

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.“

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie (N1501)

Studijní obor: NGEMOVI (1515T010)



**Bc. Dominika Vallušová**

**Studium vlivu DNA reparačních drah na odpověď na chemoterapeutickou léčbu  
u karcinomu vaječníků**

The effect of DNA repair pathways on ovarian cancer therapy response

Diplomová práce

Školitelka: Ing. Alena Opattová, PhD.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Aleny Opattové, PhD., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5.8.2021

.....  
Bc. Dominika Vallušová

### **PodĎakovanie:**

Rada by som sa poĎakovala MUDr. Pavlovi Vodičkovi, CSc. za to, že mi umožnil vypracovať diplomovú prácu na Oddelení molekulárnej biológie nádorov na Ústave experimentálnej medicíny AV ČR, v. v. i..

Moja veľká vĎaka patrí svojej školiteľke a vedúcej diplomovej práce Ing. Alene Opattovej, PhD. za čas venovaný ako počas laboratórnej práce, tak aj pri osobných konzultáciách, za trpezlivosť, ochotu a v neposlednom rade za odborné vedenie a priateľskú atmosféru, ktorú vytvárala pri spracovávaní diplomovej práce. Chcela by som poĎakovať aj vedeckému kolektívu z Oddelenia molekulárnej biológie nádorov, ktorý ma medzi seba prijal. Rada by som sa poĎakovala MUDr. Josefovi Horákovi za cenné rady pri spracovávaní diplomovej práce, osvojovaní si metodických postupov a vytváranie príjemnej atmosféry pri práci v laboratóriu.

V neposlednom rade by som chcela poĎakovať najmä svojej rodine, priateľovi a blízkym kamarátom za neustálu podporu počas celého priebehu štúdia.

Prekladaná diplomová práca vznikla za finančnej podpory Grantovej agentúry ČR, GAČR 19-10543S.

## Abstrakt

Karcinom vaječníků je závažné a velmi rozšířené gynekologické nádorové onemocnění. V jeho léčbě se jako léčivo první volby používá karboplatina. Avšak, po počáteční terapeutické odpovědi může docházet k relapsu onemocnění s vyvinutou rezistencí vůči karboplatině. Právě **nedostatečná odpověď na léčbu a chemorezistence** bývá **častým** důvodem vysoké mortality v rámci tohoto onemocnění.

Dráhy odpovědné za opravu poškozené DNA mají význam v terapeutické odpovědi na karboplatinu a taktéž ve vzniku rezistence. Obnova funkce dráhy homologní rekombinace v nádorech je klíčovým mechanismem získané rezistence vůči platinovým derivátům. Na základě těchto poznatků jsme vypracovali hypotézu, že inhibicí homologní rekombinace by bylo možné zvýšit citlivost na karboplatinu. Z tohoto důvodu je hlavním cílem naší práce definovat roli oprav dvouřezcových zlomů v odpovědi na chemoterapii u karcinomu vaječníků. Protein MRE11 je součástí komplexu MRN, který se účastní opravy dvouřezcových zlomů. Pomocí mirinu, farmaceutického inhibitoru MRE11, jsme se snažili zjistit vliv homologní rekombinace na účinek karboplatiny a také její roli v získané resistenci.

V praktické části práce jsme pomocí biostatistické analýzy ozřejmili asociaci mezi zvýšenou expresí MRE11 a horším přežíváním pacientů s diagnostikovaným karcinomem vaječníků. V rámci *in vitro* funkčních analýz jsme testovali jak samostatný, tak i kombinovaný účinek karboplatiny a mirinu na buněčnou linii OVCAR3 a rezistentní linii, vytvořené na Oddělení molekulární biologie nádorů (ÚEM AVČR, v. v. i.). Naše výsledky ukázaly, že kombinovaná aplikace karboplatiny s mirinem vede k snížené buněčné proliferaci a růstu, a vyšší akumulaci DNA poškození než po samostatní aplikaci karboplatiny. Po našich pokusech na rezistentní linii jsme zjistili, že kombinovanou aplikací karboplatiny a mirinu dochází k snížení buněčného růstu. Získané výsledky naznačují, že inhibice homologní rekombinace pomocí inhibitoru MRE11 vede k zvýšené citlivosti nádorových buněk vůči účinkům karboplatiny jak u senzitivní buněčné linie, tak u buněčné linie se získanou rezistencí.

**Klíčové slova:** ovariální karcinom, mirin, karboplatina, chemoterapeutická rezistence, homologní rekombinace, odpověď na DNA poškození

## Abstract

Ovarian cancer is serious and one of the most common gynecologic cancers. Carboplatin is the therapeutic agent of the first choice in the ovarian cancer therapy. However, after the primary therapeutic response to carboplatin, the relapse of the disease may occur with developed resistance to carboplatin. Chemoresistance and insufficient therapy response are considered to be the reason of the high mortality rate of ovarian cancer.

The DNA damage response pathways play an important role in the therapeutic response and chemoresistance development. Restoration of homologous recombination function in cancers is the key mechanism of resistance development to platinum agents. Based on this knowledge, we formed our hypothesis, that the inhibition of homologous recombination could increase the sensibility to carboplatin. The main goal of this thesis was to define the role of double-strand breaks repair in response to chemotherapy of ovarian cancer. Protein MRE11 is part of the MRN complex, that participates in double-strand breaks repair. Using mirin as a pharmacologic inhibitor of MRE11 we were aiming to determine the impact of homologous recombination on the effect of carboplatin and its role in resistant development to carboplatin.

In the practical part of the thesis, we described the association between increased expression of MRE11 and worse overall survival of ovarian cancer patients, using biostatistical analysis. The *in vitro* functional assays tested the individual and combined effect of carboplatin and mirin on the OVCAR3 cell line, and the resistant cell line created by the Department of Molecular Biology of Cancer (IEM CAS, Prague). Our results have shown that combined application of carboplatin and mirin results in the decreased cell proliferation and cell growth, and in the increased accumulation of DNA damage in comparison with a single application of carboplatin. After our experiments on the resistant cell line, we found out that the combined application of carboplatin and mirin results in decreased cell growth. According to our results, the inhibition of homologous recombination using MRE11 inhibitor results in increase sensibility of ovarian cancer cells to carboplatin in the sensitive and resistant cell lines.

**Keywords:** ovarian cancer, mirin, carboplatin, chemoresistance, homologous recombination, DNA damage response

# Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Teoretický úvod.....	2
2.1	Epidemiológia .....	3
2.2	Etiológia a rizikové faktory .....	4
2.2.1	Hereditárny karcinóm vaječníkov .....	4
2.2.2	Sporadický karcinóm vaječníkov .....	5
2.3	Diagnostika a prevencia .....	7
2.4	Terapeutické stratégie .....	10
2.4.1	Chemoterapia s využitím karboplatiny.....	11
2.4.2	Rekurencia a jej liečba .....	13
2.4.3	Cielená terapia.....	14
2.4.4	DNA reparačné dráhy.....	15
2.4.5	Cielenie na DDR dráhy v nádorovej terapii .....	22
2.5	Vznik rezistencie v odpovedi na terapiu karcinómu vaječníkov .....	23
3.	Hypotéza a ciele práce.....	26
4.	Materiál a metódy.....	28
4.1	Bioinformatická analýza expície génu MRE11 asociovaná s prežívaním pacientov s OC .....	28
4.2	<i>In vitro</i> funkčná analýza.....	29
4.2.1	Nádorové bunkové línie .....	29
4.2.2	Kultivácia a pasážovanie.....	29
4.2.3	Počítanie a nasadenie buniek.....	31
4.2.4	Ovplyvnenie buniek roztokmi mirínu a karboplatiny .....	31
4.2.5	Hodnotenie bunečného rastu .....	32
4.2.6	Hodnotenie bunkovej proliferácie, klonogénneho potenciálu a cytotoxicity .....	33
4.2.7	Polymerázová reťazová reakcia (PCR) .....	34
4.2.8	Proteínová analýza .....	37
4.2.9	Analýza poškodenia DNA pomocou <i>in vitro</i> Comet assay .....	40
4.2.10	Analýza bunkového cyklu.....	41

4.3 Štatistická analýza.....	42
5. Výsledky .....	43
5.1 Efekt inhibície HR pomocou mirínu na bunkovú líniu karcinómu vaječníkov .....	44
5.1.1 Bioinformatická analýza proteínu MRE11 asociovaného s prežívaním u pacientov s diagnostikovaným OC .....	44
5.1.2 Hodnotenie vplyvu pôsobenia mirínu na bunkovú proliferáciu OVCAR3 buniek .....	45
5.1.3 Hodnotenie vplyvu pôsobenia mirínu na rast buniek .....	45
5.1.4 Hodnotenie vplyvu pôsobenia mirínu na hladinu DNA poškodenia .....	46
5.2 Hodnotenie vplyvu inhibície HR pomocou MRE11 inhibítora mirínu na citlivosť OVCAR3 bunkovej línie voči karboplatine .....	47
5.2.1 Hodnotenie vplyvu karboplatiny na bunkovú proliferáciu OVCAR3 buniek .....	47
5.2.2 Efekt kombinovaného pôsobenia mirínu a karboplatiny na viabilitu OVCAR3 buniek .....	48
5.2.3 Hodnotenie vplyvu pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny na klonogénny potenciál OVCAR3 buniek .....	49
5.2.4 Hodnotenie rastu OVCAR3 buniek po kombinovanom pôsobení inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny.....	50
5.2.5 Hodnotenie vplyvu pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny na poškodenie molekúl DNA .....	51
5.2.6 Hodnotenie vplyvu pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny na reguláciu bunkového cyklu .....	52
5.2.7 Hodnotenie vplyvu pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny na expresiu vybraných génov .....	54
5.3 Vplyv inhibície MRE11 na bunkovú líniu rezistentnú na účinok karboplatiny .....	57
5.3.1 Charakterizácia bunkovej línie zo získanou rezistenciou voči karboplatine .....	57
5.3.2 Vplyv pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny u bunkovej línie zo získanou rezistenciou voči karboplatine.....	58
6. Diskusia.....	59
7. Záver .....	66
8. Bibliografia .....	67
Príloha.....	I



## SKRATKY

AJCC – Americký spoločný výbor pre rakovinu

ATM – *Ataxia telangiectasia Mutated* kináza homológna s PI3-kinázami

ATR – *Ataxia telangiectasia Mutated- and RAD3-related* kináza

ATRIP – ATR-interagujúci proteín

BER – excízna oprava báz

BIC – *Breast Cancer Information Core*

BSA – bovinný sérový albumín

C – kontrola

CA 125 – nádorový antigén 125

CA 15-3 – nádorový antigén 15-3

CA 72-4 – nádorový antigén 72-4

CbPt – karboplatina

CYFRA21-1 – cytokeratínový fragment 21-1

DDR – odpoveď na DNA poškodenie

DSB – dvojláknové zlomy

dsDNA – dvojláknová DNA

EOC – karcinóm vaječníkov epiteliálneho typu

FIGO – Medzinárodný Zväz Gynekológie a Pôrodnictva

GEPIA – *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*

GIT – gastrointestinálny trakt

GTE<sub>x</sub> – *Genotype-Tissue Expression Portal*

HBOC – hereditárny karcinóm prs a vaječníkov

HE4 – *Human Epididymis Protein 4*

HGSOC – *High-grade* serózny karcinóm vaječníkov

HNPCC – hereditárny nepolypózny kolorektálny karcinóm (Lynchov syndróm)

HOC – hereditárny karcinóm vaječníkov

HR – homológna rekombinácia

HRT – náhradná hormonálna terapia

IC<sub>50</sub> – inhibičná koncentrácia látky, ktorá má letálny efekt pre 50% buniek

M – mirín

MMP7 – matrix metaloproteináza 7

MMR – oprava chybného párovania báz

MRE11 – *Meiotic Recombination 11* kináza  
MRN – MRE11-RAD50-NBS1 proteínový komplex  
MRP – *multi-drug* rezistentné proteíny  
NER – excízna oprava nukleotidov  
NHEJ – nehomológne spájanie koncov DNA  
NLS – jadrový lokalizačný signál  
OC – karcinóm vaječníkov  
ORR – *overall response rate*  
OS – *overall survival*  
PARP – poly(ADP-ribóza)polymeráza  
PFS – prežívanie bez progresie  
PIKK – rodina fosfatidylinozitol-3 príbuzných proteínkináz  
PLD – pegylovaný lipozomálny doxorubicín  
RPA – replikačný proteín A  
RRSO – obojstranná salpingo-oohorektómia  
SCLC – malobunkový karcinóm pľúc  
SSB – jednovláknové zlomy  
ssDNA – jednovláknová DNA  
TFI – interval bez liečby  
TGCA – *The Cancer Genomic Atlas*  
VTCN1 – *V-Set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1*  
WHO – Svetová Zdravotnícka Organizácia (*World Health Organization*)

# 1. Úvod

Karcinóm vaječníkov je závažné gynekologické nádorové ochorenie, vyznačujúce sa zlou prognózou a najvyššou mortalitou spomedzi gynekologických nádorových ochorení. Toto tvrdenie podporuje aj fakt, že na svete zastáva 7. miesto najčastejšie diagnostikovaných nádorových ochorení (Umakanthan *et al.*, 2019). Predstavuje 5. najčastejšiu príčinu smrti v rámci nádorových ochorení u žien, pripisujúc si najvyšší počet úmrtí v rámci nádorových ochorení ženského reprodukčného systému. Počas života sa u 1 zo 78 žien toto ochorenie prejaví a 1 zo 108 žien na karcinóm vaječníkov umiera (<https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>).

Vo svete je najvyššia incidencia tohto ochorenia zaznamenaná v Strednej, Východnej a Severnej Európe, Polynézii a Severnej Amerike (Sung *et al.*, 2021). Príčinou vysokej mortality je často neskorá diagnostika ochorenia z dôvodu asymptomatického rastu nádoru v skorých štádiách ochorenia (Umakanthan *et al.*, 2019). Karcinóm vaječníkov je multifaktoriálne podmienené ochorenie. Medzi genetické faktory patria mutácie v génoch *BRCA1* a *BRCA2*, a tiež defekty v dráhach homológnej rekombinácie (HR) a v excíznych opravách DNA. Liečivá prvej voľby v terapii karcinómu vaječníkov sú platinové deriváty, ktoré majú protinádorový potenciál interagovať s DNA a viesť k apoptóze bunky (Reid *et al.*, 2017; Wong-Brown *et al.*, 2020).

Napriek prvotnej odpovedi na chemoterapiu sa môže vyvinúť chemorezistencia, ktorá je ďalšou príčinou vysokej mortality v rámci tohto ochorenia. Jedným z možných faktorov vplyvajúcich na vznik chemorezistencie sú defekty v rozpoznávaní a oprave DNA poškodenia spôsobeného chemoterapeutikami. Získaná rezistencia predstavuje problém, keďže nádor sa často stáva rezistentným nielen voči látkam, ktoré boli pôvodne používané na jeho terapiu, ale aj voči iným liečivám (Jayson *et al.*, 2014).

Porozumenie úlohe DNA opravných dráh v rezistencii môže viesť k účinnejšiemu ničeniu nádorových buniek so zníženým rizikom poškodenia normálnych buniek. Pochopenie konkrétnych molekulárnych dráh, zúčastňujúcich sa na vzniku rezistencie, by mohlo prispieť k špecifickej chemoterapii, poprípade až k personalizovanej liečbe karcinómu vaječníkov.

## 2. Teoretický úvod

Karcinóm vaječníkov (*ovarian cancer*, OC) je gynekologické heterogénne nádorové ochorenie postihujúce ženské vaječníky a maternicu. Výsledkom tohto ochorenia sú abnormálne bunky schopné prechádzať do okolitých tkanív peritoneálnej dutiny, ako sú napríklad pečeň, obličky, a do pľúc. Biológia OC sa od hematogénnych metastázujúcich nádorov líši tým, že nádorové bunky primárne diseminujú v peritoneálnej dutine a sú invazívne len povrchovo (Lengyel, 2010).

Histológia OC je rôznorodá a jej histologická klasifikácia je založená na klasifikácii vydanjej Svetovou Zdravotníckou organizáciou (*World Health Organization*, WHO) (Kurman and Shih Ie, 2016). Histologická klasifikácia karcinómu vaječníkov na základe pôvodu delí OC na epiteliálny a neepiteliálny karcinóm. Karcinóm vaječníkov epiteliálneho typu (*epithelial ovarian cancer*, EOC), pôvodom z povrchových buniek vaječníkov a vajcovodov, predstavuje až 90% zo všetkých karcinómov vaječníkov. EOC sú výsledkom zhubnej transformácie epitelu ovárií a vajcovodov. EOC sú omnoho invazívnejšie než neepiteliálne karcinómy a predstavujú väčšinu zhubných nádorov ovárií (Cho and Shih Ie, 2009; Kaku *et al.*, 2003; Lengyel, 2010; Momenimovahed *et al.*, 2019).

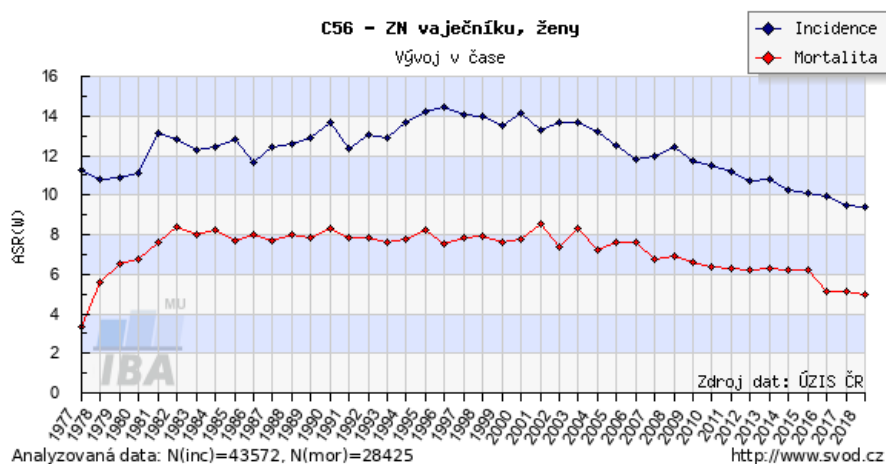
Epiteliálne OC sa ďalej delia na nasledujúce podtypy: mucinózne (3%), serózne (70%), endometrioidné (10%), tzv. „*clear cell*“ (10%) a nešpecifické (5%). Skupina reprezentujúca zvyšných 10% karcinómov vaječníkov predstavuje neepiteliálne OC. Neepiteliálne OC zahŕňajú nádory, ktoré majú pôvod v zárodočnej línii a primárnych zárodočných povrazcoch (*chordae sexuales*), metastatické OC a množstvo extrémne zriedkavých OC, ako sú sarkómy či lipidné nádory (Kaku *et al.*, 2003).

V rámci diagnostiky OC sa určuje štádium, v ktorom sa ochorenie nachádza, a zároveň jeho závažnosť. Pre určenie štádia sa využívajú dva systémy: FIGO (Medzinárodný Zväz Gynekológie a Pôrodnictva, *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) a AJCC (Americký spoločný výbor pre rakovinu, *American Joint Committee on Cancer*). Oba systémy využívajú pre určenie štádia OC I – IV klasifikáciu a TNM klasifikáciu (Tab. P1). Štádia sú popísané v prílohe I (<https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>).

## 2.1 Epidemiológia

Karcinóm vaječníkov predstavuje tretie najčastejšie gynekologické nádorové ochorenie, po rakovine krčka maternice a rakovine maternice. OC predstavuje 2,5% všetkých nádorov (Torre *et al.*, 2018) a má vo všeobecnosti zlú prognózu a jednu z najvyšších mortalít a nižšiu prevalenciu v porovnaní s rakovinou prsníka (Momenimovahed *et al.*, 2019). Mortalita OC za rok 2020 predstavovala 13 770 úmrtí v ženskej populácii v rámci nádorových ochorení (Sung *et al.*, 2021).

Podľa databázy údajov GLOBOCAN za rok 2020 pribudlo 21 410 nových prípadov OC. Incidencia OC predstavuje 313 959 prípadov, čo zodpovedá 3,4% všetkých novo diagnostikovaných nádorov v ženskej populácii. Celosvetová incidencia OC sa v populácii odlišuje v závislosti od veku a etnickej príslušnosti. Najviac nových prípadov OC bolo zaznamenaných v Ázii a Európskych krajinách, zatiaľ čo najnižšia incidencia OC bola v oblasti Latinskej Ameriky, Karibiku a Oceánie (Sung *et al.*, 2021). Vek diagnózy OC u žien bol 50-79 rokov (Momenimovahed *et al.*, 2019) a medián veku, v ktorom dochádza k úmrtiu pacientiek je 70 rokov (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>). Incidencia aj mortalita, ktoré mali po minulé roky zvyšujúci sa trend, sa v poslednej dobe stabilizovali či začali klesať, a to nielen vo svete, ale aj v Českej republike, ako ukazuje Obr. 1 (La Vecchia, 2017; Sung *et al.*, 2021).



**Obrázok 1** Časový vývoj incidence a mortality OC v Českej republike za obdobie rokov 1977-2016 (<https://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>).

V rámci Českej republiky bolo v roku 2020 registrovaných 986 nových prípadov OC a 627 úmrtí, čím sa toto nádorové ochorenie dostalo na 5. miesto príčiny úmrtia nádorovým ochorením (Sung, Ferlay *et al.* 2021, [www.svod.cz](http://www.svod.cz)).

Karcinóm vaječníkov je multifaktoriálne podmienené ochorenie. Za najvýznamnejšie rizikové faktory sa považujú genetické, hormonálne a gynekologické, ale aj nesprávny životný štýl. Zlé prežívanie žien, ktorým bol OC diagnostikovaný, súvisí s tým, že prvé štádia ochorenia sú asymptomatické alebo sú syndrómy nešpecifické, a tým, že si nie sú vedomé daných rizikových faktorov, ktoré sa zväčša javia ako normálne menštruačné alebo abdominálne problémy (Umakanthan *et al.*, 2019).

## 2.2 Etiológia a rizikové faktory

Aj napriek intenzívnemu výskumu nie je etiológia OC detailne známa. V priebehu posledných rokov boli identifikované environmentálne, biologické a genetické rizikové faktory. Karcinóm vaječníkov možno na základe zastúpenia genetických rizikových faktorov pri vzniku ochorenia rozdeliť do dvoch foriem – hereditárnej a sporadickej. Väčšina prípadov OC má skôr pôvod v coelomovom epiteli než v zárodočnej línii (Hunn and Rodriguez, 2012; La Vecchia, 2017; Sekine *et al.*, 2021).

### 2.2.1 Hereditárny karcinóm vaječníkov

Hereditárny karcinóm vaječníkov (*hereditary ovarian cancer*, HOC) predstavuje 20% epiteliálnych OC. HOC je súčasťou niekoľkých genetických syndrómov, ako sú hereditárny karcinóm prsníka a vaječníkov (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, HBOC) či Lynchov syndróm – hereditárny nepolypózny kolorektálny karcinóm (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*, HNPCC), ktoré sú zodpovedné za 65-75%, respektíve 10-15% prípadov HOC (Sekine *et al.*, 2021).

HBOC je autozomálne dominantné dedičné ochorenie s predispozíciou na vznik karcinómu prsníka a ovárií. Vznik tohto syndrómu je spôsobený zárodočnou mutáciou v určitých génoch. Zárodočné mutácie iba v tumor supresorových génoch *BRCA1* a *BRCA2* boli spočiatku považované za príčinu vzniku HBOC (Gayther *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 2001). Novšie štúdie však predkladajú, že na vzniku HBOC sa podieľajú aj iné gény, ako *TP53*, *RAD51*, *ATM*, *PTEN*, *CHEK2*, *CDH1*, *STK11* alebo *BRIP1* (Sekine *et al.*, 2021). Podľa medzinárodnej databázy *Breast Cancer Information Core (BIC database)* predstavujú zárodočné mutácie v génoch *BRCA1* a *BRCA2* väčšinu zárodočných mutácií spôsobujúcich vznik HBOC, čo dokazuje aj fakt, že až 90% prípadov HBOC je asociovaných s týmito mutáciami (Sekine *et al.*, 2021).

Gény *BRCA1* a *BRCA2* sú tumor supresorové gény, ktoré sa nachádzajú na krátkom ramienku 17., respektíve 13. chromozómu. Úlohou génov *BRCA1* a *BRCA2* je regulácia bunkového cyklu v odpovedi na DNA poškodenie a účasť na opravách dvojvláknových zlomov pomocou HR, čím udržujú genómovú stabilitu. Deficiencia týchto génov vedie ku chromozomálnej nestabilite. Mutácie v génoch *BRCA1* a *BRCA2* sú zodpovedné za 10-15% epiteliálnych OC (Sekine *et al.*, 2021).

Na základe meta-analýz (Sekine *et al.*, 2021) bolo pre OC pre pacientky do 70. roku života, ktoré sú nositeľkami mutovaných génov *BRCA1* a *BRCA2*, zistené kumulatívne riziko vzniku 40%, respektíve 18%. Podľa prospektívnych štúdií (Mavaddat *et al.* 2013) je pre OC pacientky do veku 70. roku života, ktoré sú nositeľkami mutovaných génov *BRCA1* a *BRCA2* kumulatívne riziko 59%, respektíve 18%. Celoživotné riziko vzniku OC u nositeľov mutovaných génov *BRCA1* a *BRCA2* je 30%, respektíve 27% (Hunn and Rodriguez, 2012; Sekine *et al.*, 2021).

U neepiteliálnych OC nie sú zárodočné mutácie v génoch *BRCA1* a *BRCA2* signifikantne asociované so vznikom nádorového ochorenia. Nádory s pôvodom v primárnych zárodočných povrazcoch môžu byť asociované s Peutz-Jeghersových syndrómom a nádory s pôvodom v Sertoli-Leydigových bunkách môžu byť spôsobené zárodočnou mutáciou v géne *DICER1* (Sekine *et al.*, 2021).

Lynchov syndróm je dedičný syndróm s genetickou predispozíciou na vznik rôznych druhov rakoviny. Najsignifikantnejšie zvyšuje riziko vzniku najmä kolorektálneho karcinómu, no môže byť asociovaný aj so vznikom OC (Sekine *et al.*, 2021). Vznik HNPCC je podmienený mutáciami génov zúčastňujúcich sa reparačnej dráhy MMR (*mismatch repair*), ako sú *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* alebo *PMS2*. Ak sa v rodinnej anamnéze nachádzajú aspoň traja rodinní príslušníci, pričom jeden z nich je príbuzný prvého stupňa zvyšných dvoch, so skorým nástupom (pred 50. rokom života) kolorektálneho karcinómu, endometriálneho karcinómu, karcinómu gastrointestinálneho traktu (GIT) alebo karcinómu močových ciest, tak je u týchto pacientiek predpokladané 2-4-krát zvýšené riziko vzniku OC, pričom celoživotné riziko vzniku OC je 9-12% (Boland *et al.*, 2008; Sekine *et al.*, 2021).

