exosomal MicroRNAs in Pregnancy Provides Insight into a Possible Cure for Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020 July 29;21(15):5384.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.