### **2.2.2 Sporadický karcinóm vaječníkov**

Sporadická forma OC predstavuje viac než 80% prípadov OC. Hlavnými faktormi podmieňujúcimi vznik OC sú nepretržitá ovulácia, skorý nástup *menarché*, nadmerná stimulácia gonádotropínu a steroidných hormónov (androgény, estrogény, progesterón)

a hlboký panvový zápal (La Vecchia, 2017; Landen *et al.*, 2008). Podľa Sekine (2021) predstavuje trauma epitelu vaječníkov počas ovulácie rizikový faktor, ktorý prispieva k vzniku OC, a predpokladá, že poškodenie DNA, vyskytujúce sa v epitelových bunkách počas ovulácie a opravy epitelu, môže tiež viesť ku karcinogenite.

OC sa častejšie vyskytuje u slobodných, bezdetných alebo neplodných žien, ale aj u žien, ktoré užívali lieky stimulujúce ovuláciu, nazývané ovulárne induktry (Titus-Ernstoff *et al.*, 2001). Vplyvom endokrinologických faktorov sa OC častejšie vyskytuje u žien po menopauze, než počas puberty (Goodman *et al.*, 2003). Množstvo menštruačných cyklov počas života je asociované s rizikom OC, čím je ovulácia považovaná za proces podnecujúci karcinogézu OC (Pelucchi *et al.*, 2007; Sekine *et al.*, 2021).

Menej častý výskyt OC je u žien, u ktorých bola ovulácia prerušená prirodzene (tehotenstvo, kojenie) alebo umelo (užívanie orálnej antikoncepcie) (Hinkula *et al.*, 2006; Tworoger *et al.*, 2007). Riziko vzniku OC klesá o 20 % po prvom tehotenstve a každým ďalším tehotenstvom klesá o ďalších 10 %. Orálna antikoncepcia inhibuje ovuláciu, znižuje hladinu gonádotropínu v organizme a prispieva k redukcii vzniku OC ako u žien s mutáciou v géne *BRC1*, tak aj u žien bez genetickej predispozície. U žien, ktoré užívali orálnu antikoncepciu dokopy 5 – 6 rokov, je riziko znížené o ~ 35 % (La Vecchia, 2017; Sekine *et al.*, 2021; Torre *et al.*, 2018).

Náhradná hormonálna terapia (*Hormonal Replacement Therapy*, HRT) po menopauze môže predstavovať rizikový faktor pre OC, ale aj pre karcinóm prsníka, endometriálny karcinóm a karcinóm pečene. Estrogénová hormonálna terapia zvyšuje riziko OC o 22 % a kombinovaná estrogén-progesterónová hormonálna terapia o 10%. Predpokladá sa, že vysoké hladiny gonádotropínu a steroidných hormónov v organizme majú úlohu v karcinogéze. Inklúzia cýst tvorených v ováriách procesom ovulácie môže byť geneticky transformovaná stimuláciou steroidných hormónov, ako je progesterón. Zvýšená hladina steroidných hormónov v nádorovom mikroprostredí môže uľahčovať zhubnú transformáciu (Sekine *et al.*, 2021; Torre *et al.*, 2018).

Na vzniku OC sa podieľajú aj exogénne rizikové faktory. Exogénne látky ako mastencový prach alebo azbest môžu zvyšovať riziko vzniku OC (Huncharek and Muscat, 2011). Medzi rizikové faktory sa zaraďuje aj stravovanie. Zvýšené riziko vzniku OC asociované s vyššou hladinou endogénnych steroidných hormónov je spájané s vysokým príjmom tukov. Zvýšenie príjmu cholesterolu vedie k vzniku obezity, ktorá predstavuje jeden z rizikových faktorov vzniku OC. Obezita môže u post-menopauzálnych žien, ktoré neužívali hormonálnu terapiu



alebo ju užívali v malých dávkach, viest' až k ~ 13 % zvýšeniu rizika OC (La Vecchia, 2017; Matulonis *et al.*, 2016; Olsen *et al.*, 2007).

### 2.3 Diagnostika a prevencia

Historicky sa OC nazýval aj „tichý zabijak“, pretože jeho symptómy neboli detegované až do nástupu pokročilých štádií ochorenia. Neskorý nástup symptómov spôsobuje oneskorené odporúčané vyšetrenie na prítomnosť malígneho ochorenia (Goff, 2012; Goff *et al.*, 2000). Neskorá diagnostika OC vedie ku detekcii ochorenia v neskorých štádiách (III a IV) a zlej prognóze. Skorá diagnostika by zlepšila prognózu ochorenia a prežívanie pacientiek. Vo všeobecnosti, u žien, ktorým bol diagnostikovaný OC, bolo 5-ročné prežívanie 42,6 % (<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/ovarian-cancer/survival#heading-Zero>). U žien, ktorým bol diagnostikovaný invazívny EOC v pokročilom štádiu (III alebo IV), bolo 5-ročné prežívanie nižšie ako 20 % (Menon *et al.*, 2018). Kontrastne, u žien, ktorým bolo toto nádorové ochorenie diagnostikované v skorých štádiách (najmä I), dosahovalo 5-ročné prežívanie podľa (Stewart *et al.*, 2019) 92,6 % (Chien and Poole, 2017; Vargas, 2014).

Najčastejšími symptómami OC bývajú nadúvanie a bolesť brucha, nechut' do jedla, únava, zvýšená frekvencia močenia a zápcha. Gynekologické symptómy, ako napríklad vaginálne krvácanie mimo menštruačného cyklu, nie sú také časté. To je práve dôvodom, prečo väčšina žien ignoruje tieto symptómy, resp. ich nepovažuje za vážne a odkladá návštevu odborného lekára. Podľa Goff *et al.* (2012) mali pacientky symptómy, ktoré považovali skôr za dôsledok GIT ochorenia, 6 mesiacov pred diagnostikou OC (Goff, 2012).

Kvôli neurčitým a nešpecifickým symptómom je diagnostika OC náročná. Súčasný screeningové metódy pre detekciu OC nie sú dostatočne senzitivné pre detekciu OC v skorých štádiách. Pre screening OC sa štandardne využíva marker prvej línie pre diagnostiku – CA125 (*Cancer Antigen 125*) sérum v kombinácii s HE4 (*Human Epididymis Protein 4*) markerom a transvaginálny ultrazvuk (Chien and Poole, 2017; Rojas *et al.*, 2016).

Nádorový antigén CA 125 je antigénny determinant, ktorý sa využíva ako biomarker pri neinvazívnom screeningu OC. CA 125 je exprimovaný tkanivami, ktoré majú pôvod v Müllerovom vývode, endometriu maternice, vajcovode, krčku maternice a parietálnych a mesoteliálnych serózných blanách (Moore *et al.*, 2009). CA 125 je definovaný reaktivitou s monoklonálnou protilátkou OC 125, ktorá sa viaže na epiteliálne bunky OC. U pacientiek s OC boli detegované zvýšené hladiny CA 125 (Jacobs and Bast, 1989; Slatnik and Duff, 2015).

V rámci plošného screeningu pre diagnostiku OC je využitie CA 125 kontroverzné. Nielenže je tento antigén exprimovaný aj v iných tkanivách než v tom nádorovom, ale jeho hladina môže byť zvýšená aj počas tehotenstva. Táto metóda nie je odporúčaná aj z dôvodu, že v~ 20 % OC nebola zvýšená hladina CA 125. Aj napriek zvýšenej hladine CA 125 pri zvyšných prípadoch ochorenia OC, nie je screeningová metóda pomocou tohto antigénu schopná zachytiť väčšinu OC v skorých štádiách ochorenia. Pre zvýšenie špecificity detekcie pomocou screeningovej metódy sa využíva kombinácia CA 125 s HE4 (Moore *et al.*, 2009). HE4 je vo vyššej miere exprimovaný u OC aj v prípadoch, kedy nie je zvýšená hladina CA 125. Pre screening OC je preto odporúčaná kombinácia CA 125 a HE4, čím možno zvýšiť senzitivitu diagnostiky (Rojas *et al.*, 2016; Slatnik and Duff, 2015).

Transvaginálny ultrazvuk predstavuje zobrazovaciu diagnostickú metódu pre nebolestivé vyšetrenie panvových orgánov. Prostredníctvom ultrazvuku možno detegovať bunkovú masu v oblasti ovárií. Často sa však využíva v kombinácii s biomarkermi ako sú CA 125 a HE4, čím môžeme zvýšiť senzitivitu daného vyšetrenia. Tak ako pri iných typoch solídnych nádorových ochorení predstavuje biopsia spoľahlivý spôsob pre diagnostiku ochorenia. Biopsia však predstavuje invazívny spôsob vyšetrenia a v začiatkoch zisťovania diagnózy sa k nej neprístupuje (Cramer *et al.*, 2011; Slatnik and Duff, 2015).

Pre zvýšenie senzitivity a špecificity screeningových metód boli zavedené štúdie pre zavedenie nových biomarkerov v rámci diagnostiky OC, ako napr. TP53, Protein Z, glykodelín, MMP7 (*Matrix Metaloproteinase 7*), CYFRA21-1 (cytokeratínový fragment 21-1), CA 72-4 (*Cancer Antigen 72-4*), CA 15-3 (*Cancer Antigen 15-3*) či VTCN1 (*V-Set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1*) (Menon *et al.*, 2018; Russell *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017) .

Z dôvodu nedostatočne senzitívneho screeningu a neskorej diagnostiky sa apeluje najmä na prevenciu voči vzniku OC. Za prevenciu sa považuje aj oboznámenie a poučenie ženskej populácie o symptómoch, ktoré sú síce neurčité a nešpecifické, ale ich všímanie, pravidelné gynekologické prehliadky a konzultácia s odborným lekárom môže pomôcť diagnostikovať OC v skoršom štádiu. Prevenciu môžeme rozdeliť na chemoprevenciu a chirurgickú prevenciu, ktorá je odporúčaná rizikovým pacientkam, ktoré sú nositeľkami *BRCA1* alebo *BRCA2* mutácií, alebo im bol diagnostikovaný Lynchov syndróm s celoživotným rizikom vzniku OC v rozmedzí 10 – 40 %.

## Chemoprevencia

Chemoprevencia sa radí medzi neinvazívne metódy prevencie a má najvyšší účinok u žien s nízkym či stredným rizikom vzniku OC. Do tejto stratégie sa radí napríklad orálna antikoncepcia. Orálna antikoncepcia býva odporúčaná ako prevencia voči OC, výnimkou sú nositeľky mutácii génov *BRCA1* a *BRCA2*, ako uviedla U.S. Society of Gynecologic Oncology v roku 2015 (Chien and Poole, 2017; Menon *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2015).

## Chirurgická prevencia

Tak ako pri rôznych iných invazívnych metódach, aj chirurgická prevencia je asociovaná s možnou ujmom, preto je nutné zvážiť riziko vzniku OC u jednotlivcov. Štandardne sú chirurgické zákroky v rámci prevencie ponúkané najmä ženám, ktoré sa vyznačujú vysokou pravdepodobnosťou vzniku OC. Jedná sa najmä o ženy, ktoré sú nositeľkami BRCA mutácií s celoživotným rizikom vzniku OC aspoň 10 %. Uvažuje sa, že sa táto hranica posunie na 4 % u premenopauzálnych žien, ktoré užívali hormonálnu terapiu a  $\leq 5$  % u postmenopauzálnych žien starších ako 50 rokov (Manchanda *et al.*, 2018).

Chirurgická prevencia zahŕňa oophorektómiu a salpingektómiu – odstránenie ovárií a odstránenie vajcovodov. Prevencia sa rozšírila o obojstrannú salpingo-oophorektómiu (*Risk-reducing Bilateral Salpingo-oophorectomy*, RRSO) – obojstranné odstránenie ovárií aj vajcovodov. RRSO je rutinne odporúčaná ženám s rodinnou anamnézou OC. U nositeľiek *BRCA1* mutácie je RRSO navrhované vo veku 35-40 rokov. U nositeľiek *BRCA2* mutácie je miera nebezpečenstva (*hazard ratio*) vyššia než u nositeľiek *BRCA1* mutácie, kedy možnosť podstúpiť RRSO predĺžená do veku 45 rokov, vzhľadom na nižšiu mieru nebezpečenstva (Mallen *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2015) RRSO predstavuje chirurgický zákrok s minimálnym rizikom. RRSO je vykonávaná laparoskopicky, pričom je nevyhnutná inšpekcia brušnej a panvovej dutiny, s rizikom objavenia intraoperačných a pooperačných komplikácií 1,3 %, respektíve 3,1 % (Walker *et al.*, 2015). Kým je riziko komplikácií počas chirurgického zákroku relatívne malé, RRSO sa spája s pooperačnými vedľajšími efektmi ako je vaginálna suchosť, znížená sexuálna funkcia či znížená schopnosť dosiahnuť orgazmus (Marchetti *et al.*, 2014). U premenopauzálnych žien je odporúčaná salpingektómia, ktorá je nasledovaná oophorektómiou vo veku blížiacom sa k menopauze, alebo až po menopauze. K tejto forme chirurgickej prevencie došlo na základe prijatého predpokladu, že OC vzniká primárne vo vajcovodoch a až sekundárne v ováriách (Kwon *et al.*, 2013). Oddelený chirurgický zákrok predstavuje alternatívu pre ženy, ktoré nechcú podstúpiť riziko vedľajších efektov spojených

s odstránením ovárií, ktorými sa vyznačuje RRSO (Crum *et al.*, 2007; Hartmann and Lindor, 2016; Kuchenbaecker *et al.*, 2017).

## 2.4 Terapeutické stratégie

V prípade diagnostikovania OC nastupuje liečba, ktorá štandardne pozostáva z kombinácie chemoterapie a chirurgického zákroku. Chemoterapia je typ liečby nádorových ochorení, ktorá využíva vysoké dávky cytostatík. Chemoterapia je podávaná buď s kuratívnym cieľom – v takom prípade sa najčastejšie využíva kombinácia liečiv; alebo s cieľom predĺžiť život pacientovi či redukovať symptómy ochorenia – paliatívna liečba (Alfarouk *et al.*, 2015).

Terapia OC môže byť adjuvantná (aplikácia chemoterapie po chirurgickom zákroku) alebo neoadjuvantná (aplikácia chemoterapie pred chirurgickým zákrokom). O postupnosti liečby rozhoduje veľkosť nádorovej bunkovej masy. V prípade, že nádorová bunková masa nepresahuje maximálne 1 cm v diametri, je možné zaviesť adjuvantnú liečbu. Chirurgický zákrok taktiež slúži na stanovenie štádia, v ktorom sa OC nachádza podľa systému FIGO (Jayson *et al.*, 2014) Po chirurgickej cytoredukcii nasleduje terapia chemoterapiou prvej voľby – intravenózna aplikácia platinových derivátov alebo taxanov každých 21 dní v šiestich cykloch (Cortez *et al.*, 2018). Ak je bunková masa nádoru väčšia, zavádza sa neoadjuvantná liečba s cieľom zmenšiť nádorovú bunkovú masu pôsobením chemoterapeutík a následným chirurgickým zákrokom. Po vykonaní zákroku dochádza ku chemoterapii, v rámci ktorej sa rutinne podávajú platinové deriváty a taxany, často v kombinácii (napr. karboplatina a paclitaxel) (Stewart *et al.*, 2019). V prípade, že došlo k pozitívnej odpovedi na terapiu, je možné po každých troch cykloch chemoterapie vykonať chirurgický zákrok (Cortez *et al.*, 2018).

U pacientiek s diagnostikovaným štádiom IA/IB a nádormi klasifikácie G1/G2 môže byť fáza chemoterapeutickej liečby vynechaná. U pacientiek s OC v pokročilom štádiu (III/IV) je častokrát nemožné vykonať chirurgickú cytoredukcii. Najčastejším dôvodom je zápal mezentéria tenkého čreva a lézie v *hepatic hilum* (*hilu* pečene). Pacienti vyznačujúci sa neoperatívnymi léziami nie sú vhodnými kandidátmi pre chirurgickú cytoredukcii, preto sú najprv liečení neoadjuvantnou chemoterapiou. Chirurgická cytoredukcii u vhodných pacientov bola asociovaná s lepšími výsledkami v rámci liečby, zatiaľ čo prieskumný chirurgický zákrok vykonaný na väčších či reziduálnych nádoroch mal negatívny dopad na liečbu OC. Takýto zákrok mal za následok zhoršenú či až zablokovanú perfúziu v danej oblasti, ktorá viedla k poškodeniu tkaniva, zvýšenej pravdepodobnosti vzniku bunkového poškodenia a prípadnému

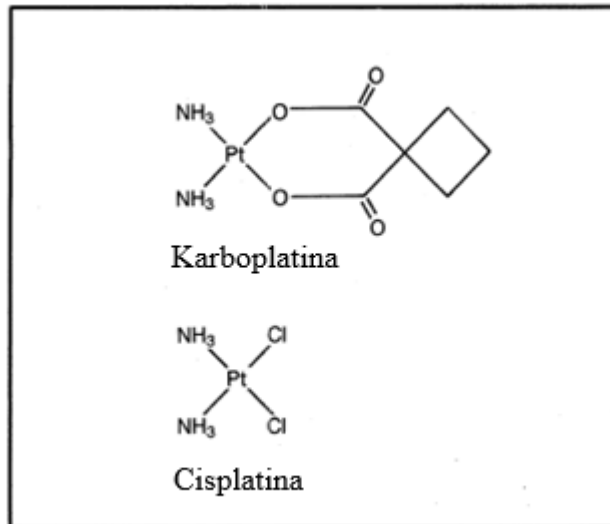
nárastu *multi-drug* rezistentných klonov (Cortez *et al.*, 2018). Pred zavedením samotnej chirurgickej cytoredukcie je odporúčaná laparoskopická operácia pre určenie, či je pacient vhodný pre daný zákrok, a zníženie rizika vedľajších účinkov skorého chirurgického zákroku. Laparoskopická operácia je menej invazívna metóda a vyznačuje sa kratšou dobou zotavovania a zlepšenou kvalitou života (Jayson *et al.*, 2014).

#### 2.4.1 Chemoterapia s využitím karboplatiny

Platinové deriváty, bifunkčné alkalické činidlá, sú veľmi aktívne agensy, široko používané pre liečbu rôznych malignít a predstavujú liečivá prvej voľby. V liečbe OC sa štandardne využívajú platinové deriváty cisplatina a karboplatina (Damia and Broggin, 2019). Predstavujú jediné liečivá založené na báze kovu, ktoré sa používajú v klinickej praxi liečby nielen OC, ale majú sľubný účinok v liečbe SCLC (*Small Cell Lung Carcinoma*), spinocelulárnych bunkových karcinómov, karcinómov hlavy a krku či seminómov (Wagstaff *et al.*, 1989). platinové deriváty sú účinné aj v kombinovanej liečbe – v liečbe OC predstavuje zlatý štandard kombinácia platina-taxany (Damia and Broggin, 2019).

Napriek tomu, že je cisplatina efektívnym chemoterapeutikom v rámci účinnosti zabíjania nádorových buniek, indukuje niekoľko toxických vedľajších účinkov, medzi ktoré radíme neurotoxicitu, nefrotoxicitu a s ňou spojenú extenzívnu hydratáciu pacienta, a toxické účinky na GIT spôsobujúce nevoľnosť a zvracanie. Z tohto dôvodu došlo v osemdesiatych rokoch minulého storočia k vývoju karboplatiny, ktorá je až 45-krát menej toxická a nevyznačuje sa týmito toxickými vedľajšími účinkami, resp. toxické účinky na GIT sú menej výrazné. Pre aplikáciu v rámci liečby OC je tým pádom bezpečnejšia než cisplatina (Wagstaff *et al.*, 1989).

Karboplatina je platinový derivát druhej generácie podobný cisplatine. Karboplatina je podobná cisplatine nielen štruktúrne, ale aj v rámci protinádorovej aktivity. Ako zobrazuje Obr. 2, dva atómy chlóru, ktorými sa vyznačuje cisplatina, sú u karboplatiny nahradené dvojzubým (*bidentate*) dikarboxylátovým chelátovým ligandom, čo robí karboplatinu stabilnejším produktom než je cisplatina a môže znížiť chemickú reaktivitu produktu (Wagstaff *et al.*, 1989).



**Obrázok 2** Chemické vzorce karboplatiny a cisplatiny. Grafické zobrazenie štruktúry platínových derivátov (upravené podľa Wagstaff *et al.* 1989).

Hlavným mechanizmom protinádorovej aktivity je schopnosť platínových derivátov interagovať s nukleofilickými miestami na DNA a formovať monoadukty, hlavne kovalentnou väzbou s guanínom N7. Tento monoadukt sa následne mení, cez druhú kovalentnú väzbu, na DNA krížovú väzbu, ktorá môže byť na tom istom vlákne DNA (intravláknové krížové väzby, reprezentujúce najčastejšie sa vyskytujúce platínové adukty) alebo na opačnom vlákne (intervláknové krížové väzby, zodpovedné za protinádorovú aktivitu liečiva) (Hah *et al.*, 2006). Ak tieto lézie nie sú opravené, ich dôsledkom býva blokovanie DNA syntézy a transkripcie (Dobbelstein and Sorensen, 2015). Cisplatina tvorí intracelulárne elektrofilné vodné komplexy založené na bežne predominantných nižších chloridových koncentráciách. Na základe vysokej afinity k dusíkatým bázam guanínu a adenínu formuje cheláty a inhibuje expresiu DNA. Dvojvláknové zlomy (*double-strand breaks*, DSBs) a jednovláknové zlomy (*single-strand breaks*, SSBs) vznikajú platinovaním s poruchou funkcie templátu a bunkového delenia. Karboplatina funguje na ekvivalentnom mechanizme. Chelatácia a vznik DSBs a SSBs inhibuje syntézu DNA a transkripciu, čím spúšťa apoptózu. Platínové-DNA adukty sú prítomné primárne v lokusoch chromatinu s vysokou nukleárnou hustotou, v mitochondriách a v deliacich sa bunkách, kde je hustota aduktov najvyššia. Cytotoxicita a väzba na DNA sú najvyššie u buniek, ktoré boli platínovým derivátom vystavené počas G1 fázy, o niečo menej v G2/M fáze. Rozdiel v tvorbe krížových väzieb medzi týmito dvoma platínovými derivátmi je ten, že karboplatina reaguje neskôr po administrácii než cisplatina, a to približne o 6-12 hodín (Wagstaff *et al.*, 1989). Neskorší nástup účinku karboplatiny bol tiež popísaný ako jeden

z faktorov ovplyvňujúcich jej menšiu toxicitu (Naskou *et al.*, 2020; Stewart *et al.*, 2019; Wagstaff *et al.*, 1989).

Prítomnosť lézií, spôsobených platinovými derivátmi, aktivuje dráhy DNA poškodenia (*DNA damage response*, DDR), ktoré vedú k spomaleniu či až prerušeniu DNA syntézy, zastaveniu bunkového cyklu a aktivácii reparačných dráh, ktoré udržiavajú genómovú integritu (Jeggio *et al.*, 2016; Pilie *et al.*, 2019; Roos *et al.*, 2016).

#### **2.4.2 Rekurencia a jej liečba**

Napriek dobrej odpovedi v prvotnej liečbe OC, môže dochádzať k rekurencii (opakovanému výskytu) ochorenia (Friedlander *et al.*, 2011). Hlavnou možnosťou liečby rekurentného OC je chemoterapia. Dôležitým prognostickým faktorom je časový interval od konca predošlej liečby po opätovný výskyt ochorenia - interval bez liečby (*treatment-free interval*, TFI). Čas relapsu (návrat ochorenia k predchádzajúcemu stavu) sa tiež využíva pre určenie nádorovej senzitivity voči platinovým derivátom, na základe ktorých sú zaradené do štyroch kategórií:

- a) odolné (nádor je progresívny už v čase prvotnej liečby);
- b) rezistentné (rekurencia v časovom intervale 6 mesiacov po dokončení prvotnej liečby);
- c) čiastočne senzitivne (rekurencia v časovom intervale 6-12 mesiacov od prvotnej liečby);
- d) veľmi senzitivne (rekurencia po časovom intervale dlhšom ako 12 mesiacov) (Friedlander *et al.*, 2011).

Protokol výberu chemoterapie druhotnej liečby je založený na senzitivite voči platinovým derivátom. Pacienti s čiastočne alebo veľmi senzitivnými OC môžu byť liečení platinovými derivátmi v kombinácii s inými liečivami. Väčšinou sa aplikuje karboplatina alebo cisplatina v kombinácii s paclitaxelom, pegylovaný lipozomálny doxorubicín (PLD) alebo gemcitabínom (s alebo bez bevacizumabu) (Lopez-Guerrero *et al.*, 2015). Pre pacientov s čiastočne senzitivnými OC, kedy platinové deriváty nepredstavujú možnosť terapie, sa podáva PLD s trabektedínom (Lopez-Guerrero *et al.*, 2015). Prognóza pacientov s odolnými alebo rezistentnými OC voči platinovým derivátom je veľmi nepriaznivá. Kombinácia platinových derivátov s inými liečivami nie je možná, a preto sa využíva monoterapia s PLD, topotecanom, gemcitabínom alebo paclitaxelom. Kombinácia týchto liečiv s bevacizumabom signifikantne

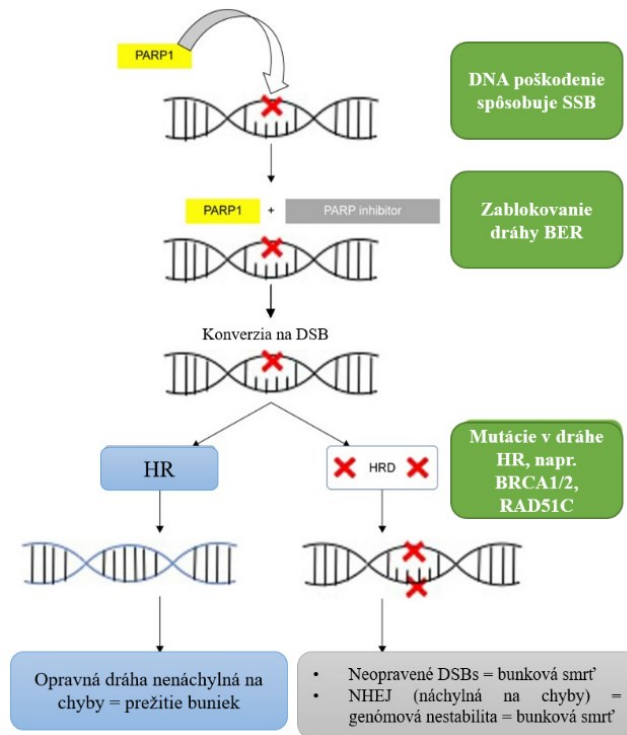
predlžuje prežívanie bez progresie (*progression-free survival*, PFS), avšak iba pacienti s dobrým výkonnostným stavom sú spôsobilí pre túto liečbu (Cortez *et al.*, 2018).

### 2.4.3 Cielená terapia

Chemoterapeutická liečba nádorových ochorení je založená na poškodení DNA nádorových buniek. Častokrát sú však poškodené aj nenádorové bunky. Cielená terapia zameraná na inhibíciu odpovede na DNA poškodenie v nádorových ochoreniach predstavuje potenciál väčšieho terapeutického okna a navrhovanie liečby pre pacientov na základe poškodenej opravnej funkcie. Defektná DDR dráha v OC nie je mediovaná jedným mechanizmom, ale je výsledkom rôznych (epi)genetických lézií vplyvujúcich na jednu alebo viac z piatich hlavných DNA reparačných dráh (Gee *et al.*, 2018; O'Connor, 2015). Cielená terapia OC sa zameriava nielen na vyvolanie DNA poškodenia, ale aj koordináciu DNA opráv, iniciáciu signálnych dráh, ktoré podporujú aktiváciu kontrolných bodov bunkového cyklu a spustenie apoptózy. V súčasnosti dochádza k zavádzaniu nových terapeutických prístupov, ktorými je cieľenie terapie na konkrétne molekuly a signálne dráhy. Vzhľadom na fakt, že defekty v DNA oprave sú charakteristické pre OC (*BRCA1*, *BRCA2*), zameranie sa na tieto dráhy je predmetom cielej terapie OC (Brown *et al.*, 2017).

Za jedno zo sľubných protinádorových liečiv je považovaný inhibítor PARP [poly(adenozín difosfát-ribóza) polymeráza]. PARP enzým zohráva kľúčovú rolu v bázovej excíznej oprave (*Base Excision Repair*, BER) a PARP inhibítory efektívne spôsobujú apoptózu u BRCA mutantných buniek a nenapádajú normálne bunky – v liečbe sa teda využíva koncept syntetickej letality (Turk and Wisinski, 2018). PARP inhibítor blokuje enzým PARP1. Inhibícia enzýmu PARP1 vedie zablokovaniu opravy SSBs, následnému zablokovaniu replikačnej vidličky a konečnému vzniku DSBs (Obr. 3). V prípade aplikácie tejto inhibície v OC s defektnou opravnou dráhou HR bunka využíva nehomológne spájanie koncov (*non-homologous end joining*, NHEJ), ktoré je však náchylné ku chybám a dochádza ku akumulácii poškodenia DNA a následne k apoptóze (Lightfoot *et al.*, 2020; Mariappan *et al.*, 2017). Pridanie PARP inhibítora (olaparib) ku kombinovanej terapii karboplatiny s paclitaxelom s následnou udržiavacou liečbou olaparibom u pacientov senzitivných na platinové deriváty významne zlepšil prežívanie u rekurentného HGSOV (*High-grade Serous Ovarian Cancer*) v porovnaní s pacientmi, ktorým bola aplikovaná len samotná chemoterapia (Guan and Lu, 2018).





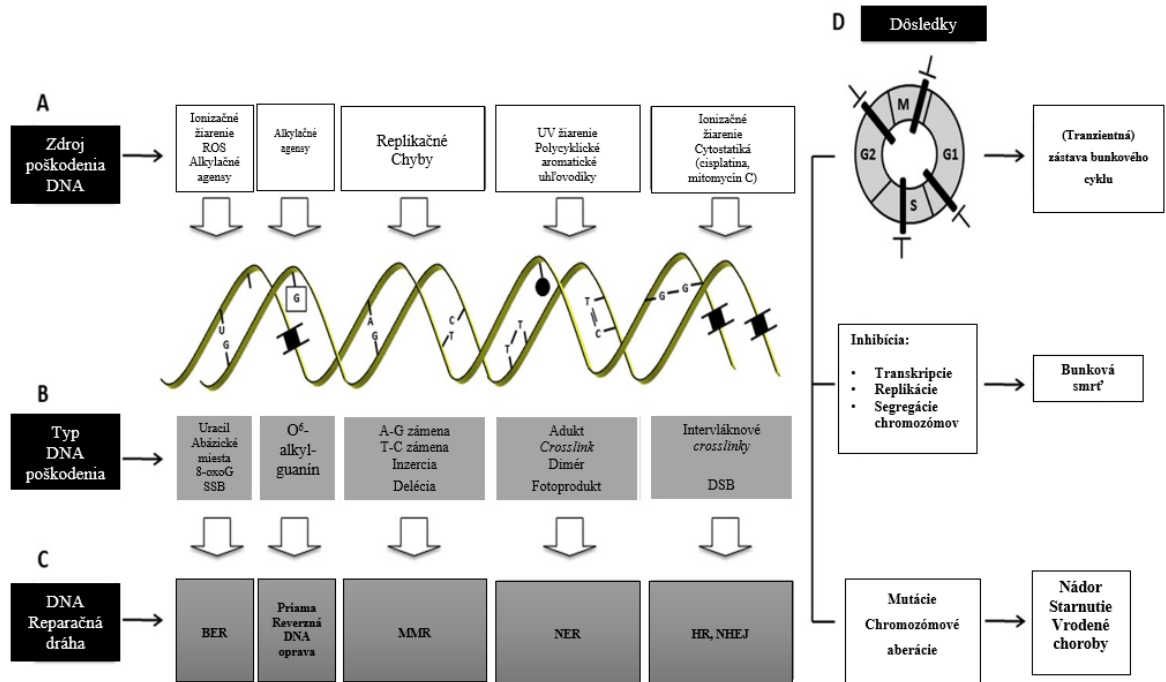
**Obrázok 3** Syntetická letalita pre PARP a *BRCA*. PARP1 je aktivovaná DNA poškodením v prítomnosti PARP inhibítora. Dráha BER je blokována a, v rámci replikácie, sa SSB stáva DSB. V normálnej, zdravej bunke s funkčnou HR dráhou je toto poškodenie opravené a bunka preživa. Bunky s deficientnou HR dráhou (HRD) (ako sú napr. mutácie *BRCA*) tento DSB nemajú opravený alebo je opravený pomocou NHEJ dráhy, ktorá je náchylná chybám, čo vedie k genómovej nestabilite a apoptóze (Prevzaté a upravené podľa Mariappan *et al.* 2017).

#### 2.4.4 DNA reparačné dráhy

Stabilita genómu je podporovaná zložitou mašinériou opráv, toleranciou poškodenia a signálnymi dráhami kontrolných bodov, ktoré pôsobia proti DNA poškodeniu (Hoeijmakers, 2009). Poškodenie DNA môže viesť k dejom ako sú zastavenie bunkového cyklu, regulácia DNA replikácie a oprava či obídanie DNA poškodenia. Rôzne formy DNA poškodenia vedú k rôznym reparačným mechanizmom a signálnym dráham (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003; Freund *et al.*, 2010; Hoeijmakers, 2009; Kang *et al.*, 2015).

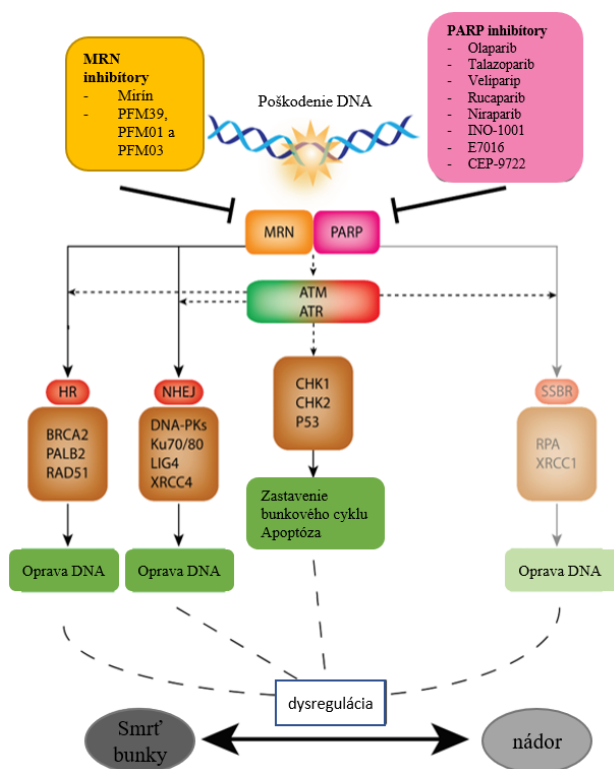
Vo všeobecnosti DNA poškodenie rozdeľujeme na SSBs a DSBs. Existuje niekoľko reparačných dráh, ktoré v cicavčích bunkách identifikujú a opravujú DNA poškodenia (Obr. 4). Modifikované bázy, abázické miesta a SSBs sú najčastejšou formou DNA poškodenia a sú opravované pomocou dráhy BER (Caldecott, 2014; Wilson *et al.*, 2010). Dráha MMR identifikuje a opravuje replikačné chyby, vrátane chybného párovania báz, nukleotidových delécií či inzercii (Jiricny, 2006). Dráha nukleotidovej excíznej opravy (*Nucleotide Excision Repair*, NER) sa zameriava na modifikované nukleotidy ktoré narúšajú štruktúru  $\alpha$ -helixu a UV-indukované poškodenia. Reparačnými dráhami, ktoré indukujú opravu DSBs, sú najmä

NHEJ a HR (Hoeijmakers, 2009). Dráha NHEJ je zodpovedná za opravu DSBs, spôsobených ionizujúcim žiarením a je považovaná za reparačnú dráhu náchylnú ku chybám. K oprave chýb totižto nepoužíva sesterskú chromatídu ako žiarenie templát, ako to je pri HR, ktorá je naopak považovaná za relatívne presnú a efektívnu reparačnú dráhu (Beucher *et al.*, 2009; Burma *et al.*, 2006; Kaelin, 2005; Moynahan and Jasin, 2010).



**Obrázok 4** Schéma DNA reparačných dráh a ich úloha v bunkovej biológii (Vodicka *et al.*, 2019).

Súčasťou opravnej dráhy HR je MRN komplex (MRE11-RAD50-NBS1), ktorý sa podieľa na detekcii, signalizácii a oprave DSBs. Boli objavené inhibítory proteínu MRE11 (*Meiotic Recombination 11*), ktorý je súčasťou MRN komplexu (Shibata *et al.*, 2014) (Obr. 5). Mirín [6-(4-hydroxyfenyl)-2-thioxo-2,3-dihydro-4(1H)-pyrimidín] je inhibítor MRE11-asociovej exonukleázovej aktivity. Predstavuje prvý popísaný inhibítor proteínu MRE11, izolovaný z knižnice 10 000 malých molekúl (DIVERSet, Chembridge Corporation), kde boli jeho zložky testované pre inhibičný efekt na fosforyláciu peptidov derivovaných z  $\gamma$ H2AX kinázou ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Dupre *et al.*, 2008). Mirín zabraňuje MRN-dependentnej aktivácii kinázy ATM, bez toho, aby pôsobil na proteín kinázovú aktivitu ATM. Viazá sa na aktívnu časť proteínu MRE11, čím blokuje schopnosť MRE11 otvárať dvojvláknovú DNA pre prístup k aktívnemu nukleázovému miestu. Mirín touto väzbou taktiež blokuje rotáciu fosfátov na reťazci DNA a tým inhibuje jeho exonukleázovú aktivitu a MRN mediovajú ATM aktiváciu (Dupre *et al.*, 2008; Shibata *et al.*, 2014). Exonukleázová aktivita proteínu MRE11 je potrebná pre funkciu dráhy HR v oprave DSBs (Shibata *et al.*, 2014).



**Obrázok 5** Dráhy opráv DNA poškodenia a príslušné inhibitory (prevzaté a upravené podľa Velic *et al.* 2015).

### MRN komplex v dráhe HR

Eukaryotické bunky si v priebehu evolúcie vyvinuli sofistikovaný a vysoko konzervovaný mechanizmus opravy DNA poškodenia. Homológna rekombinácia predstavuje DNA reparačnú dráhu, ktorá utilizuje intaktný templát s extenzívnou sekvenčnou homológiou s relatívne vysokou presnosťou opravy. Ako donor templátu využíva HR sesterskú chromatídu, a preto je táto reparačná dráha limitovaná len na neskorú S a G2 fázu bunkového cyklu (Huertas *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011).

V normálnych bunkách je MRN komplex považovaný za inhibítor tumorogenézy kvôli jeho úlohe v DDR dráhach, udržiavaní genómovej stability a zabraňovaní akumulácie DNA poškodenia. Vzhľadom na fakt, že všetky tri komponenty komplexu MRN sú zapojené do porúch, ktoré sú náchylné na vznik nádorového ochorenia, sa predpokladá, že zmeny v expresii komplexu MRN či jeho funkcii by mohli viesť k zapojeniu sa k vzniku malígnej transformácie (Bian *et al.*, 2019).

MRN komplex pozostáva z proteínov MRE11, RAD50 a NBS1. Proteín MRE11 obsahuje fosfodiesterázové motívy v N-koncovnej oblasti a vyznačuje sa mangán-dependentnou ssDNA (jednovláknová DNA, *single-strand DNA*) a 3'-5' dsDNA (dvojitá vlákna DNA, *double-strand DNA*) exonukleázovými aktivitami *in vitro* (Syed and Tainer, 2018). Samotný

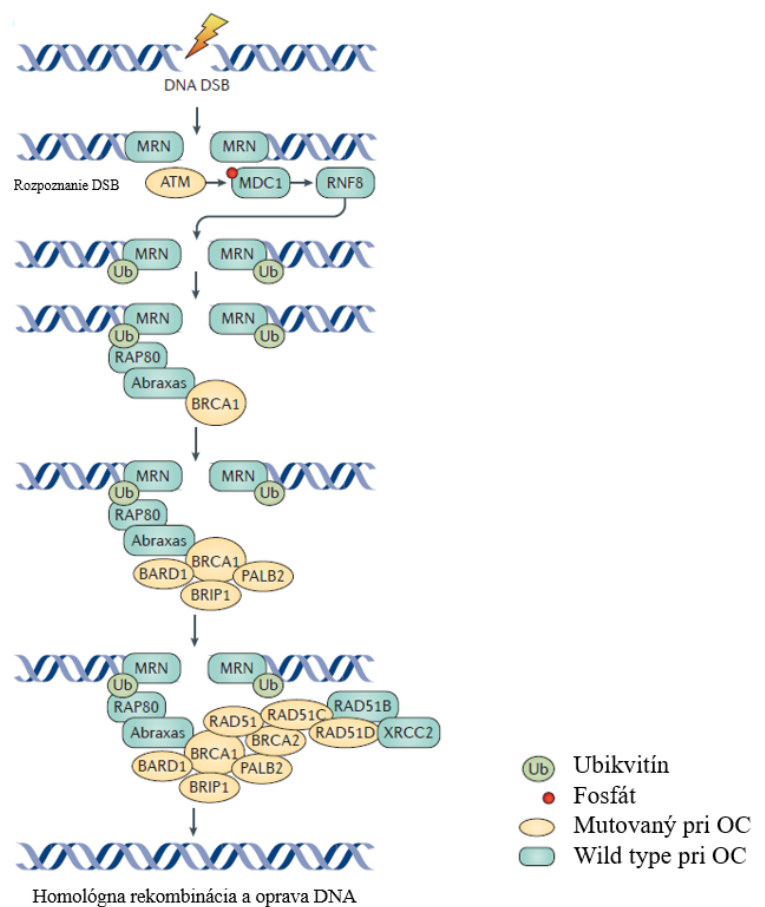
proteín MRE11 funguje aj ako endonukleáza, ale takúto aktivitu vykazuje len pri ssDNA a iba v rámci MRN komplexu (Anand *et al.*, 2016; Cannavo and Cejka, 2014). Proteín MRE11 dimerizuje a nezávisle od seba na seba viaže proteíny RAD50 a NBS1 v ich dimerizovanej forme (MRE11<sub>2</sub>RAD50<sub>2</sub>NBS1<sub>2</sub>), a stáva sa jadrom MRN komplexu. Proteín RAD50 je charakterizovaný ATPázovými motívami na N- a C-koncoch, ktoré sú separované *coiled coil* doménami. Dodatočné kontakty medzi *coiled coil* doménami stabilizujú intramolekulárnu dimerizáciu proteínu RAD50 v rámci MRN komplexu (de Jager *et al.*, 2001; Hopfner *et al.*, 2002; Syed and Tainer, 2018; Trujillo *et al.*, 2003). Proteín NBS1 je jediným komponentom MRN komplexu, ktorý hromadí jadrový lokalizačný signál (*Nuclear Localization Signal*, NLS) a ktorého interakcia s MRE11 je nevyhnutná pre translokáciu MRN komplexu do jadra. Naviazanie proteínu NBS1 stabilizuje dimérickú formu MRE11 počas resekcie koncov (Carney *et al.*, 1998; Desai-Mehta *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2017b; Tsukamoto *et al.*, 2005).

MRN komplex má za úlohu detegovať lézie, aktivovať kontrolné body signálnych dráh, spúšťať špecifické reparačné mechanizmy a štruktúrne udržiavať DNA molekuly stabilne blízko seba. Udržiavanie molekúl DNA blízko seba je sprostredkované hákovitou a *coiled coil* doménami RAD50 MRN komplexu a uľahčuje priebeh HR (Hohl *et al.*, 2011; Lobachev *et al.*, 2004; Seeber *et al.*, 2016; Wiltzius *et al.*, 2005). Bunková odpoveď na DSBs je iniciovaná, keď sa MRN komplex viaže na DNA konce v priebehu minúty od ich oddelenia (Karlsson and Stenerlow, 2004). MRN komplex skenuje molekulu DNA prostredníctvom facilitovanej difúzie za účelom detegovať voľné konce. Po naviazaní na DSBs, MRN komplex regrutuje ATM kinázu a aktivuje signalizačnú kaskádu kontrolných bodov (Stracker and Petrini, 2011).

Kinázy ATM a ATR (*Ataxia Telangiectasia Mutated and RAD53-related kinase*), patriace do rodiny PIKK (*PI3K-like protein kinases*), fosforylujú histón H2AX v blízkosti DSB, čím vytvárajú priestor (*platform*) pre regrutovanie DNA reparačných faktorov a moduláciu dostupnosti chromaínu (Rogakou *et al.*, 1998; van Attikum *et al.*, 2004). Na fosforylovaný histón  $\gamma$ H2AX sa viaže mediátorový proteín MDC1, ktorý prostredníctvom väzby na NBS1 regrutuje ďalší MRN komplex a kinázu ATM a fosforyluje ďalší histón H2AX (Lukas *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2003; Stucki *et al.*, 2005).

MRN komplex iniciuje degradáciu 5'konca DNA vlákna DSBs, proces nazývaný resekcia koncov. Výsledné ssDNA presahy sú viazané heterotrimerickým replikačným proteínom A (RPA). Na ssDNA, ktorá je označená proteínom RPA, dochádza k akumulácii rekombinázy RAD51, ktorej väzba je sprostredkovaná proteínom BRCA2. Proteín BRCA1 v mieste zlomu interaguje s proteínom PALB2, ktorý na toto miesto regrutuje BRCA2 (Zhang *et al.*, 2009). Katalytická aktivita rekombinázy RAD51 je ovplyvňovaná proteínom RAD52 a vedie

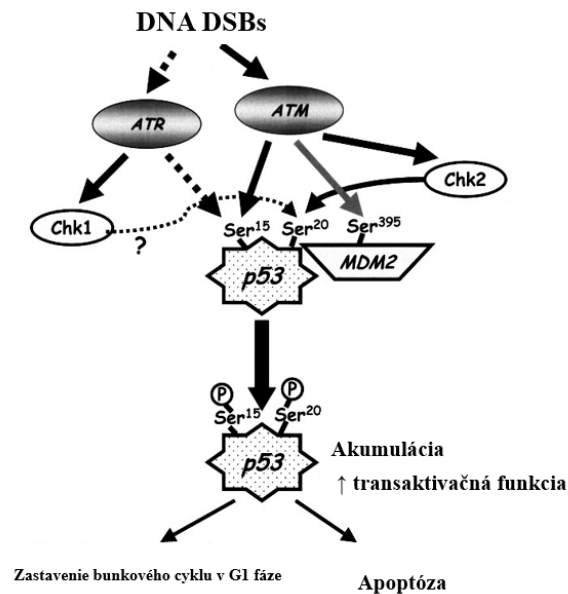
k rekombinácii, homológnemu párovaniu a invázii upraveného vlákna (New *et al.*, 1998; West, 2003). Vzniknuté komplexy ssDNA-RPA sú nevyhnutné pre naviazanie reparačných faktorov (Shiotani and Zou, 2009). Kináza ATR je regrutovaná na ssDNA s naviazaným RPA cez proteín ATRIP (*ATR-interacting protein*). Proteíny ATR a ATRIP sa navzájom ovplyvňujú – ATRIP je substrátom pre ATR a taktiež reguluje jeho expresiu (Cortez *et al.*, 2001; Gobbini *et al.*, 2013; Zou and Elledge, 2003). Vznik komplexu ATR-ATRIP vedie k pokračovaniu signalizácie kontrolných bodov, keďže jeho cieľom je napr. p53, BRCA1 či CHK1. Dochádza k aktivácii kontrolného bodu, zastaveniu bunkového cyklu a homológnej rekombinácii (Abraham, 2001; Gobbini *et al.*, 2013). Na Obr. 7 je zobrazená schéma homológnej rekombinácie v OC.



**Obrázok 7** Schematické zobrazenie reparačnej dráhy homológnej rekombinácie v OC (Matulonis *et al.* 2016).

Tak ako väčšina nádorových ochorení, aj OC sa vyznačuje mutáciami v géne *TP53*, kódujúci proteín p53, ktorý predstavuje hlavný G1/S kontrolný bod bunkového cyklu. Proteín p53 zohráva dôležitú rolu v regulácii bunkovej proliferácie, opravy DNA, apoptózy, genómovej stability, senescencie a metabolickej homeostázy. Proteín p53 býva aktivovaný rôznymi signálmi ako je poškodenie DNA, hypoxia, expresia onkogénov či osmotický stres. Aktivovaný

proteín p53 zastavuje bunkový cyklus vo fáze G1/S pred tým, ako by sa poškodená DNA mohla replikovať v S fáze. Proteín p53 spúšťa opravu DNA, a ak oprava nie je možná, indukuje apoptózu (Obr. 8). Strata funkcie proteínu p53 dovoľuje abnormálnym bunkám, ako sú nádorové bunky, proliferovať (Cole *et al.*, 2016; Nakamura *et al.*, 2019). S cieľom obnoviť funkciu p53 v nádoroch bolo vyvinutých niekoľko zlúčenín. V rámci cielej terapie sa využíva aj inhibítor proteínu MDM2, ktorý je negatívnym regulátorom proteínu p53. Jeho blokovanie by mohlo viesť k zvýšenej expresii p53 (Nakamura *et al.*, 2019).



**Obrázok 8** ATM/ATR dependentná signálna dráha vedúca buď k zastaveniu bunkového cyklu v G1 fáze alebo k apoptóze bunky prostredníctvom aktivácie p53 (prevzaté a upravené podľa Abraham 2001).

Možný cieľ protinádorovej terapie by teda mohol predstavovať G2/M kontrolný bod, kedy by inhibícia určitých proteínov zapojených v tomto kontrolnom bode mohla viesť k apoptóze nádorových buniek. Zablokovanie zastavenia bunkového cyklu vedie k mitotickej katastrofe. Tá vzniká dôsledkom nedostatočnej opravy DNA a následným masívnym poškodením DNA. V rámci cielej terapie OC bolo študovaných niekoľko inhibítorov opravy poškodenia DNA (Tomasova *et al.*, 2020).

Serín/treonín proteínkináza CHEK1 predstavuje esenciálnu súčasť dráhy signalizujúcej v rámci G2/M kontrolného bodu. CHEK1 je zodpovedná za fosforyláciu niekoľkých downstreamových efektorov, ktoré sú súčasťou bunkového cyklu – p53, proteíny zahrnuté v apoptóze, proteíny zahrnuté v inhibícii transkripcie a proteíny opravy DNA. CHEK1 sa v nádorových bunkách vyznačuje zvýšenou expresiou, naznačujúc potrebu nádorových buniek zastaviť bunkový cyklus v G2/M fáze pre esenciálnu opravu DNA (Kim *et al.*, 2015a; Zhang and Hunter, 2014). Centrálna kináza kontrolného bodu ATR je aktivovaná prítomnosťou DSB

alebo SSB na DNA, ktoré môžu viesť ku vzniku DSB a zastaveniu replikačnej vidličky. Aktivácia ATR vedie k bunkovej odpovedi, ktorá zahŕňa aktiváciu kontrolných bodov bunkového cyklu (CHEK1 a WEE1), zablokovanie bunkového cyklu, opravu DNA a nakoniec apoptózu (Kim *et al.*, 2015a; Zheng *et al.*, 2020). Aktivácia ATR-CHEK1 dráhy je spustená ssDNA obalenou RPA, nukleoproteínovou štruktúrou, ktorá je zvyčajne generovaná pri DNA poškodení a strese replikačnej vidličky. Regulačný partner ATR ATRIP priamo viaže RPA a rozoznáva tak komplex RPA-ssDNA pri poškodení DNA (Karnitz and Zou, 2015). Niekoľko *in vitro* štúdií ukázalo, že ATR inhibítory vedú k opätovnej senzibilizácii bunkových línii rezistentných k PARP inhibítorm, a preto sa ATR inhibítory častokrát používajú v kombinovanej liečbe spolu s PARP inhibítormi (Brill *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017a; Lloyd *et al.*, 2020).

ATM predstavuje esenciálnu súčasť DDR mašínérie z dôvodu jeho schopnosti fosforylovať substrát, ktoré aktivujú G1/S kontrolný bod, indukujú intra-S a G1/M zastavenie bunkového cyklu, DNA opravu, remodeláciu chromatinu, transkripciu a apoptózu. Samotný ATM je aktivovaný prítomnosťou DSB a jeho mutácie sú prítomné v rade nádorových ochorení, vrátane OC (Choi *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2020). Inhibícia ATM preukazuje schopnosť syntetickej letality v kombinácii s inhibítormi APE1 či stratou funkcie XRCC1 a predstavuje potenciálny úspech pri liečbe gynekologických karcinómov v kombinácii s PARP inhibítormi (Riches *et al.*, 2020; Sultana *et al.*, 2013; Sultana *et al.*, 2012). Proteín WEE1 sprostredkúva aktiváciu kináz CKD1 a CKD2, ktoré sú dôležité pre priebeh bunkového cyklu. V niektorých typoch nádorových ochorení, vrátane OC, bola vyzorovaná zvýšená expresia WEE1. Toto pozorovanie viedlo k testovaniu nového prístupu, ktorým bola inhibícia proteínu WEE1 (Saini *et al.*, 2015; Slipicevic *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2017).

Vplyvom žiarenia vznikajú poškodenia DNA ako je poškodenie báz, krížové väzby, SSBs a DSBs. Z tohto dôvodu by mohla rádioterapia predstavovať potenciálnu stratégiu v liečbe OC. Rádioterapia je však najmenej využívanou liečbou OC. Napriek tomu, že je OC rádiosenzitívny, jeho umiestnenie v peritoneálnej dutine komplikuje tento druh terapie a predstavuje prekážku. Orgány v peritoneálnej dutine sú tiež rádiosenzitívne a ich vystavenie žiareniu môže viesť napr. ku akútnej či chronickej toxicite GIT-u. S priaznivejšími výsledkami liečby chemoterapiou je rádioterapia prenechaná pre pacientov, ktorí sa vyznačujú chemorezistentnými a neoperovateľnými nádormi či s vysokým množstvom metastáz (Fields *et al.*, 2017; Huang and Zhou, 2020).

## 2.4.5 Cielenie na DDR dráhy v nádorovej terapii

Nádorové bunky sa okrem genómovej nestability vyznačujú stratou jednej alebo viacerých dráh opráv poškodenia DNA počas ich transformácie, čo vedie k ich závislosti na zvyšných reparačných dráhach (Hanahan and Weinberg, 2011; Jackson and Bartek, 2009). Komplex MRN zohráva dôležitú úlohu v DDR. Predstavuje jeden z prvých senzorov a respondentov na poškodenie DNA a sprostredkujú opravu DNA poškodenia ako odpoveď na DSBs (Syed and Tainer, 2018).

Kým mutácie v génoch *BRCA1/2* sú príznačné najmä pre hereditárne formy OC, mutácie v iných génoch boli vo vyššej miere identifikované u onkologických pacientov s vývojom multigénového panelového testovania (*multigene panel testing*) (Bianchini *et al.*, 2016; Kurian and Ford, 2015; Nicolas *et al.*, 2017). Asociácia medzi mutáciami práve v génoch komplexu MRN a náchylnosti na vznik nádorového ochorenia bola pozorovaná aj u OC (Brandt *et al.*, 2017; Koczkowska *et al.*, 2018). Konkrétne nebol detegovaný MRN komplex v OC (Brandt *et al.*, 2017) a bola detegovaná nízka expresia proteínu MRE11, pričom tento jav je asociovaný s vývojom nádorového ochorenia (Ye *et al.*, 2014).

Genómová nestabilita nádorových buniek predstavuje cieľ pre génotoxické agensy ako sú DNA poškodzujúce chemoterapeutiká, ako sú napríklad platinové deriváty, ktoré vedú k DNA poškodeniu a bunkovej apoptóze (Dasari and Tchounwou, 2014; de Sousa Cavalcante and Monteiro, 2014). Vyššia expresia MRN komplexu je taktiež spájaná s horšou prognózou nádorového ochorenia. U HGSOV vysoká expresia NBS1 a RAD50 koreluje s lepším výsledkom liečby. Avšak, u pacientov, ktorí podstúpili neoadjuvantnú chemoterapiu, je nárast HR génov, ako je BRCA2, asociovaný s horším výsledkom liečby. To naznačuje, že výber molekulárnych markerov by sa mal odlišovať podľa pacientov. V chemoterapii, vysoké hladiny NBS1 korelovali s kratším OS (*overall survival*) a ORR (*overall response rate*) (Kessous *et al.*, 2018; Monk *et al.*, 2014). Endonukleázová a exonukleázová aktivita MRE11 môže indukovať chemorezistenciu tým, že odstráni kovalentné adukty z DNA koncov. Môže tiež pôsobiť proti vývoju nádoru degradovaním zastavenej replikačnej vidličky, čo je jav často videný v nádorovom ochorení, a inhibíciou degradácie replikačnej vidličky môže indukovať chemorezistenciu (Ray Chaudhuri *et al.*, 2016; Zeman and Cimprich, 2014). Spomedzi inhibítorov MRN komplexu sa najčastejšie používa mirín, ktorý inhibuje MRE11 asociovanú exonukleázovú aktivitu, zabraňuje MRN dependentnej ATM aktivácii a ruší kontrolný v G2/M a proces HR v cicavčích bunkách (Dupre *et al.*, 2008).



Napriek širokému využitiu chemoterapie v protinádorovej liečbe častokrát dochádza k vývoju rezistencie voči týmto liečivám. Rezistencia na platinové deriváty môže byť do istej miery pripísaná opravnej dráhe HR. Väčšina OC sa vyznačovala defektnou opravou poškodenej DNA práve prostredníctvom HR. Tieto defektné opravné mechanizmy sú výsledkom genetických a epigenetických regulácií génov, ktoré sú súčasťou HR. Defektná oprava poškodenia DNA pomocou HR by mohla byť kľúčovým terapeutickým cieľom pri liečbe OC (Guo *et al.*, 2020).

## 2.5 Vznik rezistencie v odpovedi na terapiu karcinómu vaječníkov

Zmeny v DDR dráhach majú v OC duálny význam. V onkogenéze vedú zmeny v DDR ku genómovej nestabilite a sú jednou z hlavných charakteristických črt nádorového vývoja (Hanahan and Weinberg, 2011). Zárodočné mutácie v dráhe HR (*BRCA1/2*) vedú k 14-44% kumulatívne celoživotnému riziku vzniku EOC (Kuchenbaecker *et al.*, 2017), s čoraz zreteľnejším prispievaním ďalších génov (McCuaig *et al.*, 2018). Avšak, rovnaké zmeny v DDR dráhach predstavujú molekulárnu zraniteľnosť, ktorá predstavuje cieľ v protinádorovej terapii (Gee *et al.*, 2018). Jednými z génotoxických agensov, ktoré využívajú poruchy DDR dráh a vedú nádorovú bunku k apoptóze sú platinové deriváty. Zmeny v DDR dráhach môžu viesť k senzitivite či rezistencii voči týmto agensom (Kubelac *et al.*, 2020).

Platinové deriváty, cisplatina a karboplatina, sú liečivami prvej voľby v terapii OC, ako už bolo spomenuté v podkapitole **2.4.1 Chemoterapia s využitím karboplatiny**. EOC je jedným z najlepšie odpovedajúcich nádorových ochorení na cisplatinu aj karboplatinu, ktoré vedú ku akumulácii DSBs. Avšak po počiatočnej odpovedi môže dochádzať k relapsu ochorenia so vzniknutou rezistenciou voči platinovým derivátom (Damia and Broggin, 2019). Pacienti senzitívni na platinové deriváty odpovedajú na liečbu s úspešnosťou 30-90 %, zatiaľ čo rezistentní pacienti majú úspešnú odpoveď na nasledujúcu chemoterapiu len 15 % a výsledok liečby je slabý s mediánom prežívania neprevyšujúcim 12 mesiacov (Davis *et al.*, 2014).

Vývoj rezistencie je jednou z hlavných prekážok v liečbe nádorov. Existuje niekoľko mechanizmov, ktoré sa podieľajú na vývoji chemorezistencie, vrátane nádorovej heterogenity, mutácií v nádorových bunkách, farmakokinetických faktorov, redukovanej koncentrácie liečiva v cieľových bunkách, zmena v štruktúre cieľu pre liečivo a zvýšená oprava chemoterapiou spôsobených lézií (Damia and Broggin, 2019; Ishida *et al.*, 2010; Kishimoto *et al.*, 2017; Ohrvik *et al.*, 2013). Napriek tomu, že EOC nepredstavuje iba jedno ochorenie, ale môže

predstavovať rôzne histologické entity (napr. HGSOE, endometrioidný, mucinózny, *clear cell*, *low grade serous*) s rôznou biologickou, molekulárnou a klinickou charakteristikou, stále je liečený rovnakým terapeutickým prístupom, a to systémovým podávaním platinových derivátov (Kurman and Shih Ie, 2016; Labidi-Galy *et al.*, 2017). Liečba platinovými derivátmi má však stále vyššiu úspešnosť liečby než liečba bez využitia platinových derivátov (Damia and Broggin, 2019). Až 80 % pacientov sa vyznačuje priaznivou odpoveďou na prvý cyklus chemoterapie a takmer u 80 % z týchto prípadov bol zaznamenaný relaps ochorenia s rezistenciou voči liečivám prvej voľby (Tomao *et al.*, 2017).

Rezistencia na platinové deriváty môže mať pôvod v zníženej absorpcii platinových derivátov do bunky alebo zvýšeným *effluxom* vyvolaným zmenami v transportných proteínoch ako je napr. P-glykoproteín či *multidrug-resistance* proteíny (MRP) (Agarwal and Kaye, 2003; Damia and Broggin, 2019). Zvýšená aktivita DDR dráh spôsobená zmenami v reparačných proteínoch, zúčastňujúcich sa v DDR dráhach, bola tiež asociovaná z rezistenciou voči platinovým derivátom (Agarwal and Kaye, 2003). Molekulárna charakterizácia EOC odhalila, že viac ako 50 % HGCOS, ktoré predstavujú 89 % EOC, sa vyznačujú poruchami v HR, čo môže viesť k extrémnej senzitivite nádoru k platinovým derivátom (Konstantinopoulos *et al.*, 2015). Nádory s poruchami HR sa vyznačujú vyšším stupňom chromozomálnej nestability a sú neschopné opravovať DSB, podporujú senzitivitu na platinové deriváty (Damia and Broggin, 2019). Mnoho štúdií, vrátane *The Cancer Genomic Atlas* (TCGA), dokázali, že HGSOE je charakteristické poruchou v dráhe HR genetickými či epigenetickými zmenami v génoch, ktoré sú súčasťou tejto dráhy (Konstantinopoulos *et al.*, 2015).

Obnova funkcie dráhy HR v nádoroch s poruchou HR je kľúčovým mechanizmom získanej rezistencie voči platinovým derivátom. K obnove HR dráhy môžu viesť sekundárne mutácie, ktoré obnovujú čítací rámec génov *BRCA*, čím funkčne obnovujú ich proteínovú aktivitu (*BRCA* reverzia) (Hay *et al.*, 2009; Patch *et al.*, 2015; Rottenberg *et al.*, 2008). Reverzné mutácie boli taktiež pozorované u iných génov HR dráhy (napr. *RAD51*) a tiež sú považované za príčinu vzniku získanej rezistencie (Weigelt *et al.*, 2017). Ďalšími mechanizmami vedúcimi k obnove funkcie proteínov *BRCA* a rezistencii je strata promótoru génu *BRCA1* metyláciou alebo funkčná obnova mutovaného proteínu *BRCA1* prostredníctvom interakcie s HSP90, čo vedie k podpore vedenia rekombinázy *RAD51* k DNA a následnému DNA poškodeniu (Johnson *et al.*, 2011). Genóm OC javí významný stupeň adaptability v odpovedi na selektívny tlak terapie s obnovou dráhy HR, čím umožňuje prežívanie nádorových buniek v prítomnosti platinových derivátov (Madariaga *et al.*, 2019).

Poruchy v DDR dráhach predstavujú potenciál pre lepšie využitie vhodnejších terapeutických ciest, ktorými by sa dala liečba pre pacienta „ušiť na mieru“ na základe genómických charakteristík pacienta (Bian *et al.*, 2019). Poruchy HR sú v súčasnosti klinicky najviac relevantné molekulárne stratifikácie u OC a predstavujú dôležité biomarkery v odpovedi na chemoterapiu platinovými derivátmi (Madariaga *et al.*, 2019).

### **3. Hypotéza a ciele práce**

#### **Hypotéza**

Z dostupnej publikovanej literatúry a predošlých výsledkov Oddelenia molekulárnej biológie nádorov na Ústave experimentálnej medicíny AV ČR v.v.i. vyplýva, že DNA reparačné dráhy môžu mať vplyv na terapiu karcinómov a taktiež aj na vznik rezistencie voči chemoterapeutikám. Protinádorový účinok karboplatiny vedie k vzniku dvojlákových zlomov, ktoré sú opravované dráhou homológnej rekombinácie. Súčasťou tejto dráhy je aj MRN komplex (MRE11-RAD50-NBS1), ktorý zohráva dôležitú úlohu v opravách poškodenia DNA a zároveň je asociovaný so zhoršenou odpoveďou na terapiu u nádorových pacientov. Vzhľadom na to, že proteín MRE11 je súčasťou MRN komplexu, predpokladáme, že jeho inhibíciou by bolo možné zvýšiť citlivosť na karboplatinu, ktorá predstavuje štandardne využívané chemoterapeutikum v liečbe OC. Z dôvodu anticipácie zvýšenej aktivity reparačných dráh na vzniku rezistencie voči chemoterapeutikám, chceme v našej diplomovej práci objasniť úlohu inhibície proteínu MRE11 nielen v odpovedi na liečbu OC, ale aj v mechanizmoch asociovaných so vznikom rezistencie.

#### **Ciele diplomovej práce**

Hlavným cieľom našej práce je zistenie vplyvu inhibície HR pomocou MRE11 inhibítora mirínu na citlivosť bunkovej línie karcinómu vaječníkov voči karboplatine. Pre dosiahnutie tohto cieľa, musíme splniť nasledujúce čiastkové ciele:

- Definovať vplyv samotného mirínu, ako inhibítora proteínu MRE11, na bunkovú líniu karcinómu vaječníkov, OVCAR3 s nasledujúcimi podcieľmi:
  - definovať vplyv inhibície HR pomocou MRE11 inhibítora mirínu na bunkovú proliferáciu a bunkový rast,
  - definovať vplyv inhibície HR na akumuláciu DNA poškodenia.
- Definovať vplyv mirínu, ako inhibítora proteínu MRE11 na bunkovú senzitivitu voči karboplatine, na bunkovej línii karcinómu vaječníkov, OVCAR3 s nasledujúcimi podcieľmi:
  - definovať vplyv karboplatiny na bunkovú proliferáciu a bunkový rast,
  - definovať vplyv inhibície HR pomocou mirínu na buncennú senzitivitu voči karboplatine,

- definovať vplyv inhibície HR pomocou mirínu na akumuláciu DNA poškodenia a opráv.
- Definovať vplyv inhibície HR pomocou mirínu na bunkovú líniu so získanou rezistenciou voči karboplatine s nasledujúcimi podcieľmi:
  - charakterizácia rezistentnej línie,
  - vplyv inhibície HR pomocou mirínu na citlivosť voči karboplatine u bunkovej línie so získanou rezistenciou.

## 4. Materiál a metódy

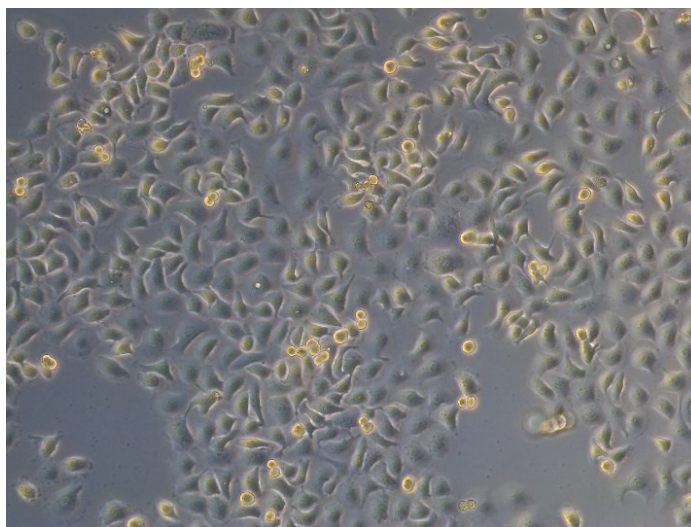
### 4.1 Bioinformatická analýza expresie génu MRE11 asociovaná s prežívaním pacientov s OC

K určení hladiny expresie *MRE11* a jej asociáciu s prežívaním pacientov, ktorým bolo diagnostikované ochorenie OC, sme použili online prístupný server GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*). Tento online server poskytuje interaktívne profilovanie génovej expresie založené na dátach zo vzoriek nádorového a zdravého tkaniva, ktoré boli získané od TCGA a GTEx (*Genotype-Tissue Expression Portal*) (Tang *et al.*, 2017). Tento online server je dostupný na webovej stránke: <http://gepia.cancer-pku.cn>.

## 4.2 *In vitro* funkčná analýza

### 4.2.1 Nádorové bunkové línie

V rámci štúdie reparačných dráh pri poškodení DNA boli pre *in vitro* funkčnú analýzu použité nádorové bunkové línie OVCAR3 (Obr. 9), ktoré nám pre experimentálne účely poskytla RNDr. Mgr. Radka Václavíková, Ph.D. (Oddelenie toxikogenomiky, SZÚ, Praha). Nádorová bunková línia bola odvodená z malígnych ascitov pacientky s progresívnym adenokarcinómom vaječníkov. Nádorová bunková línia OVCAR3 predstavuje adherentnú bunkovú líniu vyznačujúcou sa morfológiou epitelového typu.



**Obrázok 9** Nádorová bunková línia karcinómu vaječníkov OVCAR3. Vyššia konfluencia. Zväčšenie: 10x0,22.

### 4.2.2 Kultivácia a pasážovanie

#### Kultivácia

Kultivácia vybraných nádorových línií prebiehala v tekutom médiu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, Anglicko) s L-glutamínom (300 mg/l//2,05mM) a NaHCO<sub>3</sub> (2,2 g/l), ktoré predstavovalo základ kultivačného média. K základnému médiu sa štandardne pridali zložky o konkrétnych objemoch pre zlepšenie kultivačných podmienok bunkovej línie, ako zobrazuje Tab.1. Pridaním fetálneho bovinného séria (FBS) (Biosera, Francúzsko) boli médiu dodané rastové faktory a hormóny dôležité pre *in vitro* kultiváciu a rast. Doplnením antibiotík (Pen./ml/10mg Strep. pro ml) (Biosera, Francúzsko) bola zabezpečená prevencia voči kontaminácii. Pre udržanie fyziologického pH bol použitý HEPES pufor (pK<sub>a</sub> 7,5).

**Tabuľka 1:** Zložky a objemy pre prípravu kompletného kultivačného média

Zložky	Objem [ml]
Základné médium	500
Antibiotiká	5
Sodium Pyruvát	5
HEPES	7,5
FBS	57,5
<b>Celkový objem</b>	<b>575</b>

### Pasážovanie

Pred samotným pasážovaním vždy prebehla mikroskopická kontrola bunkovej línie, zameriavajúca sa na úroveň jej konfluencie, ktorá by mala predstavovať 70-80% pokrytia kultivačného povrchu.

Pasážovaniu taktiež predchádzalo zohriatie kompletného kultivačného média, sterilného PBS pufru (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) a 0,25% roztoku Trypsin-EDTA (Biosera, Francúzsko) na 37 °C vo vodnom kúpeli (Memmert WNB 14, Nemecko). S bunkovými líniami sa pracovalo štandardne v sterilnom laminárnom boxe (Thermo Scientific MSC-Advantage<sup>™</sup> Class II Cabinet, USA).

Objem pôvodného média bol odsatý z kultivačnej misky a jej povrch bol premytý 4 ml sterilného PBS pufru, ktorý bol následne odsatý. V ďalšom kroku bol povrch misky premytý 1 ml 0,25% roztoku Trypsin-EDTA a po približne 1-2 min sme väčšinu z tohto objemu odsali. Bunky boli za účelom trypsinizácie vložené do termostatu na 2-4 min. Po pôsobení trypsinu bolo pridaných 10 ml kompletného kultivačného média, v ktorom sa bunky uvoľnili a následne resuspendovali.

Bunková suspenzia sa riedila pre ďalšiu kultiváciu na základe bunkovej hustoty, najčastejšie to bolo v pomere 7 ml kompletného bunkového média k 3 ml bunkovej suspenzie. Nová kultivačná miska bola označená dátumom pasážovania, poradím pasáže, typom bunkovej línie a iniciálami experimentátora.



### 4.2.3 Počítanie a nasadenie buniek

Množstvo buniek na 1 ml bunkovej suspenzie bolo zistené pomocou počítania buniek v Bürkerovej komôrke. Adherentné bunky boli v prvých krokoch spracované podľa postupu uvedenom v predchádzajúcej stati práce (podkapitola **Kultivácia a pasážovanie**, časť Pasážovanie). V nasledujúcom kroku sme v mikroskúmvavke v pomere 1:1 premiešali bunkovú suspenziu s 0,4% roztoku trypanovej modrej (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Nemecko). Roztok trypanovej modrej farbí mŕtve bunky na modro a tie do výsledného počtu nerátame. Bunková suspenzia bola o malom objeme nanosená na mriežku Bürkerovej komôrky. Bunky boli počítané pod mikroskopom (Leica DMI1, Čína).

Koncentrácia buniek v 1 ml bola vypočítaná podľa počtu napočítaných buniek. Na základe výslednej koncentrácie sme vypočítali riedenie potrebné pre nasledujúce funkčné analýzy. Nariedená bunková suspenzia bola nasadená do kultivačných nádob v určených objemoch, ako zobrazuje Tab.2. Všetky experimenty prebiehali v triplikátoch, na základe ktorých bola následne vyhodnotená štatistická analýza.

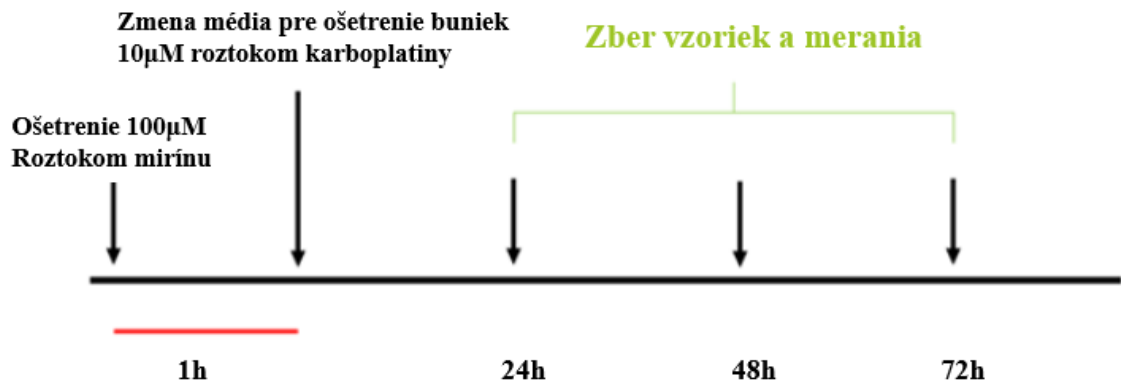
**Tabuľka 2:** Objemy a množstvá buniek pre jednotlivé funkčné analýzy

Funkčný test	Kultivačná doštička	Počet buniek na jamku	Objem suspenzie na jamku [μl]
Analýza proliferácie metódou WST-1 Reagent	96-jamková	10 000	100
Analýza prežívania metódou CFA	6-jamková	500	2 000
Analýza génovej expresie	6-jamková	200 000	1 000
Proteínová analýza	6-jamková	200 000	1 000
Analýza poškodenia DNA	6-jamková	200 000	1000
Analýza bunkového cyklu	6-jamková	200 000	1 000
Analýza rastu	12-jamková	25 000	1 000

### 4.2.4 Oplyvnenie buniek roztokmi mirínu a karboplatiny

Bunková línia OVCAR3 bola ovplyvnená ovplyvňovaná roztokom mirínu a karboplatiny (CbPt). Základné roztoky mirínu a CbPt odpovedali koncentráciám 45 mM, respektíve 125 mM v 100% DMSO (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Nemecko). Základné objemy sa riedili v kompletnom kultivačnom médiu, aby koncentrácie roztokov zodpovedali potrebám jednotlivých experimentov. Výsledná koncentrácia DMSO nepresiahla 0,001%. Hodnota koncentrácie IC20 pre roztoky bola experimentálne vypočítaná na základe koncentrácie zodpovedajúcej hodnote IC50 programom GraphPad Prism 9.1.2 (226) (GraphPad Software, USA). Na hodnotenie vplyvu inhibície MRE11 pomocou mirínu na citlivosť buniek voči CbPt sme používali 1-

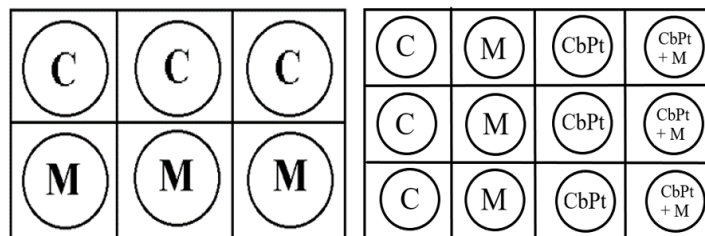
hodinové ovplyvnenie OVCAR3 buniek 100 $\mu$ M (Dupre *et al.*, 2008) roztokom mirínu a následné ovplyvnenie roztokom CbPt (Obr. 10).



**Obrázok 10** Schéma priebehu experimentu zobrazená na časovej osi.

#### 4.2.5 Hodnotenie bunecného rastu

Bunecný rast sme hodnotili v časovej závislosti, po 24, 48 a 72 hodinách. Bunky sme vopred naniesli v triplikátoch do 12-jamkovej doštičky o počte 25 000/ml. Následne boli bunky ovplyvnené požadovaným roztokom. Na hodnotenie vplyvu mirínu na životnosť buniek sme použili koncentráciu 4 $\mu$ M (IC<sub>20</sub>), na hodnotenie efektu inhibície MRE11 pomocou mirínu sme bunky ovplyvňovali podľa schémy na Obr. 11. Po 24, 48 a 72 hodinách sme mikroskopicky skontrolovali stav bunecnej línie. Následne sme v daných časoch spočítali počet buniek, ako je uvedené v podkapitole **4.3 Počítanie a nasadenie buniek**. Na základe získaných hodnôt sme vypočítali rastovú krivku, ktorá zobrazovala klesajúci alebo stúpajúci trend rastu bunecnej línie. Obdobný postup sme použili pri bunkovej línii OVCAR3 rezistentnej na karboplatinu (CbPt R2).



**Obrázok 11** Schéma nasadenia analyzovaných buniek (OVCAR3) do 6- a 12-jamkových doštičiek s vyznačením jamiek podľa látok, ktorými boli bunky ovplyvnené. Kontrola (C) predstavuje bunky OVCAR3 bez ovplyvnenia, bunky ovplyvnené mirínom sú označené „M”, bunky ovplyvnené karboplatinou sú označené „CbPt” a bunky s kombinovaným ovplyvnením sú označené „CbPt + M”.

## 4.2.6 Hodnotenie bunkovej proliferácie, klonogénneho potenciálu a cytotoxicity

### Analýza bunkovej proliferácie pomocou WST-1 Reagent-u

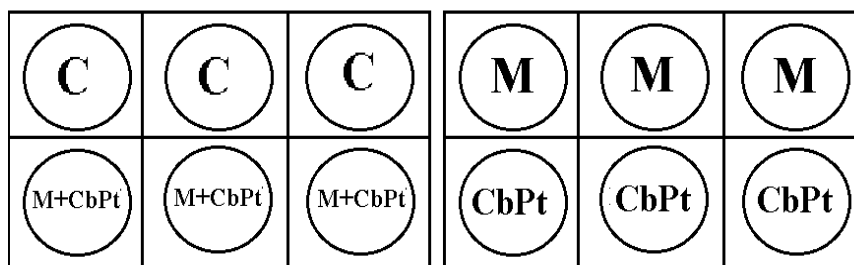
Prostredníctvom WST-1 Reagent-u (Roche, Nemecko) sme analyzovali proliferáciu buniek na základe zmeny sfarbenia média. Metabolicky aktívne bunky pomocou aktivity mitochondriálnych dehydrogenáz produkujú farebný formazán, ktorý je rozpustný v kultivačnom médiu, redukciou stabilnej tetrazólievej soli WST-1. Bunková proliferácia je hodnotená priamou koreláciou medzi množstvom formazánového produktu a počtom metabolicky aktívnych buniek v bunkovej suspenzii.

Bunkovú proliferáciu sme hodnotili v časovej závislosti, po 24, 48 a 72 hodinách, a v koncentračnej závislosti, s využitím koncentračného radu roztokov mirínu a CbPt. Do buniek vopred nanesených do 96-jamkovej doštičky a ovplyvnených roztokmi mirínu a CbPt sme pridali objem 12 µl, ktorý zodpovedal 1/10 celkového objemu. Do jamiek určených pre kontrolu sme pridávali 10 µl. Takto pripravená 96-jamková doštička bola následne vložená do absorbančného reader-a (BioTek ELx808, USA). Absorbancia vzoriek bola meraná pri vlnovej dĺžke 450 nm, čo zodpovedá maximálnej absorbancii formazánu, a 690 nm, ktorá predstavuje referenčnú vlnovú dĺžku, pri ktorej majú WST-1 Reagent s formazánom rovnakú absorbanciu. Pre spracovanie dát sme použili program BioTek Gen5™ Data Analysis (BioTek, USA).

### Hodnotenie klonogénneho potenciálu buniek pomocou CFA metódy (*Colony Forming Assay*)

Metódou CFA sa hodnotí dlhodobé prežívanie a klonogénny potenciál buniek pri vytváraní kolónií na základe schopnosti bunky založiť novú bunkovú kolóniu s minimálnym počtom 50 buniek.

Suspenzia buniek OVCAR3 bola nanesená na 6-jamkové doštičky o objeme 2 ml. Po nasledujúcej 24-hodinovej inkubácii v termostate boli bunky ovplyvnené pre analýzu kombinovaného vplyvu roztokov mirínu a karboplatiny na bunkovú líniu OVCAR3, ako zobrazuje schéma na Obr. 12. Následne boli bunky opätovne vložené do termostatu. Po ďalších 24 hod sme kompletne kultivačné médium vymenili za nové. Na tento krok nadväzovala kultivácia po dobu 12 dní za štandardných kultivačných podmienok v termostate.



**Obrázok 12** Schéma nasadenia analyzovaných buniek (OVCAR3) do 6-jamkových doštičiek.

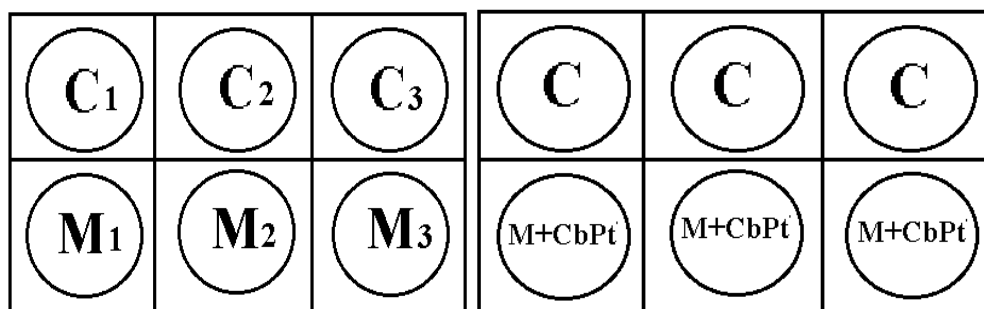
Na 12. deň po ovplyvnení bunkovej suspenzie bolo kultivačné médium odsaté. Povrch jamiek doštičky bol dvakrát premytý 1 ml PBS pufrou. Po dobu 20 min sme fixovali adherentné kolónie v 1 ml 3% roztoku formaldehydu (Penta, Czech Republic). Odsatie formaldehydu predchádzalo dvojitému premytiu 1ml PBS pufrom. Po dobu 20 min boli farbené fixované kolónie v 1 ml 0,1% roztoku kryštálovej violeti (Sigma-Aldrich®, USA). Odsatie farbiva predchádzalo dvojnásobnému premytiu 1ml PBS pufrom. Posledným krokom tejto metódy je manuálne počítanie kolónií.

#### 4.2.7 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

S cieľom určiť zmenenú génovú expresiu vybraných génov sme izolovanú RNA spracovali metódou reverznej transkripcie (RT) a kvantifikáciou expsie pomocou kvantitatívnej PCR v reálnom čase (real-time qPCR), vďaka ktorej bolo možné priebežne analyzovať intenzitu fluorescenčného signálu počas amplifikácie a určiť tak kvantifikované množstvo DNA v reakcii.

#### Izolácia RNA

Samotnej izolácii RNA predchádzalo nanosenie bunkovej línie OVCAR3 na 6-jamkovú doštičku. Bunky boli ovplyvnené roztokom mirínu o rovnakej koncentrácii, no iba po dobu jednej hodiny a následne boli ovplyvnené roztokom CbPt, ako zobrazuje schéma na Obr.11 a 13. Pripravená bunková línia bola následne zmrazená na -80 °C.



**Obrázok 13** Schéma nasadenia analyzovaných buniek (OVCAR3) do 6-jamkových doštičiek.

Z takto ovplyvnených bunkových línií sme izolovali RNA využitím kitu miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Nemecko) podľa daného protokolu. Výslednú koncentráciu izolovanej RNA sme merali sprektrofotometrom (Thermo Scientific NanoDrop 2000, USA).

#### Reverzná transkripcia (RT)

Na základe koncentrácií vyzolovanej RNA boli vzorky nariedené Nuclease-free H<sub>2</sub>O do objemu 50 µl vo výslednej koncentrácii 20 ng/1µl. K nariedeným vzorkám boli pridané reagentie reakčnej zmesi o konkrétnych objemoch pre reverznú transkriptázu, ktorá pozostávala z reagentií uvedených v Tab.3.

**Tabuľka 3:** Zoznam reagentií a ich objemov pre reakčnú zmes na reverznú transkripciu

Reagentie	Objem na jednu reakciu [µl]
10x RT Buffer	5
NTP (100mM)	2
10x Random Primer	5
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	10,5
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µl)	2,5
Spolu	5
<b>Celkový objem reakcie (s RNA)</b>	<b>10</b>

Pre získanie cDNA z izolovanej RNA sme použili High-Capacity RNA-to-DNA™ Kit (Applied Biosystems™, USA). Proces reverznej transkripcie prebehol v termocykléri (MJ Research Gradient Thermal Cycler PTC-200, USA), do ktorého sme vložili pripravené vzorky. Po ukončení procesu reverznej transkripcie sme vzorky cDNA v pomere 1:1 nariedili s Nuclease-free H<sub>2</sub>O.

#### Kvantitatívna PCR v reálnom čase

Pre analýzu prostredníctvom real-time qPCR bol použitý Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (ThermoFisher, USA). V real-time qPCR s kontrolnou a ovplyvnenými vzorkami boli analyzované gény, rozložené na 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke, ako zobrazuje Tab.4. Referenčnými génmi k hodnoteniu boli housekeepingové gény GAPDH a ACTB.

**Tabuľka 4:** Schéma rozloženia skúmaných génov na 96-jamkovej doštičke pre real-time qPCR

	HR	NHEJ	BER		NER		MMR	Apoptóza and autofágia		Gény asociované s reguláciou bunkového cyklu		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>A</i>	RAD51	BRCA1	LIG4	MUTYH	PARP1	RPA1	MSH2	PMS2	CASP3	ATG5	CHEK2	POLE4
<i>B</i>	RAD51c	BRCA2	NHEJ1 (XLF, Cernunnos)	NTH1	TDP1	RPA2	MSH3	MLH1	BAX	ATG7	ATM	RAD21
<i>C</i>	RAD51d	RAD50	DCLRE1C (Artemis)	NEIL1	POLP	ERCC2/XPD	MSH6	BAD	BCL2	ATG12	ATR	TOPBP1
<i>D</i>	RAD51H1	MRE11	UNG	NEIL2	XPC	ERCC3/XPB	POLD1	BAK1	LC3	AKT	WIP1	TP53
<i>E</i>	XECC2	NBS1	SMUG1	NEIL3	RAD23b	ERCC4/XPF	POLD2	BCL10	mTOR	HIF1	SOD2	TP53BO1
<i>F</i>	XRCC3	XRCC4	MDB4	APEX1	XPA	ERCC6/CSB	POLD3	BeIXL	DAPK1	H2AFX	POLE1	
<i>G</i>	RAD52	XRCC6 (Ku70)	TDG	LIG3	DDB1	ERCC8/CSA	POLD4	BeIXS	CASP9	cMYC	POLE2	ACTB
<i>H</i>	RAD54I	XRCC5 (Ku80)	OGG1	XRCC1	DDB2	LIG1	PMS1	BIK	Beclin1	CHEK1	POLE3	GAPDH

Reakčné zmesi pre všetky analyzované gény sa líšili len v použitých primeroch, inak boli pripravované rovnako, ako zobrazuje Tab.5. Reakčnú zmes sme rozpipetovali do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky po 18  $\mu$ l. K reakčnej zmesi bola pridaná analyzovaná vzorka cDNA o objeme 2  $\mu$ l, tak celkový objem na jednu jamku zodpovedal 20  $\mu$ l.

**Tabuľka 5:** Zloženie reakčnej zmesi pre real-time qPCR s génmi zobrazenými v tab.4

Reagencie	Objem na jednu reakciu [ $\mu$ l]
Vzorka (vybraný gén)	2
2x MasterMix	10
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	7
Primer	1
Spolu	19
<b>Celkový objem reakcie (s RNA)</b>	<b>20</b>

Po napipetovaní všetkých zložiek potrebných pre priebeh reakcie v rámci metódy real-time qPCR sme doštičku prelepili adhezívnou fóliou a vložili do Real-Time PCR termocykléra (Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System, USA). Podmienky amplifikácie a teplotného profilu (Tab.6) sme nastavili v programe 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection Software (Applied Biosystems™, USA).

**Tabuľka 6:** Teplotný profil metódy real-time qPCR

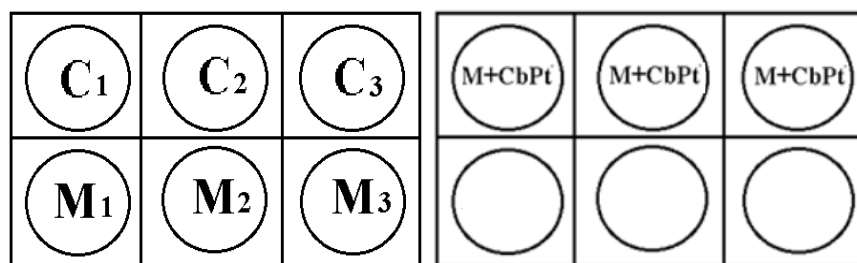
Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Stage 1	50	2 min	40
Stage 2	95	2 min	
Stage 3	95	15 s	
	62	1	

#### 4.2.8 Proteínová analýza

Po ovplyvnení bunkovej línie OVCAR3 samostatným roztokom mirínu a kombinovaným ovplyvnením roztokom mirínu a po uplynutí jednej hodiny následným ovplyvnením roztokom CbPt sme sledovali, ako boli ovplyvnené pri oboch ovplyvneniach proteíny MRE11,  $\gamma$ H2AX, p53 a RAD51 (Cell Signaling Technology, USA). Vybrané proteíny boli izolované a následne analyzované prostredníctvom elektroforetickej separácie a techniky Western blot.

##### Izolácia proteínov

Pred samotnou izoláciou sme si pripravili RIPA lyzačný pufr (Sigma-Aldrich®, USA) tým, že k použitému objemu RIPA pufru sme pridali inhibítory proteáz (Roche, Nemecko) v pomere 20  $\mu$ l inhibítorov na 1 ml pufru. V rámci proteínovej analýzy sme hodnotili kontrolné bunkové línie spolu s bunkovou líniou ovplyvnenou roztokom mirínu, prípadne roztokom mirínu v kombinácii s roztokom CbPt, ktoré boli rozložené na 6-jamkovej doštičke, ako to zobrazuje Obr. 14. S doštičkou sme pracovali na suchom ľade. Zo všetkých jamiek sme odsali médium a pomocou PBS premyli jej povrch. Do každej jamky sme potom pridali 60  $\mu$ l lyzačného pufru a adherentné bunky šetrne zoškrabali z kultivačného povrchu.



**Obrázok 14** Schéma rozloženia analyzovaných buniek (OVCAR3) na 6-jamkovej doštičke

Bunky boli prenesené do mikroskúmaviek a po dobu 15 min inkubované na suchom ľade. Následne sme bunky rozmrazovali pri laboratórnej teplote. Po tomto kroku boli

mikroskúmvky po dobu 20 min inkubované na ľade, aby sme dosiahli lýzu bunkových membrán. Po inkubácii boli mikroskúmvky umiestnené do centrifúgy, vopred ochladenej na 4 °C, a pri tejto teplote sa centrifugovali po dobu 20 min pri 20 000xg. Vzniknutý supernatant sme odobrali do nových, pripravených mikroskúmviek. Vyizolované proteíny sa uchovávali pri teplote -80 °C.

Koncentráciu izolovaných proteínov sme merali pomocou Bradford Protein Assay (Sigma-Aldrich®, USA). Metóda sa zakladá na princípe reakcie detekčného činidla Bradford Reagent (Sigma-Aldrich®, USA) s určitými aminokyselinami, čím vzniká farebný produkt. Intenzitu farebného produktu sme merali absorbanciou pri vlnovej dĺžke 630 nm spektrofotometricky. Pred samotným meraním intenzity farebného produktu sme si pripravili kalibračnú krivku skladajúcu sa zo štandardov o známej koncentrácii bovinného sérového albumínu (BSA) (BioRad Quick Start Set, USA). Analyzované vzorky sa merali spektrofotometricky spoločne so štandardami. Porovnaním koncentrácií proteínov analyzovaných vzoriek s hodnotami absorbancie štandardov sme stanovili koncentráciu analyzovaných proteínov.

### Elektroforetická separácia

Pred samotnou elektroforetickou separáciou proteínov sme si pripravili rozdeľovací (*resolving*) a zaostrovací (*stacking*) gél prostredníctvom reagencií o konkrétnych objemoch, (Tab. 7, 8 a 9). Stuhnuté gély sme vložili vo vertikálnom usporiadaní do elektroforetickej aparatúry a zaliali elektródovým pufrom (1xEP).

**Tabuľka 7:** Zoznam reagencií a ich objemov pri príprave 10% rozdeľovacieho gélu SDS-PAGE

Reagencie	Množstvo
H <sub>2</sub> O	4,02 ml
1,5M Tris-HCL(8,8)	2,5 ml
30% Acryl/Bis-acryl	3,33 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>10ml</b>



**Tabuľka 8:** Zoznam reagensí a ich objemov pri príprave 15% rozdeľovacieho gélu SDS-PAGE

Reagencie	Množstvo
H <sub>2</sub> O	2,4ml
1,5M Tris-HCL(pH 8,8)	2,5 ml
30% Acryl/Bis-acryl	5,0 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>10ml</b>

**Tabuľka 9:** Zoznam reagensí a ich objemov pri príprave zaostrovacieho gélu SDS-PAGE

Reagencie	Množstvo
H <sub>2</sub> O	3,675 ml
1M Tris-HCl (pH 6,8)	0,625 ml
30% Acryl/Bis-acryl	0,650 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	25 µl
TEMED	5 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>5 ml</b>

Metódu elektroforetickej separácie sme použili na rozdelenie proteínov v závislosti od ich elektroforetickej pohyblivosti. Rozdeľovali sme ich za denaturačných podmienok prostredníctvom diskontinuálnej elektroforézy za v polyakrylamidovom géli (SDS-PAGE).

Vzorky získané postupom opísanom v časti Izolácia proteínov sa nariedili s 2x SDS-PAGE (Biorad, USA) nanášacím pufrom v pomere 1:1, ktorý bol nariedený s využitím komerčného pufru (Biorad, USA) (950 µl) a β-merkaptóetanolu (50 µl). Sekundárne štruktúry proteínov boli denaturované vložení vzoriek do termobloku (Major Science Dry Bath Incubator, Taiwan), ktorý bol vyhriaty na 95 °C po dobu 5 min. Vzorky sa potom nanášali na gél vo vypočítaných objemoch obsahujúcich 40 µg proteínov. Gély sa následne zaliali 1x Running pufrom, ktorý sme si pripravili nariedením 10xSDS/Tris/Glycínu (100ml do 900ml vody). Elektroforetická separácia prebiehala po dobu 60 min pri konštantnom prúde 12 mA na gél.

## Western blot

Metódu Western blotu sme použili na prenesenie izolovaných proteínov po elektroforetickej separácii z gélu na nitrocelulóзовú membránu. Zložky Western blotovej kazety sme po dobu 15 min ekvilibrovali v transferovom pufrí (1xTP) (Tab. 10), konkrétne sa jednalo o rozdeľovací gél z SDS-PAGE, nitrocelulóзовú membránu a filtračné papiere. Následne sme z týchto zložiek zostavili blotovaciu kazetu, ktorá bola zaliata transferovým pufrom po tom, čo sme ju vložili do blotovacieho modulu v elektroforetickej komore. Vlastný prenos proteínov z gélu na membránu trval 90 min a prebiehal pri konštantnom napätí 80 V.

**Tabuľka 10:** Zoznam reagensí a ich objemov pri príprave transferového pufru (1xTP)

Reagencie	Množstvo [ml]
10xSDS/Tris/Glycin	200
Metanol	300
H <sub>2</sub> O	1 000
<b>Celkový objem</b>	<b>1 500</b>

Pre overenie úspešnosti prenosu proteínov sme membránu s proteínmi preniesli do roztoku Ponceau S (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA). Následne bola membrána trikrát premytá v TBS-T pufrí po dobu 5 min a prenesená do blokovacieho 5% roztoku BSA (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) v TBS-T po dobu jednej hodiny. Ďalším krokom bola inkubácia membrán, ktorá už mala zablokované nešpecifické väzby. Membrána sa inkubovala s primárnymi protilátkami po dobu 12h pri teplote 4 °C. Po uplynutí potrebného času nasledovala inkubácia so sekundárnymi protilátkami po dobu jednej hodiny. K samotnej vizualizácii proteínov bol použitý chemiluminiscenčný detektor (Azure<sup>®</sup> Biosystems C600, USA).

### **4.2.9 Analýza poškodenia DNA pomocou *in vitro* Comet assay**

Pre analýzu poškodenia DNA v bunkách OVCAR3 ovplyvnených roztokom mirínu a následne roztokom CbPt sme použili metódu *in vitro* Comet Assay, ktorá je založená na jednobunkovej gélovej elektroforéze. Jej alkalická verzia sa štandardne využíva na detekciu zlomov v molekulách DNA. DNA denaturuje v alkalickom prostredí a pri elektroforéze putuje vo forme polyaniónu z jadra k anóde. Množstvo migrujúceho množstva DNA z jadra je priamo úmerne množstvu zlomov na DNA. Po ofarbení a vizualizácii majú bunky tvar podobný kométe. Poškodená DNA sa nachádza práve v „chvostovej“ (*tail*) časti kométy, kým intaktná DNA ostáva v jej „hlave“ (*head*) (Collins, 2004).

Po 24 hod od ovplyvnenia OVCAR3 buniek roztokom mirínu a kombinovaným ovplyvnením roztokmi mirínu a CbPt sme ich uvoľnili z kultivačného povrchu 24-jamkovej doštičky a resuspendovali v 1ml vychladeného PBS pufra. Následne sme bunky spočítali na Bürkerovej komôrke a centrifugovali po dobu 10 min pri laboratórnej teplote a 700xg. Zliali sme vytvorený supernatant a nariadili vzniknuté bunkové pelety s 0,5% roztokom agarózy, ktorý bol vyhriaty na 37 °C, na koncentráciu 200 000 buniek/ml. V troch opakovaniach bola nanesená každá vzorka o objeme 70 µl na vychladené sklíčka pokryté 1% agarózovým gélom a prekrytá krycím sklíčkom. Sklíčka boli prenesené do chladničky na dobu 10 min a po stuhnutí agarózy sme opatrne stiahli krycie sklíčka a vzorky umiestnili do vychladeného lyzačného pufra po dobu jednej hodiny pri teplote 4 °C.

Po lýze buniek boli sklíčka po dobu 5 min premývané vo vychladenom pufri PBS a následne uložené v horizontálnej polohe do elektroforetického boxu, zaliate alkalickým pufrom a inkubované po dobu 40 min. Po uplynutí tejto doby bol elektroforetický box pripojený k zdroju napätia, čím sa spustila gélová elektroforéza, ktorá prebiehala pri prúde 300 mA, napätí 33 V a teplote 4 °C po dobu 30 min. Ďalším krokom bola neutralizácia gélov premývaním sklíčok vo vychladenom PBS po dobu 10 min a ďalších 10 min vo vychladenej dH<sub>2</sub>O pri teplote 4 °C. Pri tejto teplote sa sklíčka nechali cez noc vyschnúť a nasledujúci deň prebehlo ich farbenie v roztoku SYBR™ Gold po dobu 30 min.

Použitý farbiaci roztok bol pripravený krátko pred použitím pridaním 5 µl SYBR™ Gold (Molecular Probes®, USA) do 50 ml TE pufra. Sklíčka sme po farbení dvakrát premyli dH<sub>2</sub>O. vyschnuté sklíčka sme prekryli krycím sklíčkom a poškodenie DNA sme hodnotili pod fluorescenčným mikroskopom (Olympus BX63, Japonsko). Pre obrazovú analýzu sme využili program LUCIA Comet Assay™ Software.

#### **4.2.10 Analýza bunkového cyklu**

Pre analýzu bunkového cyklu sme použili metódu prietokovej cytometrie, ktorej princíp spočíva v meraní obsahu DNA jednotlivých buniek, ktoré musia byť nevyhnutne vopred označené. Ako fluorescenčné farbivo sa používa propídium jodid (PI), ktorý sa ako interkalačné činidlo včlení do štruktúry dsDNA a emituje žiarenie (>560 nm) po ožiarení svetlom s vlnovou dĺžkou 488 nm. Na základe fluorescenčného signálu sa určuje nielen obsah DNA v bunkách, ale aj fáza cyklu, v ktorom sa bunky nachádzajú.

Bunkám OVCAR3 bolo po 48 hodinách od ovplyvnenia roztokom mirínu a kombinovaného ovplyvnenia roztokmi mirínu a CbPt odsaté kultivačné médium. Pomocou

PBS pufru o objeme 1 ml sme premyli kultivačný povrch 6-jamkovej doštičky. Po následnej trypsinizácii boli bunky resuspendované v 1 ml PBS pufru a centrifugované v centrifugačných skúmavkách pri po dobu 10 min, pri laboratórnej teplote a 1500xg. Po centrifugácii sa zliat supernatant a vzniknuté bunkové pelety boli fixované vo vychladenom 70% etanole (Penta, Czech Republic). Obsah skúmaviek bol postupne premiešavaný elektrickou trepačkou (Biosan Vortex V-1 Plus, Nemecko), pričom v priebehu miešania sa pridával vychladený 70% etanol. Takto pripravené vzorky sa skladovali pri teplote -20 °C.

Farbeniu PI predchádzala centrifugácia buniek v 70% etanole po dobu 10 min pri laboratórnej teplote a 1500xg. Po centrifugácii bol etanol zliaty a k bunkovým peletom bol pridaný PBS pufr o objeme 1ml, čo predchádzalo ďalšej centrifugácii, po ktorej bol zliaty supernatant. Bunkové pelety boli resuspendované v 1 ml farbiaceho roztoku PI a inkubované po dobu 30 min v termostate pri teplote 37 °C. Pre samotnú analýzu bunkového cyklu bol využitý prietokový cytometer (Apogee Systems A-50 Microflow Cytometer, Anglicko) a získané dáta boli vyhodnotené v programe Flowlogic™ Software (Inivai Technologies, Austrália).

### **4.3 Štatistická analýza**

Pre štatistické vyhodnotenie nadobudnutých výsledkov sme využili program GraphPad Prism 9.1.2 (226) (verzia prístupná od júna 2021) (GraphPad Software, USA). Pomocou nepárového neparametrického Mann-Whitneyho testu sme posudzovali štatistickú významnosť. Výsledky predstavujú priemernú hodnotu troch nezávislých opakovaní so smerodajnou odchýlkou ( $\pm$  SD). Výsledky, ktoré boli zhodnotené ako štatisticky signifikantné mali hodnotu  $p < 0.05$  a  $p < 0,01$  a v grafickom zobrazení boli označené „\*“, respektíve „\*\*\*“.

## 5. Výsledky

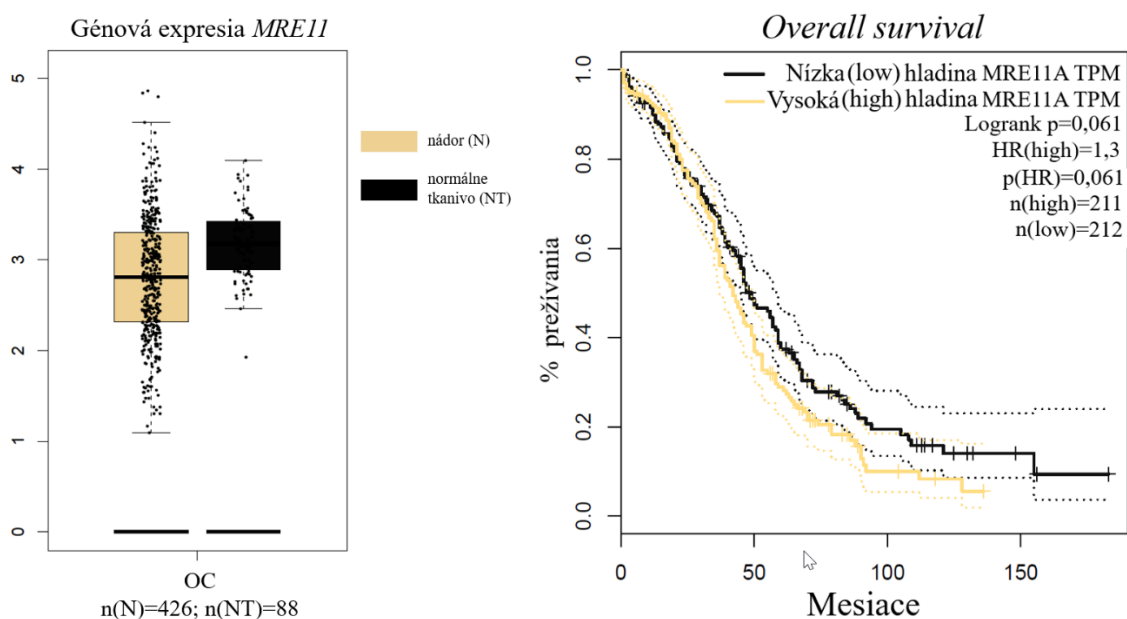
Počas praktickej časti práce na diplomovom projekte sme sa zamerali na definovanie vplyvu inhibície HR pomocou inhibítora MRE11 mirínu na bunkovú líniu karcinómu vaječníkov. Zároveň sme analyzovali jeho účinok na citlivosť buniek karcinómu vaječníkov voči karboplatine ako chemoterapeutika používaného v prvej línii terapie OC. V poslednej časti práce sme sa venovali definovaniu vplyvu inhibície HR na citlivosť ku karboplatine v bunkovej línii so získanou rezistenciou voči karboplatine.

Predpokladali sme, že kombinovaný účinok inhibítora a chemoterapeutika by mohol ovplyvniť nielen životaschopnosť buniek, ale aj terapeutickú odpoveď, vzhľadom na používanie kombinovanej liečby v klinickej praxi. Efekt karboplatiny a mirínu sme sledovali v rámci *in vitro* funkčných analýz praktizovaných na nádorovej bunkovej línii karcinómu vaječníkov OVCAR3.

## 5. 1 Efekt inhibície HR pomocou mirínu na bunkovú líniu karcinómu vaječníkov

### 5.1.1 Bioinformatická analýza proteínu MRE11 asociovaného s preživaním u pacientov s diagnostikovaným OC

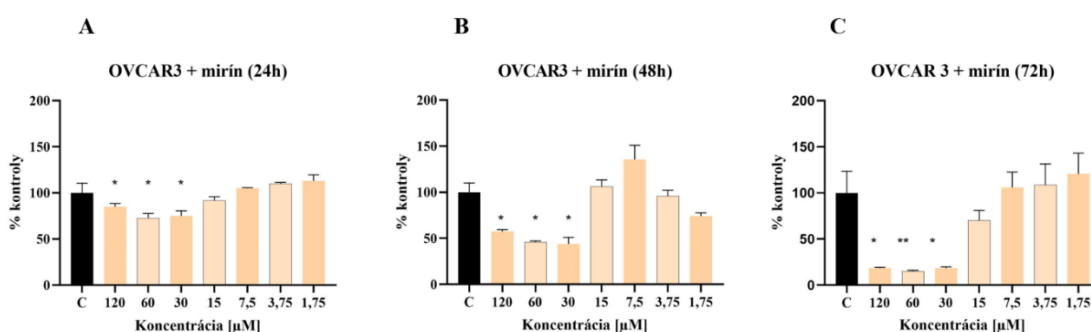
MRE11-RAD50-NBS1 má dôležitú úlohu v opravách DNA poškodenia. Predpokladá sa, že poruchy v tomto komplexe prispievajú k tumorigenéze a zároveň majú dôležitú úlohu v terapii nádorových ochorení. Na zistenie hladiny expície MRE11 u pacientov s OC a jeho asociáciu s preživaním sme použili online databázu GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*). Databáza GEPIA poskytuje dáta získané od TCGA a GTEx (*Genotype-Tissue Expression Portal*) (Tang *et al.*, 2017). Analýza ukázala zníženú hladinu expície MRE11 v nádorovom tkanive karcinómu vaječníkov v porovnaní s nenádorovým tkanivom (Obr. 15 A). Avšak Kaplan-Meierova analýza prežívania ukázala, že vyššia hladina proteínu MRE11 je asociovaná s horším preživaním pacientov (Obr. 15 B). Na základe zistených dát predpokladáme, že proteín MRE11 zohráva v OC dôležitú úlohu a jeho inhibícia by mohla mať vplyv na zlepšenie prežívania pacientov, ktorým bol diagnostikovaný OC.



**Obrázok 15** Grafické zobrazenie génovej expície MRE11 u karcinómu vaječníkov (OC) v porovnaní s nenádorovým tkanivom. U OC bola zaznamenaná znížená hladina expície (A). Grafické zobrazenie prežívania pacientov diagnostikovaných ochorením OC. Pacienti, ktorým bola detegovaná vysoká hladina proteínu MRE11, mali nižšie percento prežívania než pacienti s nízkou hladinou proteínu MRE11 (B). (upravené podľa Tang *et al.* 2017).

### 5.1.2 Hodnotenie vplyvu pôsobenia mirínu na bunkovú proliferáciu OVCAR3 buniek

Bunková proliferácia po ovplyvnení buniek mirínom bola analyzovaná kolorimetrickou metódou s použitím WST-1 reagentu. Vplyv inhibítora bol hodnotený v časovej závislosti, po 24, 48 a 72 hodinách po ovplyvnení, a v koncentračnej závislosti, s využitím koncentračného radu mirínu (120 – 1,75  $\mu\text{M}$ ). Za 100% bola považovaná kontrola (C), ktorá bola označená ako základná úroveň bunkovej proliferácie. Úrovne proliferácie vzoriek boli potom vzťahované ku každej C, pričom výsledné dáta zodpovedajú percentám z úrovne proliferácie C a predstavujú priemer hodnôt nameraných po troch nezávislých opakovaniach. Po 24h bola bunková proliferácia znížená o 15, 22 a 30% pri koncentrácii 120, respektíve 60 a 30  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,02$ ) (Obr. 16 A). Po 48h bola proliferácia znížená o 40, 55 a 60% pri koncentrácii 120, respektíve 60 a 30  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,05$ ) (Obr. 16 B). Po 72h bola proliferácia znížená o 80% pri koncentráciách 120 a 30  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,02$ ) a o 85% pri koncentrácii 60  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,004$ ) (Obr. 16 C). Na základe nameraných hodnôt bola vypočítaná hodnota koncentrácie IC<sub>50</sub> (inhibičná koncentrácia látky, ktorá má letálny efekt pre 50% buniek) pre mirín 15,5  $\mu\text{M}$  a IC<sub>20</sub> 4  $\mu\text{M}$ .

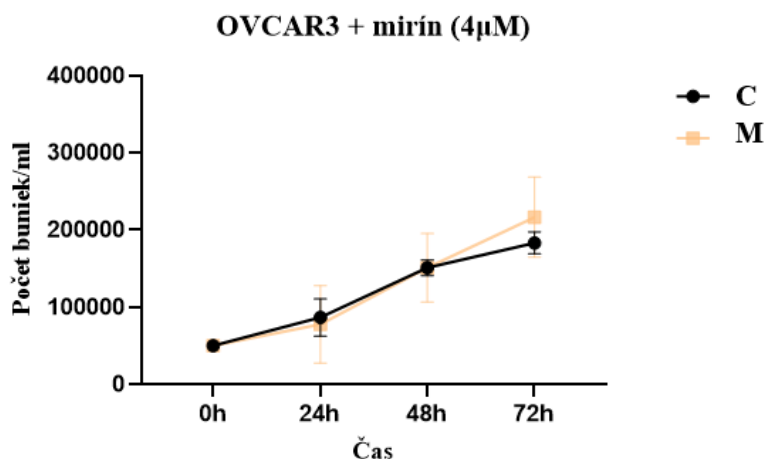


**Obrázok 16** Vplyv mirínu ako inhibítora proteínu MRE11 na bunkovú líniu OVCAR3. Grafické znázornenie zobrazuje časovú a koncentračnú závislosť. Úroveň proliferácie C predstavuje 100% kontroly, ku ktorej bola vzťahovaná úroveň proliferácie vo vzorkách s príslušnou koncentráciou mirínu, ktorá bola aplikovaná na bunkovú líniu OVCAR3. Symbol „\*“ predstavuje štatistickú významnosť  $p < 0,05$  a symbol „\*\*\*“ štatistickú významnosť  $p < 0,01$ .

### 5.1.3 Hodnotenie vplyvu pôsobenia mirínu na rast buniek

Rast buniek po ovplyvnení bunkovej línie roztokom mirínu bol analyzovaný metódou analýzy rastu pomocou priameho počítania buniek, na základe ktorej bola zostavená rastová krivka (Obr. 17). Vplyv inhibítora MRE11 na OVCAR3 bunkovú líniu bol hodnotený v časovej závislosti, po 24, 48 a 72 hodinách po ovplyvnení roztokom mirínu o koncentrácii 4  $\mu\text{M}$ . V čase nasádzania buniek a ich ovplyvnenia (0h) bolo v 1 ml 50 000 buniek. Po 24, 48 a 72 hodinách

boli bunky spočítané v troch nezávislých meraniach a tieto hodnoty boli následne spriemerované. Zmeny v počte buniek po 24 a 48 hodinách neboli zaznamenané. Po 72h sme pozorovali nárast v počte buniek ovplyvnených roztokom mirínu, ktorý však nebol signifikantný.



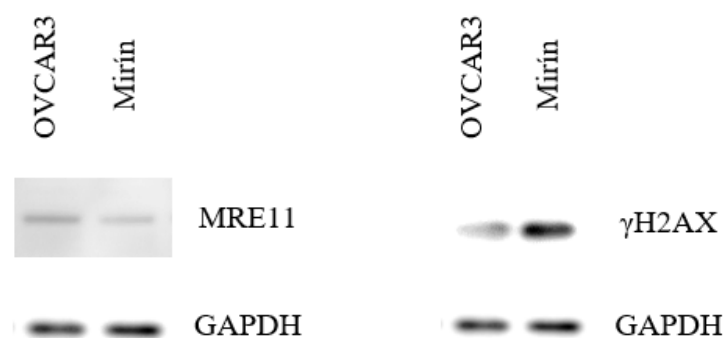
**Obrázok 17** Analýza rastu buniek kontrolnej skupiny buniek (C) (bez ovplyvnenia) a buniek ovplyvnených roztokom mirínu (M) vizualizovaná na rastovej krivke. Počet buniek OVCAR3 po ovplyvnení 4 $\mu$ M (IC20) roztokom mirínu v čase.

#### 5.1.4 Hodnotenie vplyvu pôsobenia mirínu na hladinu DNA poškodenia

Mirín, ako inhibítor proteínu MRE11, inhibuje jeho exonukleázovú aktivitu, čím v molekule DNA dochádza k akumulácii DSBs (Shibata *et al.*, 2014). Mirín je taktiež identifikovaný ako inhibítor DSB-indukovanej aktivácie ATM (Dupre *et al.*, 2008).

Fosforyláciou zvyšku Ser139 histónového variantu H2AX vzniká  $\gamma$ H2AX. Táto fosforylácia predstavuje skorú bunkovú odpoveď na indukciu DSBs.  $\gamma$ H2AX vzniká *de novo* a predstavuje vysoko špecifický molekulárny marker DNA poškodenia a vzniku DSBs (Mah *et al.*, 2010). Z tohto dôvodu sme si zvolili detekciu  $\gamma$ H2AX po ovplyvnení mirínom pomocou proteínovej analýzy, aby sme zistili prítomnosť DSBs v našich vzorkách. Prítomnosť  $\gamma$ H2AX bola analyzovaná pomocou elektroforetickej separácie za denaturačných podmienok (SDS-PAGE elektroforéza) a pomocou Western blotu. Na základe našich výsledkov je zrejmé, že po ovplyvnení mirínom stúpa hladina  $\gamma$ H2AX, ako zobrazuje Obr. 18. Tento výsledok podporuje našu hypotézu, že po inhibícii MRE11 dochádza ku akumulácii DSBs, čo koreluje s vyššou hladinou  $\gamma$ H2AX.





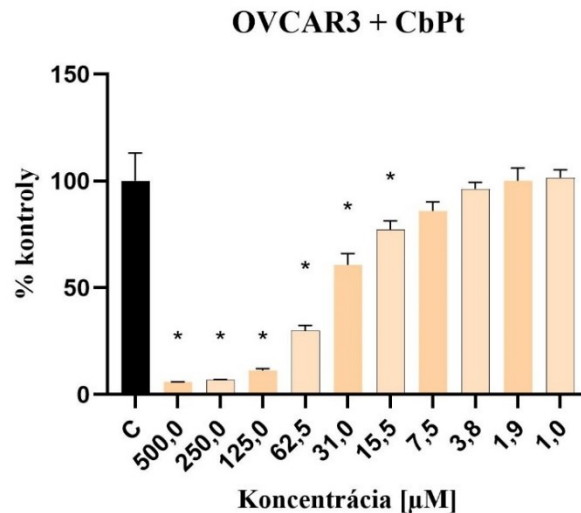
**Obrázok 18** Vizualizácia proteínov MRE11 a  $\gamma$ H2AX po ovplyvnení bunkovej línie OVCAR3 inhibítorom proteínu MRE11 – mirínom.

## 5.2 Hodnotenie vplyvu inhibície HR pomocou MRE11 inhibítora mirínu na citlivosť OVCAR3 bunkovej línie voči karboplatine

V klinickej praxi sa častokrát využíva kombinovaná terapia (súčasné podávanie dvoch a viac chemoterapeutických agensov). Využitím kombinovanej terapie (karboplatina a chemický agens) dochádzalo k zvýšeniu prežívania bez progresie (*progression free survival*, PFS) u pacientov senzitívnych na platinové deriváty. U pacientov vyznačujúcich sa rezistenciou voči platinovým derivátom bolo po kombinovanej terapii tiež evidované zvýšenie PFS (Matulonis *et al.*, 2016). Po charakterizácii samostatného vplyvu mirínu na bunkovú líniu OVCAR3 sme sa preto rozhodli pre kombinované ovplyvňovanie buniek mirínom (M) a karboplatinou (CbPt).

### 5.2.1 Hodnotenie vplyvu karboplatiny na bunkovú proliferáciu OVCAR3 buniek

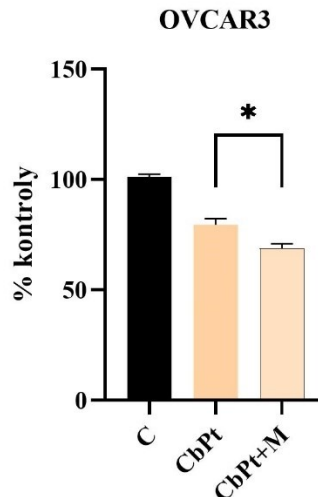
Ako prvé bolo potrebné stanoviť IC<sub>50</sub> pre samotnú karboplatinu. Pre tento účel sme ovplyvňovali bunkovú líniu OVCAR3 koncentračnou radou karboplatiny (500 – 1  $\mu$ M). Bunková proliferácia po ovplyvnení buniek karboplatinou bola analyzovaná kolorimetrickou metódou s použitím WST-1 reagentu. Za 100% bola považovaná kontrola (C), ktorá bola označená ako základná úroveň bunkovej proliferácie. Úrovne proliferácie vzoriek boli potom vzťahované ku každej C, pričom výsledné dáta zodpovedajú percentám z úrovne proliferácie C (Obr. 19). Na základe nadobudnutých výsledkov analýzy bunkovej proliferácie sme v programe GraphPad Prism 9.1.2 (226) (verzia prístupná od júna 2021) (GraphPad Software, USA) stanovili hodnotu IC<sub>50</sub> = 37,56  $\mu$ M a IC<sub>20</sub> = 10  $\mu$ M.



**Obrázok 19** Vplyv karboplatiny ako chemoterapeutika na bunkovú líniu OVCAR3. Grafické znázornenie zobrazuje koncentračnú závislosť. C predstavuje 100% kontroly, ku ktorej bola vzťahnutá úroveň proliferácie vo vzorkách s príslušnou koncentráciou mirínu, ktorá bola aplikovaná na bunkovú líniu OVCAR3. Symbol „\*“ predstavuje štatistickú významnosť  $p < 0,05$  a symbol „\*\*\*“ štatistickú významnosť  $p < 0,01$ .

### 5.2.2 Efekt kombinovaného pôsobenia mirínu a karboplatiny na viabilitu OVCAR3 buniek

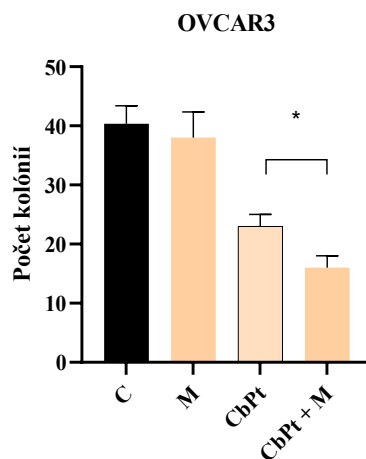
V našich nasledujúcich experimentoch sa zamerali na overenie vplyvu kombinovaného ovplyvňovania bunkovej línie OVCAR3. Bunky boli ovplyvňované po dobu jednej hodiny 100µM roztokom mirínu. Po uplynutí jednej hodiny boli bunky ovplyvnené 10µM roztokom karboplatiny, čo predstavovalo hodnotu koncentrácie IC20 pre karboplatinu. Bunky OVCAR3 sme ovplyvňovali aj samotným 10µM roztokom karboplatiny, aby sme mohli porovnať samostatný vplyv karboplatiny a vplyv kombinovaného ovplyvňovania. Bunková proliferácia po ovplyvnení buniek karboplatinou bola analyzovaná kolorimetrickou metódou s použitím WST-1 Reagentu. Za 100% bola považovaná kontrola (C), ktorá bola označená ako základná úroveň bunkovej proliferácie. Úrovně proliferácie vzoriek boli potom vzťahnuté ku každej C, pričom výsledné dáta zodpovedajú percentám z úrovne proliferácie C. Ako zobrazuje Obr. 20, po ovplyvnení buniek OVCAR3 karboplatinou došlo oproti kontrole k zníženiu proliferácie o 20%, po ovplyvnení kombináciou karboplatiny a mirínu (CbPt + M) o 30%, čo predstavuje rozdiel 10 percentných bodov proliferácie medzi vplyvom karboplatiny a kombinovaného ovplyvňovania ( $p = 0,05$ ).



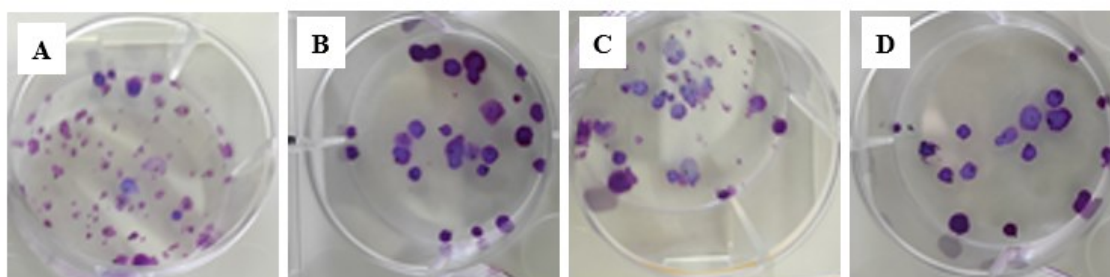
**Obrázok 20** Vplyv karboplatiny ako chemoterapeutika a vplyv karboplatiny v kombinácii s mirínom, ako inhibítora proteínu MRE11, na bunkovú líniu OVCAR3. Grafické znázornenie zobrazuje rozdiely v proliferácii po jednotlivých ovplyvneniach buniek. C predstavuje 100% kontroly, ku ktorej bola vzťahovaná úroveň proliferácie. Symbol „\*“ predstavuje štatistickú významnosť  $p < 0,05$ .

### 5.2.3 Hodnotenie vplyvu pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny na klonogénny potenciál OVCAR3 buniek

Bunková línia OVCAR3 bola ovplyvnená roztokom mirínu, roztokom karboplatiny a aj kombináciou roztokov karboplatiny a mirínu s využitím hodinového pôsobenia 100 $\mu$ M roztoku mirínu s následnou aplikáciou 10 $\mu$ M roztoku karboplatiny (Obr. 22). Výsledný počet kolónií bol porovnávaný s kontrolou (C) (Obr. 21). Samostatný vplyv mirínu na bunkovú líniu nebol podľa očakávania veľmi výrazný. Vplyv karboplatiny a kombinovaného ovplyvňovania na bunkovú líniu mal výrazný efekt na počet kolónií. Rozdiel medzi vplyvom samotnej karboplatiny a kombinovaného ovplyvňovania bol štatisticky významný ( $p = 0,05$ ) a podporuje našu hypotézu, že kombinované inhibície HR pravdepodobne vedie k zvýšeniu citlivosti OVCAR3 buniek voči roztoku karboplatiny.



**Obrázok 21** Vplyv roztoku mirínu (M), karboplatiny (CbPt) a roztoku karboplatiny v kombinácii s mirínom (CbPt + M) na bunkovú líniu OVCAR3. Grafické znázornenie zobrazuje rozdiely v klonogénnom potenciáli po jednotlivých ovplyvneniach buniek. C predstavuje kontrolu, ku ktorej bola vzťahnutá úroveň proliferácie. Symbol „\*“ predstavuje štatistickú významnosť  $p < 0,05$ .

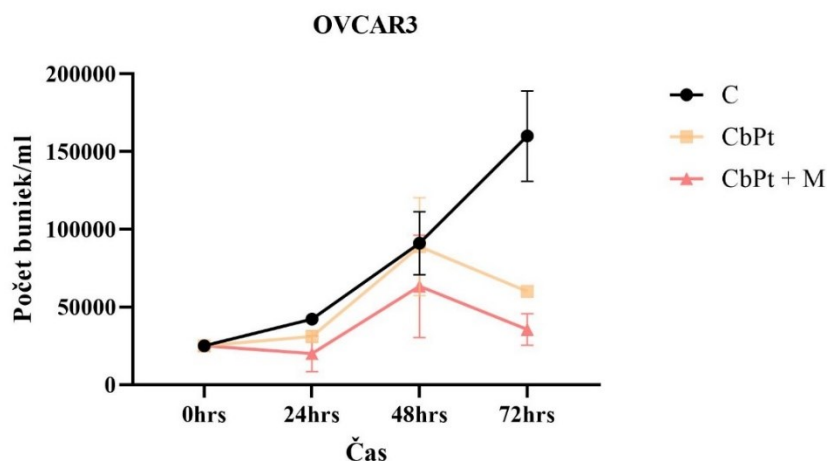


**Obrázok 22** Vytvorené kolónie bunkovej línie OVCAR3 na kultivačnej miske. Obrázok **A** zobrazuje kolónie buniek OVCAR3 bez ovplyvnenia – kontrola (C). Obrázok **B** zobrazuje bunky po ovplyvnení roztokom karboplatiny (CbPt). Obrázok **C** zobrazuje bunky po ovplyvnení mirínom (M). Obrázok **D** zobrazuje bunky po kombinovanom ovplyvnení (CbPt + M).

#### 5.2.4 Hodnotenie rastu OVCAR3 buniek po kombinovanom pôsobení inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny

Nádorové bunky sa mimo iné charakterizujú aj veľmi rýchlym a nekontrolovateľným delením. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli hodnotiť efekt ovplyvnenia roztokmi mirínu a karboplatiny na rast nádorovej bunkovej línie. Rast buniek po ovplyvnení bunkovej línie 10 $\mu$ M roztokom karboplatiny a hodinovým ovplyvnením 100 $\mu$ M roztoku mirínu s následným ovplyvnením 10 $\mu$ M roztoku karboplatiny bol analyzovaný metódou analýzy rastu a počítania buniek, na základe ktorých bola zostavená rastová krivka (Obr. 23). Samostatný vplyv karboplatiny a kombinovaný vplyv mirínu a karboplatiny bol hodnotený v časovej závislosti, po 24, 48 a 72 hodinách po ovplyvnení. V čase nasádzania buniek a ich ovplyvnenia

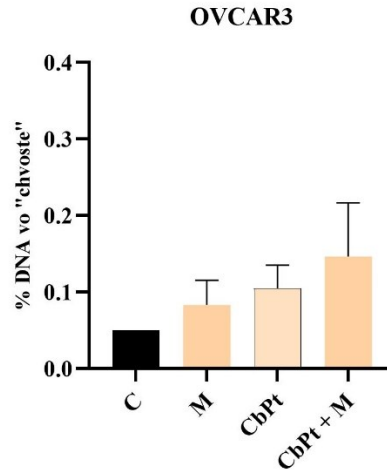
(0h) bolo v 1 ml 25 000 buniek. Po 24, 48 a 72 hodinách boli bunky spočítané v troch nezávislých meraniach a tieto hodnoty boli následne spriemerované. Zmeny v počte buniek po 24 a 48 hodinách neboli veľmi výrazné. Po 48h nastal pokles v počte buniek u kombinovaného ovplyvnenia. Po 72h došlo oproti kontrole (C) k poklesu aj u samotnej CbPt, no najviac výrazné zníženie počtu buniek naďalej pretrvávalo u kombinovaného ovplyvnenia. To podporuje našu hypotézu ohľadom silnejšieho účinku kombinácie roztoku karboplatiny s roztokom mirínom oproti samostatnému účinku karboplatiny.



**Obrázok 23** Analýza rastu buniek kontrolnej skupiny buniek (bez ovplyvnenia) a ovplyvnených buniek vizualizovaná na rastovej krivke. Počet buniek OVCAR3 po ovplyvnení karboplatinou (10 $\mu$ M) a kombináciou karboplatiny (10 $\mu$ M) a mirínu (100 $\mu$ M) v čase.

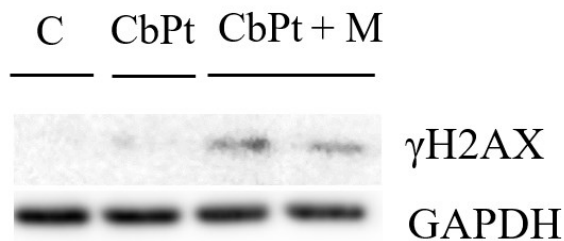
### 5.2.5 Hodnotenie vplyvu pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny na poškodenie molekúl DNA

Pomocou *in vitro* metódy Comet Assay sme detegovali jednovláknové zlomy prítomné na molekulách DNA v bunkovej línii OVCAR3. Množstvo počtu zlomov bolo priamo úmerné obsahu DNA migrujúcej z jadra pri elektroforéze. Pri pozorovaní bunky tvarom pripomínali kométy, pričom obsah DNA v „chvoste“ predstavoval DNA migrujúcu z jadra. V tejto analýze bol hodnotený obsah DNA vo „chvoste“ komét. V rámci tejto metódy sme analyzovali vplyv samostatného 100 $\mu$ M roztoku mirínu, samostatného roztoku 10 $\mu$ M karboplatiny a vplyv hodinového ovplyvnenia 100 $\mu$ M roztokom mirínu a následným ovplyvnením 10 $\mu$ M roztokom karboplatiny. Na základe získaných dát došlo k miernemu zvýšeniu hladiny DNA poškodenia ovplyvnených vzoriek oproti kontrole (C), ako zobrazuje Obr.24.



**Obrázok 24** Grafické porovnanie množstva zlomov na molekulách DNA bunkovej línie OVCAR3 na základe percentuálneho obsahu DNA v „chvoste“ komét. Množstvo zlomov bolo porovnávané medzi kontrolou (C) a ovplyvnenými vzorkami a medzi ovplyvnenými vzorkami navzájom.

Pomocou proteínovej analýzy a metódy Western blot sme detegovali hladinu proteínu  $\gamma$ H2AX, ktorý predstavuje marker dvojvláknových zlomov na DNA. Bunková línia OVCAR3 bola analyzovaná po samostatnom ovplyvnení roztokom karboplatiny (10  $\mu$ M) a po hodinovom ovplyvnení roztokom mirínu (100  $\mu$ M) a následným ovplyvnení roztokom karboplatiny (10  $\mu$ M). Po kombinovanom ovplyvnení bola zaznamenaná vyššia hladina proteínu  $\gamma$ H2AX oproti kontrole (bunková línia OVCAR3 bez ovplyvnenia) a samostatnému ovplyvneniu roztokom karboplatiny (Obr. 25)

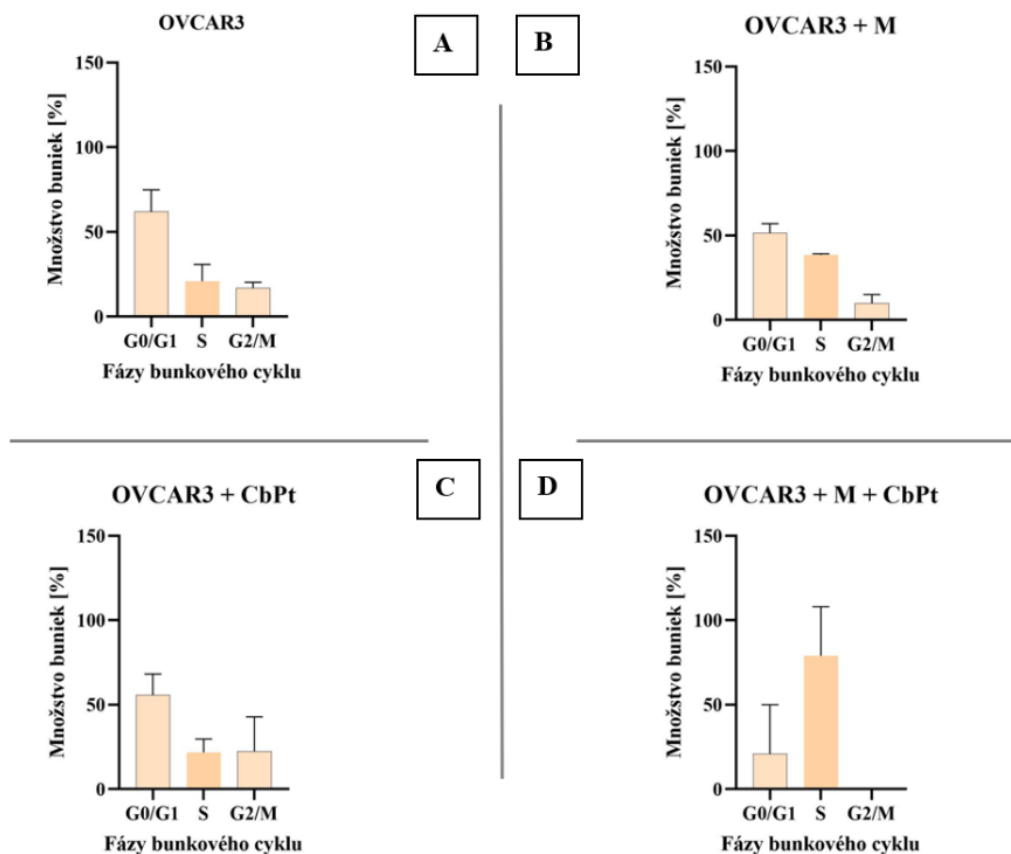


**Obrázok 25** Vizualizácia proteínu  $\gamma$ H2AX na bunkovej línii OVCAR3 – kontrola (C) a po ovplyvnení roztokom karboplatiny (CbPt) a kombinovanom ovplyvnení roztokom mirínu a karboplatiny (CbPt + M).

### 5.2.6 Hodnotenie vplyvu pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny na reguláciu bunkového cyklu

Prostredníctvom metódy prietokovej cytometrie sme po farbení propídium jodidom analyzovali počet buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu. Analyzovali sme bunkovú líniu OVCAR3 48h po ovplyvnení 10 $\mu$ M roztokom karboplatiny, 100 $\mu$ M roztokom mirínu a po

kombinovanom ovplyvnení mirínom a karboplatinou (hodinové ovplyvnenie 100 $\mu$ M roztokom mirínu s následným ovplyvnením 10 $\mu$ M roztokom karboplatiny). Ako zobrazuje Obr. 26, najvýraznejšia akumulácia buniek v S fáze bola po kombinovanom ovplyvnení, čo značí výrazné poškodenie DNA. Akumulácia buniek v S fázy a nízky počet buniek v G2 fáze by mohol značiť, že poškodená DNA pretrváva v S fáze, a môžeme predpokladať, že v prechode do G2 fázy jej bráni kontrolný bod. Tento poznatok koreluje s poklesom proliferácie (Obr. 20) a s poklesom počtu kolónií (Obr. 21) po kombinovanom ovplyvnení.

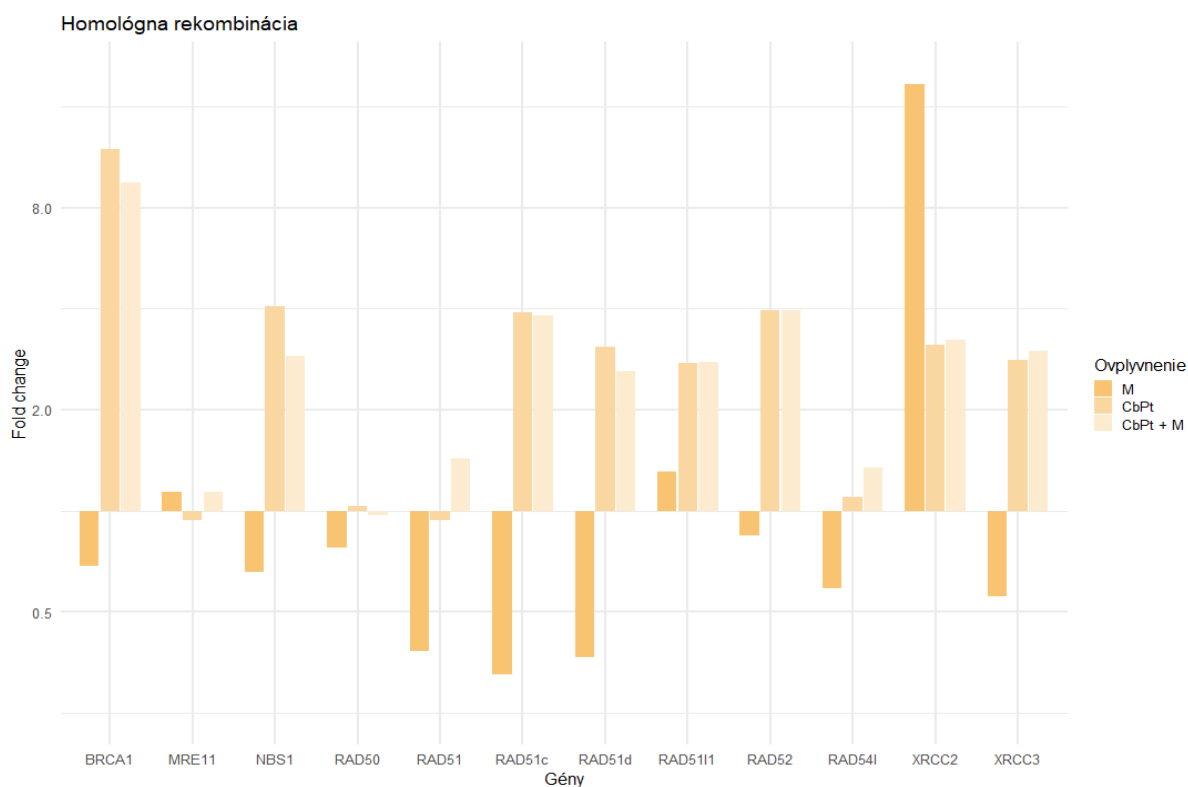


**Obrázok 26** Grafické znázornenie percentuálneho obsadenia buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu, po ovplyvnení 10 $\mu$ M roztokom karboplatiny (CbPt), po ovplyvnení 100 $\mu$ M roztokom mirínu (M) a kombinovaným ovplyvnením 100 $\mu$ M roztokom mirínu a 10 $\mu$ M roztokom karboplatiny (CbPt + M). Graf A. zobrazuje kontrolnú skupinu OVCAR3 bez ovplyvnenia s najvyššou akumuláciou buniek v G0/G1 fáze. Graf B. zobrazuje bunkovú líniu po ovplyvnení 100 $\mu$ M roztokom mirínu (M) s najvyššou akumuláciou buniek v G0/G1 fáze. Graf C. zobrazuje bunkovú líniu po ovplyvnení 10 $\mu$ M roztokom karboplatiny (CbPt) s najvyššou akumuláciou buniek v G0/G1 fáze. Graf D. zobrazuje bunkovú líniu po ovplyvnení 100 $\mu$ M roztokom mirínu (M) a následným ovplyvnením 10 $\mu$ M roztokom karboplatiny (CbPt) s najvyššou akumuláciou buniek v S fáze.

### 5.2.7 Hodnotenie vplyvu pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny na expresiu vybraných génov

Vzhľadom na fakt, že karboplatina aj mirín výrazne ovplyvňujú dráhy DNA poškodenia a opráv, zamerali sme sa na zmenu génovej expresie po ovplyvnení týmito látkami vo vybraných génoch. Vybrané gény sú súčasťou dráhy HR (Obr.27), ktorej súčasťou je práve MRN komplex a NER (Obr. 28), ktorá je asociovaná s opravou poškodenia, spôsobeného karboplatinou. Analýzu sme doplnili o ďalšie gény (Obr. 29), ktoré sú asociované s reguláciou bunkového cyklu.

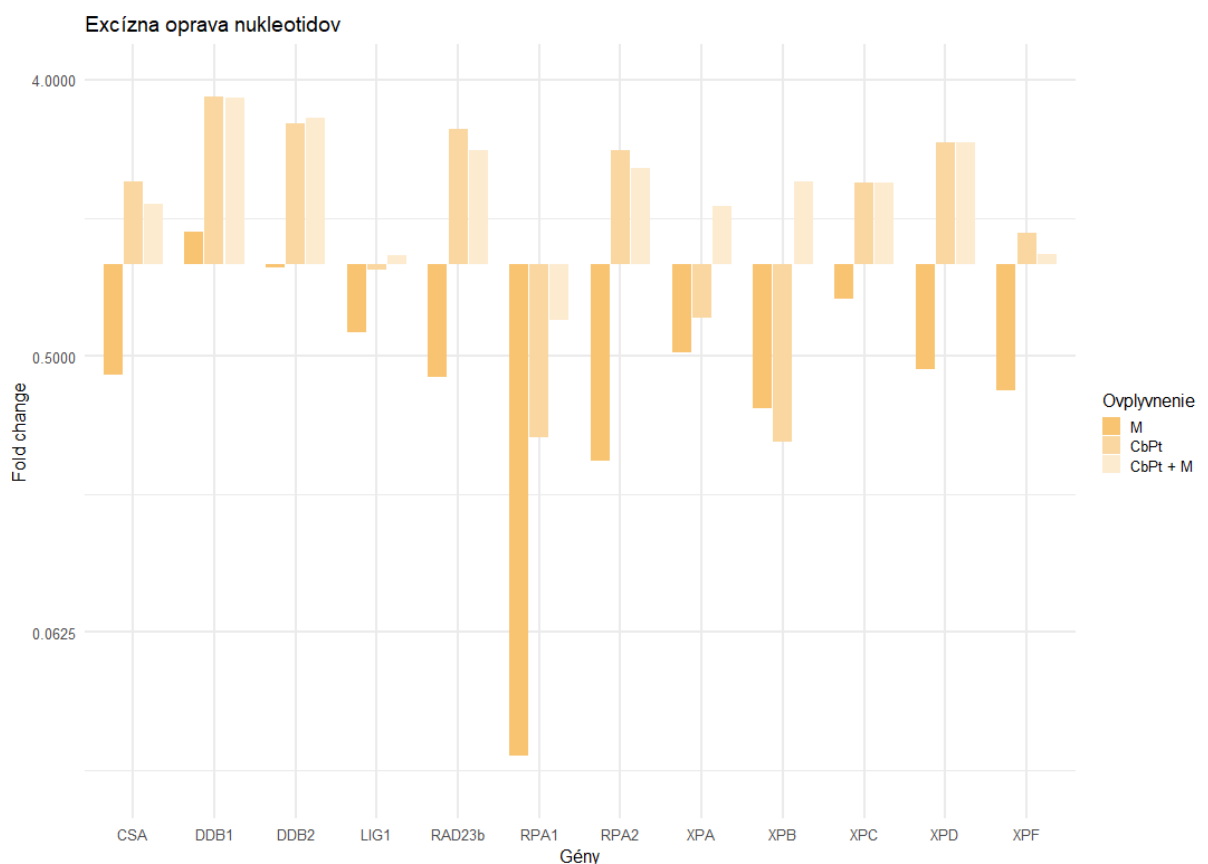
Z našich výsledkov (Obr.27) vyplýva, že vplyvom samotného roztoku mirínu dochádza k zníženiu expresie génov *BRCA1*, *NBS1*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD51A*, *RAD51D*, *RAD52*, *RAD54L* a *XRCC3* a u génov *MRE11*, *RAD51L* a *XRCC2* k zvýšeniu génovej expresie. Vplyvom kombinovaného ovplyvnenia roztokmi mirínu a karboplatiny dochádza k zníženiu expresie génu *RAD50*, pričom po ovplyvnení samotným roztokom karboplatiny bola expresia tohto génu zvýšená. U génov *BRCA1*, *NBS1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RAD51L*, *RAD52*, *XRCC2* a *XRCC3* dochádza k zvýšeniu génovej expresie. Génová expresia génov *MRE11* a *RAD51* bola po kombinovanom ovplyvnení zvýšená, zatiaľ čo po ovplyvnení samotnou karboplatinou bola znížená. Génová expresia *RAD54L* bola pri kombinovanom ovplyvnení zvýšená oproti účinku samotnej karboplatiny.



**Obrázok 27** Grafické znázornenie zmeny expresie génov zúčastňujúcich sa dráhy HR.



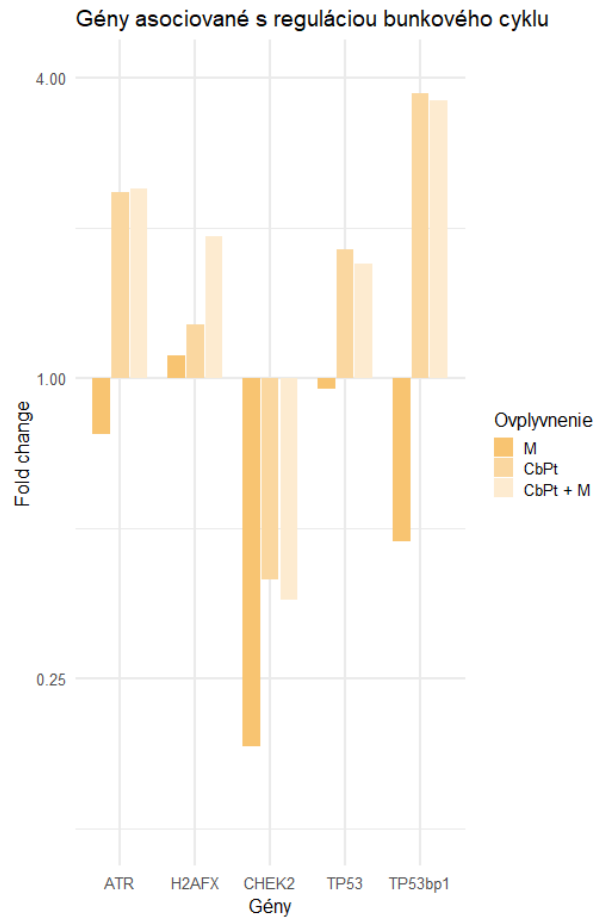
Po analýze expresie génov zúčastňujúcich sa dráhy NER (Obr.28) sme zistili, že vplyvom samotného roztoku mirínu dochádza k zníženiu expresie génov *CSA*, *DDB1*, *LIG1*, *RAD23B*, *RPA1*, *RPA2*, *XPA*, *XPB*, *XPC* a *XPF* a jedine u génu *DDB1* dochádza k zvýšeniu génovej expresie. Vplyvom kombinovaného ovplyvnenia roztokmi mirínu a karboplatiny dochádza k zníženiu expresie génu *RPA1*, ktorého expresia je znížená aj po ovplyvnení samotným roztokom karboplatiny. U génov *CSA*, *DDB1*, *DDB2*, *RAD23B*, *RPA2*, *XPC* a *XPB* dochádza k zvýšeniu génovej expresie. Génová expresia génov *LIG1*, *XPA* a *XPB* bola po kombinovanom ovplyvnení zvýšená, zatiaľ čo po ovplyvnení samotnou karboplatinou bola znížená. Génová expresia *XPD* bola pri kombinovanom ovplyvnení znížená oproti účinku samotnej karboplatiny.



**Obrázok 28** Grafické znázornenie zmeny expresie génov zúčastňujúcich sa dráhy NER.

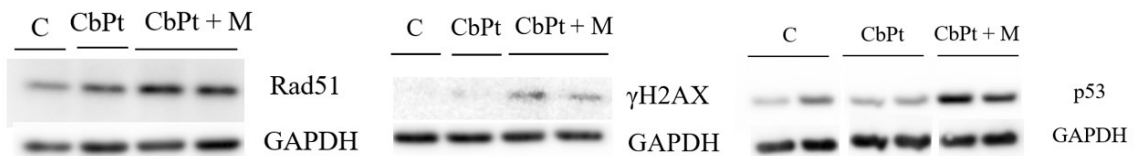
Po analýze expresie génov asociovaných s reguláciou bunkového cyklu (Obr. 29) sme zistili, že vplyvom samotného roztoku mirínu dochádza k zníženiu expresie génov *ATR*, *CHEK2*, *TP53* a *TP53BP* a jedine u génu *H2AFX* dochádza k zvýšeniu génovej expresie. Vplyvom kombinovaného ovplyvnenia roztokmi mirínu a karboplatiny dochádza k zníženiu expresie génu *CHEK2*, ktorého expresia je znížená aj po ovplyvnení samotným roztokom karboplatiny. U génov *ATR*, *TP53* a *TP53BP* dochádza k zvýšeniu génovej expresie. Génová

expresia génu *H2AFX* bola po kombinovanom ovplyvnení výrazne zvýšená oproti účinku samotnej karboplatiny.



**Obrázok 29** Grafické znázornenie zmeny expresie génov asociovaných s reguláciou bunkového cyklu

Po stanovení génovej expresie vybraných génov sme overovali zmenu proteínovej expresie po samostatnom ovplyvnení roztokom karboplatiny a po kombinovanom ovplyvnení roztokom mirínu a karboplatiny. Pre túto analýzu sme si vybrali proteín Rad51, ktorý je súčasťou dráhy HR, proteín  $\gamma$ H2AX, ktorý je markerom DSBs, a proteín p53, ktorý je jedným z hlavných regulátorov bunkového cyklu. Zmena expresie proteínov zodpovedala zmenám v expresii príslušných génov (Obr. 27, 29, 30).



**Obrázok 30** Vizualizácia proteínov Rad51,  $\gamma$ H2AX a p53 na bunkovej línii OVCAR3 – kontrola (C) a po ovplyvnení roztokom karboplatiny (CbPt) a kombinovanom ovplyvnení roztokom mirínu a karboplatiny (CbPt + M).

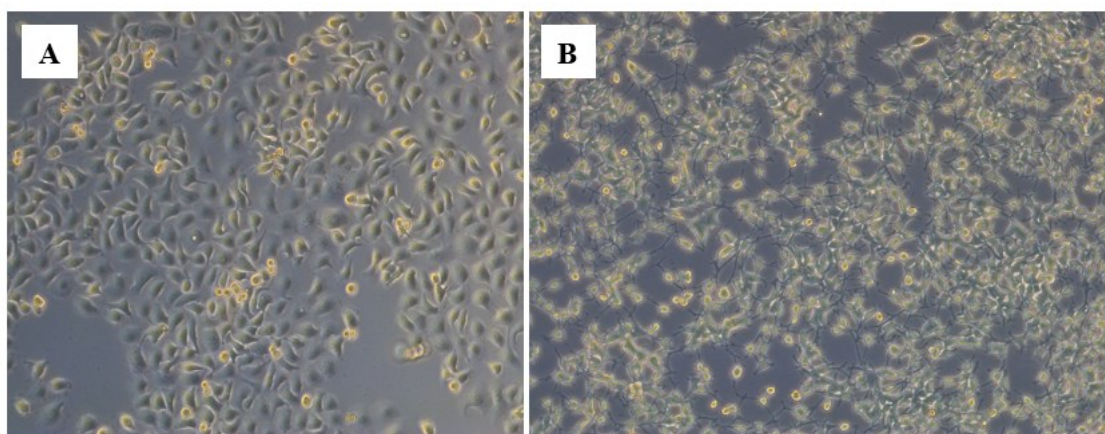
### 5.3 Vplyv inhibície MRE11 na bunkovú líniu rezistentnú na účinok karboplatiny

Vývoj rezistencie je jednou z hlavných prekážok v liečbe nádorov. Jedným z hlavných mechanizmov, ktoré sa podieľajú na vývoji chemorezistencie, je zvýšená oprava chemoterapiou spôsobených lézií (Damia and Brogini, 2019). Naše predošlé výsledky potvrdili inhibičný efekt mirínu na dráhu HR, ktorá opravuje DSBs. Na základe týchto výsledkov sme predpokladali efekt mirínu na zvýšenie citlivosti rezistentnej línie nádorových buniek OVCAR3 voči karboplatiny prostredníctvom inhibície dráhy HR.

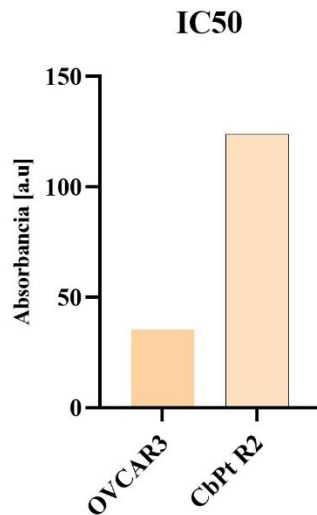
#### 5.3.1 Charakterizácia bunkovej línie zo získanou rezistenciou voči karboplatine

Bunková línia OVCAR3 so získanou rezistenciou voči účinkom karboplatiny bola vytvorená na Oddelení molekulárnej biológie nádorov Ústavu experimentálnej medicíny AV ČR v.v.i. Ing. Alenou Opatovou, PhD. a MUDr. Josefom Horákom na základe postupu (Coley, 2004) postupným zvyšovaním koncentrácie karboplatiny v kultivačnom médiu. Bunková línia bola označená CbPt R2.

Oproti parentálnej bunkovej línii OVCAR3 (Obr. 31 A) sa rezistentná línia CbPt R2 vyznačuje zmenou morfológie, ako je možné vidieť na Obr. 31 (B). Ďalej bola skúmaná odolnosť voči karboplatine a stanovením koncentrácie IC<sub>50</sub> pre karboplatinu, ktorá bola oproti koncentrácii IC<sub>50</sub> pre karboplatinu parentálnej línie 3,5-krát zvýšená (Obr. 32).



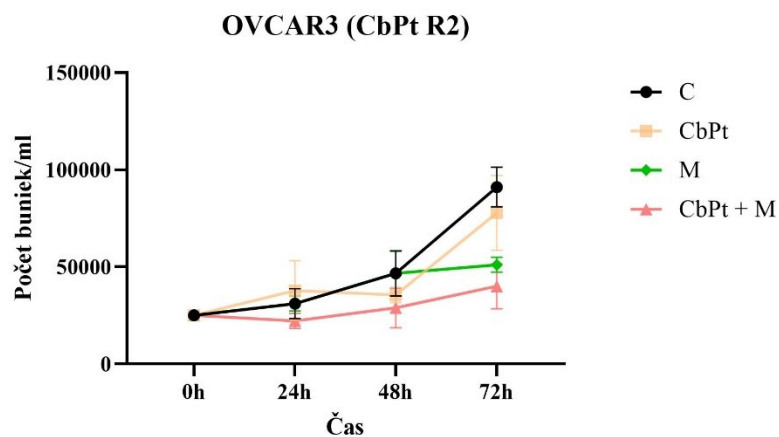
**Obrázok 31** Fotografie bunkových línii. Parentálna bunková línia OVCAR3 (A). Bunková línia OVCAR3 R2 rezistentná voči karboplatine. Klon číslo 2 (B). Zväčšenie 10x0,22.



**Obrázok 32** Grafické znázornenie porovnania medzi hodnotami koncentrácie IC50 pre karboplatinu parentálnej línie (OVCAR3) a pripravenej rezistentnej línie (CbPt R2).

### 5.3.2 Vplyv pôsobenia inhibítora MRE11 mirínu na efekt karboplatiny u bunkovej línie zo získanou rezistenciou voči karboplatine

Analýzou bunkového rastu sme hodnotili vplyv karboplatiny, mirínu a hodinového ovplyvnenia mirínom s následnou aplikáciou karboplatiny na pripravenej rezistentnej línii v časovej závislosti (Obr. 33). Na základe zozbieraných dát sme zistili, že línia nie je senzitivna voči karboplatine, reaguje zníženým počtom buniek po pôsobení mirínu a vyšším znížením počtu buniek po kombinovanom ovplyvnení.



**Obrázok 33** Grafické znázornenie bunkového rastu prostredníctvom rastovej krivky. Zobrazenie vplyvu karboplatiny (CbPt), mirínu (M) a kombinového ovplyvnenia (CbPt + M) na rezistentnú líniu CbPt R2 v časovej závislosti.

## 6. Diskusia

Karcinóm vaječníkov (*ovarian cancer*, OC) je ochorenie vyznačujúce sa najvyššou mortalitou spomedzi gynekologických nádorových ochorení. Nedávne štúdie zvyrazňujú dôležitosť opravy DNA a odpovede na poškodenie DNA (*DNA damage response*, DDR), ktoré hrajú úlohu v genómovej nestabilite, ktorá sprevádza tumorogézu a progresiu nádoru. Spomedzi DDR dráh, genómové alterácie v DNA mutátorových génoch reprezentujú významné zmeny, ktoré sú genetickým základom mnohých solídnych nádorov, napr. karcinómu vaječníkov, karcinómu prsníka či kolorektálneho karcinómu (*colorectal cancer*, CRC) (Tomasova *et al.*, 2020).

Spočiatku je väčšina OC senzitívnych na prvotnú liečbu chemoterapeutikami prvej voľby, ktorými sú platinové deriváty (cisplatina, karboplatina) (Damia and Broggin, 2019). Avšak, aj napriek tomu, že až u 80% pacientov s OC dochádza k dobrej odozve na prvotnú terapiu, z toho u takmer 80% z týchto pacientov dochádza k relapsu s rezistenciou voči chemoterapii (Damia and Broggin, 2019). Na vzniku chemorezistencie sa podieľa niekoľko mechanizmov. Jedným z nich sú DNA opravné dráhy. Vzhľadom na to, že hlavným cieľom platinových derivátov je DNA, senzitivita/rezistencia na tieto chemoterapeutiká môže byť ovplyvňovaná schopnosťou buniek rozoznávať a opravovať DNA poškodenia spôsobené chemoterapiou (Damia and Broggin, 2019). Cielenie terapie na DNA reparačné dráhy predstavuje možnosť zlepšenie prognózy OC v prípade vzniku chemorezistencie (Gee *et al.*, 2018).

Predkladaná diplomová práca vychádza z výsledkov nadobudnutých na Oddelení molekulárnej biológie nádorov (ÚEM AV ČR, v. v. i.), ktoré boli publikované v článku Naccarati *et al.* a zatiaľ nepublikovaných výsledkov oddelenia. V publikovanej štúdii bola analyzovaná asociácia polymorfizmov predikovaných miRNA cieľových miest mutátorových génov zúčastňujúcich sa na oprave dvojlákových zlomov (*double strand breaks*, DSBs) s rizikom vzniku CRC (Naccarati *et al.*, 2016). Proteín MRE11 je jadrom MRN komplexu, ktorý je súčasťou dráhy homológnej rekombinácie (HR) (Petroni *et al.*, 2018). Mirín, ako inhibítor MRE11, blokuje opravu prostredníctvom dráhy HR v cicavčích bunkách (Dupre *et al.*, 2008).

V nádorových tkanivách bola oproti zdravým tkanivám spozorovaná znížená expresia génu *MRE11* (Tang *et al.*, 2017). Bioinformatickou analýzou z online databázy GEPIA (Tang *et al.*, 2017) sme dospeli k zisteniu, že zvýšená expresia MRE11 je asociovaná s horším prežívaním pacientov, ktorým bol diagnostikovaný OC. Na základe tohto zistenie sme následne

predpokladali, že inhibícia MRE11 pomocou mirínu, by mohla mať vplyv na senzitivitu bunkovej línie voči karboplatine a taktiež v získanej rezistencii voči karboplatine.

V rámci *in vitro* funkčných analýz sme sa zamerali na experimentálne overenie vplyvu inhibície MRE11 pomocou roztoku mirínu na bunkovú líniu OC – OVCAR3. Účinok mirínu vykazoval koncentračnú a časovú závislosť. Po 72 hodinách došlo k poklesu bunkovej proliferácie o 85% pri koncentrácii 60  $\mu$ M ( $p = 0,004$ ). Predpokladáme, že mierny účinok mohol byť spôsobený dôsledkom nízkej účinnosti použitej koncentrácie roztoku mirínu, ktorá predstavovala hodnotu IC20 pre mirín. Vplyv koncentračnej závislosti mirínu na proliferáciu nádorových buniek bol pozorovaný aj v práci Ying *et al.*, v ktorej preukázali pokles bunkovej proliferácie aj bunkového rastu (Ying *et al.*, 2012).

Ovplyvnenie nádorových buniek mirínom, ako inhibítorom MRE11, vedie ku akumulácii replikačného stresu a DNA poškodenia, ktoré môžu viesť k významnému poškodeniu nádorového rastu *in vivo* (Bian *et al.*, 2019). Aby sme overili vplyv mirínu na akumuláciu DSBs po jeho aplikácii na bunky, zisťovali sme úroveň hladiny proteínu  $\gamma$ H2AX pomocou proteínovej analýzy. Fosforylovaná forma histónu H2AX je považovaná za skorú bunkovú odpoveď na indukciu DSBs a predstavuje vysoko špecifický marker vzniku DSBs (Mah *et al.*, 2010).

Na základe našich nadobudnutých výsledkov sme dospeli k záveru, že aplikácia roztoku mirínu na bunky OC vedie k zvýšeniu hladiny  $\gamma$ H2AX, a teda ku akumulácii DSBs, čo je v zhode s našou hypotézou, a preto predpokladáme, že mirín by mohol spôsobovať citlivosť buniek OC voči karboplatine. Zvýšenú hladinu  $\gamma$ H2AX pozorovali aj Petroni *et al.*, v ich prípade šlo o analyzovanie buniek neuroblastómu (Petroni *et al.*, 2018).

V klinickej praxi sa častokrát využíva kombinovaná terapia (súčasné podávanie dvoch a viac chemoterapeutických látok). Využitie kombinovanej terapie (karboplatina a chemický agens) dochádzalo k zvýšeniu prežívania bez progresie (*progression free survival*, PFS) u pacientov senzitívnych na platinové deriváty. U pacientov vyznačujúcich sa rezistenciou voči platinovým derivátom bolo tiež evidované zvýšenie PFS po kombinovanej terapii (Matulonis *et al.*, 2016). Viac než 50% *high-grade* serózných karcinómov vaječníkov (*High-grade Serous Ovarian Cancer*, HGSOC), ktoré predstavujú až 80% z epiteliárnych OC, sa vyznačujú defektnou dráhou HR, ktorá predstavuje základ senzitivity OC na platinové deriváty (Damia and Broggin, 2019). Preto bolo ďalším cieľom našej práce definovať efekt inhibície dráhy HR na senzitivitu buniek OVCAR3 voči karboplatine. V prvej fáze našich experimentov sme preukázali účinok roztoku mirínu na vznik DNA poškodenia v bunkách OVCAR3. Následne sme prešli k experimentálnemu definovaniu účinku inhibície MRE11 pomocou mirínu na citlivosť voči karboplatine. V našich experimentoch sme preukázali, že po kombinovanom

ovplyvnení buniek došlo k zníženiu proliferácie v porovnaní s účinkom samotnej karboplatiny. Hodnotením dlhodobého prežívania sme zistili, že pri kombinovanom ovplyvnení dochádza k poklesu počtu kolónií o ~ 63%. Po samostatnom ovplyvnení roztokom karboplatiny bol pokles o ~ 40%. Zhou *et al.* vo svojej štúdií analyzovali účinok karboplatiny v koncentračnej závislosti na bunkách OVCAR3 (Zhou *et al.*, 2018). Vo svojej práci zaznamenali zníženu proliferáciu buniek po aplikácii karboplatiny. Po porovnaní ich výsledkov s našimi výsledkami účinku kombinovaného ovplyvnenia buniek OVCAR3 sa inhibícia dráhy HR, ktorá predchádza ovplyvneniu buniek karboplatinou, vyznačuje efektívnejším účinkom na proliferáciu buniek. Existuje niekoľko individuálnych štúdií, ktoré potvrdzujú senzibilizujúci účinok mirínu na nádorové bunky voči genotoxickým látkam. Podľa nášho vedomia sa žiadna z publikovaných štúdií nevenovala účinku mirínu na bunky karcinómu vaječníkov voči karboplatine, a preto veríme, že naše výsledky sú prvými, ktoré boli nadobudnuté v tejto oblasti. Vo svojej práci Berte *et al.* testovali senzibilizujúci účinok mirínu na nádorové bunky malígneho gliómu voči lomustínu, ktorý cieľ na DNA a v bunkách zvyšuje apoptózu a nekrózu. Ich dáta naznačujú, že farmakologická inhibícia dráhy HR predstavuje rozumnú stratégiu pre vylepšenie protinádorového účinku lomustínu (Berte *et al.*, 2016). Ovejero-Sánchez testoval spoločný účinok mirínu s ďalším chemickým agensom na bunkách OC (Ovejero-Sanchez *et al.*, 2021). V prípade tejto štúdie bol testovaný mirín v kombinácii s chloroquinom, pričom u tejto kombinácie bol pri bunkových línách A2680, SK-OV-3 a IGROV-1 zistený synergický efekt. Kombinovaným ovplyvňovaním nádorových buniek mirínom a platinovým derivátom (cisplatina) sa zaoberali aj Kim *et al.* vo svojej práci. V rámci svojich experimentov skúmali efekt kombinovaného ovplyvňovania mirínu a cisplatiny na prežívanie nádorových buniek obličiek HEK293 (Kim *et al.*, 2015b). Nádorové bunky boli najprv po dobu jednej hodiny ovplyvňované 100µM roztokom mirínu a následne ovplyvnené 25µM roztokom cisplatiny. Kombinované ovplyvnenie viedlo k zníženému prežívaniu buniek HEK293 oproti samostatnému ovplyvneniu roztoku cisplatiny. Na základe našich výsledkov a výsledkov získaných z publikácie (Kim *et al.*, 2015b) je možné predpokladať efektívnejší účinok platinových derivátov na nádorové bunkové línie po predchádzajúcej inhibícii dráhy HR.

Z nami nameraných hodnôt taktiež vyplýva, že dochádza v výraznejšiemu poklesu bunkového rastu po kombinovanom ovplyvnení než po samostatnom ovplyvnení karboplatinou, čo je v súlade s naším predpokladom, že akumulácia poškodenia po aplikácii mirínu, vedie k zvýšenej citlivosti buniek na karboplatinu.

Preto sme sa následne zamerali na analýzu poškodenia DNA v bunkách OVCAR3 detekciou zlomov v molekulách DNA. Analýza prebiehala pomocou *in vitro* Comet Assay,

ktorá sa zameriava na detekciu jednovláknových zlomov (*single strand breaks*, SSBs). Poškodená DNA sa nachádza práve v „chvostovej“ (*tail*) časti kométy a do výsledkov sme zahrňali percentuálne zastúpenie poškodenej DNA. Naše výsledky ukázali mierny, štatisticky nesignifikantný, nárast SSBs po kombinovanom ovplyvnení roztokmi mirínu a karboplatiny oproti samostatnému ovplyvneniu roztokom karboplatiny. V štúdiu Unger *et al.* bol testovaný účinok karboplatiny na bunkách OC na akumuláciu poškodenia DNA prostredníctvom *in vitro* Comet Assay. Ovpľyňovanie buniek roztokom karboplatiny vykazovalo zvýšenie poškodenia DNA ~ 80% (Unger *et al.*, 2009). DSBs zlomy na DNA boli analyzované pomocou metódy Western blot detegovaním hladiny proteínu  $\gamma$ H2AX, ako markeru DSBs. Po inhibícii dráhy HR pomocou mirínu a následnou aplikáciou karboplatiny sme namerali vyššiu hladinu proteínu  $\gamma$ H2AX v porovnaní so samostatným ovplyvnením roztokom karboplatiny, tak ako sme predpokladali. Protinádorovým mechanizmom karboplatiny je tvorba krížových väzieb (intravláknové, intervláknové) (Hah *et al.*, 2006), ktoré sú podobne ako DSBs metódou Comet Assay ťažko detekovateľné (Collins, 2004). Preto predpokladáme, že sme zaznamenali vyšší efekt na akumuláciu poškodenia v rámci proteínovej analýzy hodnotením hladiny proteínu  $\gamma$ H2AX ako v rámci metódy Comet Assay.

Ako už je známe, poškodenie DNA vedie k spusteniu DDR dráh, ktoré môžu ovplyvniť reguláciu bunkového cyklu, aby bola zachovaná stabilita genómu. DNA poškodenie môže viesť aj k zastaveniu bunkového cyklu, na čom sa podieľajú kontrolné body v určitých fázach bunkového cyklu (Visconti *et al.*, 2016). Po zistení vplyvu roztokov mirínu a karboplatiny na obsah poškodenej DNA v bunkách sme sa zamerali na analýzu vplyvu inhibítora MRE11 a platinového derivátu na reguláciu bunkového cyklu a na zmeny v jednotlivých fázach bunkového cyklu. Po ovplyvnení buniek OVCAR3 roztokom karboplatiny došlo k akumulácii buniek v G0/G1 fáze (79%). Tento výsledok je v súlade so štúdiou, na ktorej pracoval Zhou *et al.*. Ovpľyňovaním buniek OVCAR3 roztokom karboplatiny (20  $\mu$ M) a následnou analýzou regulácie bunkového cyklu dospel k záveru, že sa najviac buniek akumuluje v G0/G1 fáze (80%) ( $p = 0,05$ ) (Zhou *et al.*, 2018). Podobné výsledky vyšli po ovplyvňovaní buniek karcinómu močového mechúra roztokom karboplatiny ( $IC_{50} = 283,3 \mu$ M). Nadpolovičná väčšina buniek ovplyvnených roztokom karboplatiny bola akumulovaná v S fáze (53,4%). Podľa autorov došlo ku akumulácii buniek v S fáze z dôvodu zníženej expresie cyklínu E a B (Wang *et al.*, 2010). Samostatný účinok roztoku mirínu v našich experimentoch viedol ku akumulácii buniek v G0/G1 fáze (50%) a G2/M fáze (10%). Dupre *et al.* po ovplyvnení buniek U2OS 100 $\mu$ M roztokom mirínu a ožiarením 10 Gy dosiahol najvyššiu akumuláciu v G2/M fáze (50%) a 20% v G1 fáze. Vo svojej práci vysvetľuje, že vplyvom mirínu v bunkách U2OS



dochádza k zrušeniu žiarením indukovanému kontrolnému bodu, čím dochádza k akumulácii buniek v G2 fáze. V porovnaní s výsledkom po kombinovanom ovplyvnení roztokmi mirínu a karboplatiny došlo k výraznej akumulácii buniek v S fáze, pričom v G2/M fáze sa nenachádzali takmer žiadne bunky.

Vzhľadom na inhibičný účinok mirínu na dráhu HR (Dupre *et al.*, 2008) a asociáciu dráhy NER na opravu poškodenia, spôsobeného karboplatinou, a nami nameranej akumulácie DSBs, sme sa v ďalšej fáze experimentov sústredili na analýzu zmeny expresie génov, ktoré sú súčasťou práve týchto reparačných dráh (Bowden, 2014). V súvislosti s výsledkami analýzy bunkového cyklu sme našu analýzu doplnili gény, ktoré sú asociované s jeho reguláciou. Mechanizmus účinku mirínu spočíva v inhibícii exonukleázovej aktivity MRE11. Konkrétne zabraňuje aktivácii ATM v bunkovej odpovedi na DSBs a blokuje tak HR dráhu (Dupre *et al.*, 2008). ATM kináza je zodpovedaná za fosforyláciu niekoľkých substrátov, medzi ktoré patrí p53, CHK2, NBS1 a BRCA1, ktoré spolu koordinujú zastavenie bunkového cyklu a opravu DNA (Dupre *et al.*, 2008). V našej analýze jeho expresie, po pôsobení roztokov mirínu a karboplatiny, u nádorových buniek OVCAR3 bola expresia *MRE11* zvýšená. Na základe mechanizmu účinku, predpokladáme, že mirín neovplyvňuje na génovú expresiu *MRE11* a inhibuje iba jeho aktivitu (Shibata *et al.*, 2014). K zvýšeniu expresie mohlo taktiež dôjsť v snahe bunky o opravu vyvolanej inhibície (Ilan, 2020). Vyhodnotením našej qPCR analýzy sme zistili zníženú expresiu u všetkých génov asociovaných s mechanizmom účinku mirínu, čo je v súlade s vyššie spomenutým poznatkom. Na druhú stranu, po ovplyvnení roztokom karboplatiny sme zaznamenali zvýšenie expresie génov zúčastňujúcich sa HR dráhy, okrem génov *MRE11* a *RAD51*. MRE11 je jedným z reparačných proteínov, ktoré sú regrutované v odpovedi na DNA poškodenie. Lee *et al.* predpokladajú, že jeho oneskorená expresia po ovplyvnení karboplatinou by mohla znamenať, že bunka sa snaží o syntézu *MRE11 de novo* ako odpoveď na prítomnosť DSBs (Lee *et al.*, 2015). Gén *RAD51* kóduje vysoko konzervovaný proteín RAD51, ktorý katalyzuje opravu DNA prostredníctvom dráhy HR. Znížená expresia *RAD51* teda vedie k zníženej expresii proteínu RAD51 v dráhe HR. Znížená funkcia RAD51 môže viesť buď k predispozícii k nádorovému ochoreniu, alebo – v prípade, že nádorové ochorenie je u pacienta už prítomné – k fenotypu, ktorý je chemo- a rádiosenzitívny (Gachechiladze *et al.*, 2017; Owen *et al.*, 2019). Génova expresia *RAD51* bola po ovplyvnení roztokom karboplatiny znížená aj v štúdií Schoch *et al.* nádorových buniek obličiek A498. Ako sme už spomínali, DNA poškodenie spôsobené roztokom karboplatiny je opravované primárne dráhou NER. Kolektív autorov sa pri svojich experimentoch na nádorových bunkách obličiek A498 platinovými derivátmi zamerali aj na DNA reparačné dráhy. Súčasťou ich štúdie bolo aj zistenie

zmeny génovej expresie po ovplyvnení roztokom karboplatiny (50  $\mu$ M) génov *DBB1* (znížená), *DBB2* (mierne znížená), *XPA* (znížená) a *XPC* (mierne znížená), ktoré sa zúčastňujú NER dráhy. Gén *XPC* je jedným z cieľových génov *TP53*. V uvedenej práci predkladá, že génová expresia *XPC* je jedným z cieľových génov *TP53*, a teda ak dôjde k zníženiu expresie *TP53*, dôjde k zníženiu aj génu *XPC* (Schoch *et al.*, 2020). Obdobné výsledky expresie týchto génov sme dosiahli aj my v predkladanej diplomovej práci. V našich vzorkách došlo po ovplyvnení karboplatinou k zníženiu génovej expresie u oboch týchto génov. V našej práci sme najvýraznejšiu zmenu v expresii zaznamenali pri *RPA1*. Génová expresia bola znížená u všetkých troch typov ovplyvnenia, ale pri samostatnom roztoku karboplatiny bolo zníženie najvýraznejšie. Pri skúmaní RPA ako determinantu cisplatinovej rezistencie buniek vaječníkov (Belanger *et al.*, 2018) zistili, že nízka expresia *RPA* by mohla reprezentovať senzitivitu buniek vaječníkov voči cisplatinu. Keďže karboplatina má obdobný mechanizmus účinku ako cisplatinu, domnievame sa, že nízka expresia *RPA* v rámci našich experimentov mohla poukazovať na senzitivitu buniek voči karboplatinu. Ako už bolo spomínané, dôležitým markerom DSBs je proteín  $\gamma$ H2AX, ktorý je kódovaný génom *H2AFX*. Expresia *H2AFX* je signifikantne ( $p = 0,001$ ) upregulovaná u primárnych aj rekurentných prípadoch OC (Saravi *et al.*, 2020). V rámci našej diplomovej práce sme detegovali zvýšenie génovej expresie *H2AFX* po ovplyvnení roztokom mirínu a karboplatiny a najvýraznejší efekt bol zaznamenaný po kombinovanom ovplyvnení buniek. To súhlasí s našimi výsledkami analýzy poškodenia DNA a tiež expresiou proteínu  $\gamma$ H2AX. Prvotné ovplyvnenie bunkovej línie OVCAR3 mirínom a zablokovanie HR dráhy s následným ovplyvnením karboplatinou zvyšuje poškodenie DNA a zároveň expresiu  $\gamma$ H2AX výraznejšie než samostatné ovplyvnenia roztokmi mirínu a karboplatiny, čo naznačuje zvyšovanie citlivosti buniek voči karboplatinu na základe akumulácie DSBs.

Je všeobecne známe, že rezistencia voči liečebným agensom je jedným z najväčších problémov v liečbe nádorov. Existuje niekoľko mechanizmov, ktoré sa podieľajú na vývoji chemorezistencie, vrátane zvýšenej opravy chemoterapiou spôsobených lézií (Damia and Brogini, 2019). Posledná časť práce bola venovaná charakterizácii bunkovej línie OVCAR3 CbPt R2, rezistentnej voči karboplatinu. Rezistentná línia sa vyznačovala 3,5-krát vyššou hodnotou koncentrácie IC50 než senzitívna línia. Po vykonaní rastovej analýzy sme zistili, že samostatný roztok karboplatiny nemal takmer žiaden vplyv na rast buniek, čo bol náš očakávaný výsledok. Nádory s poruchami HR sa vyznačujú vyšším stupňom chromozomálnej nestability a nie sú schopné opravovať DSB, podporujú senzitivitu na platinové deriváty (Damia and Brogini, 2019). Z tohto dôvodu sme na bunky aplikovali roztok mirínu, ktorý

inhiboval dráhu HR, a výsledkom bolo, že už samostatný vplyv roztoku mirínu na bunky OVCAR3 CbPt R2 bol významnejší. Najvýznamnejšie výsledky sme však dostali po kombinovanom ovplyvnení rezistentnej línie roztokmi mirínu (inhibícia dráhy HR) a karboplatiny. Naše nadobudnuté výsledky vykazujú sľubný potenciál a predkladaná práca ponúka nové možnosti pochopenia mechanizmov rezistencie v OC, ktoré veríme že objasníme v nadväzujúcich experimentoch, ktoré budú v danej problematike pokračovať.

Na základe našich zozbieraných dát a porovnania s publikovanými výsledkami usudzujeme, že prvotné blokovanie HR dráhy aplikáciou inhibítora proteínu MRE11 (mirínu) a následnou aplikáciou karboplatiny zvyšuje citlivosť voči karboplatine a mohlo by to naznačovať nové ciele v rámci terapie OC. Z predložených výsledkov je zrejmé, že kombinované ovplyvňovanie má signifikantnejší efekt na nádorové bunky senzitivne aj rezistentné voči karboplatine než samostatné ovplyvňovanie. Daná problematika bude naďalej skúmaná na Oddelení molekulárnej biológie nádorov (ÚEM AV ČR, v. v. i.). Výsledky experimentov nám prinesú viac informácií ohľadom možného využitia kombinovaného ovplyvňovania roztokmi mirínu a karboplatiny v liečbe OC. Zároveň veríme, že naše poznatky prispejú k porozumeniu mechanizmov spojených s odpoveďou na liečbu a so vznikom rezistencie, ako aj k potenciálne lepšej terapeutickému odpovedi v liečbe OC.

## 7. Záver

Predložená diplomová práca sa zaoberá vplyvom DNA reparačných dráh na chemoterapeutickú terapiu karcinómu vaječníkov a na vznik rezistencie voči chemoterapeutikám. V rámci praktickej časti sa práca zaoberala vplyvom inhibície dráhy homológnej rekombinácie (HR) pomocou MRE11 inhibítora mirínu na citlivosť voči karboplatine u senzitívnej nádorovej bunkovej línie a taktiež u nádorovej bunkovej línie so získanou rezistenciou voči karboplatine.

Kladené ciele boli splnené a v rámci našej práce sa nám podarilo:

- bioinformatickou analýzou zistiť asociáciu medzi zvýšenou expresiou MRE11 a horším prežívaním pacientiek s diagnostikovaným karcinómom vaječníkov,
- *in vitro* funkčnou analýzou preukázať vplyv inhibície dráhy HR na zníženú bunkovú proliferáciu a bunkový rast nádorových buniek v koncentračnej a časovej závislosti. Taktiež sme zaznamenali zvýšenú akumuláciu DNA poškodenia nádorových bunkách, ktorým bola inhibovaná dráha HR,
- *in vitro* funkčnou analýzou dospieť k záveru, že prvotná inhibícia dráhy HR pomocou roztoku mirínu vedie k zvýšenej citlivosti nádorových buniek voči účinkom karboplatiny,
- *in vitro* funkčnou analýzou zaznamenať citlivosť voči účinkom karboplatiny po inhibícii dráhy HR pomocou roztoku mirínu u nádorovej bunkovej línie so získanou rezistenciou.

Z predkladaných výsledkov usudzujeme, že prvotné blokovanie dráhy HR prostredníctvom inhibítora MRE11 (mirínu) vedie k zvýšeniu citlivosti voči účinkom karboplatiny u senzitívnych nádorových buniek aj u nádorových buniek so získanou rezistenciou voči karboplatine. Veríme, že blokovanie dráhy HR v kombinovanej terapii by v budúcnosti mohlo predstavovať nový cieľ terapie karcinómu vaječníkov, či už u senzitívneho alebo rezistentného voči karboplatine.

## 8. Bibliografia

### Odborné články

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.

Agarwal, R., and Kaye, S.B. (2003). Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 3, 502-516.

Alfarouk, K.O., Stock, C.M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A.K., Verduzco, D., Bashir, A.H., Mohammed, O.Y., Elhassan, G.O., Harguindey, S., *et al.* (2015). Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int* 15, 71.

Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E., and Cejka, P. (2016). Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Mol Cell* 64, 940-950.

Belanger, F., Fortier, E., Dube, M., Lemay, J.F., Buisson, R., Masson, J.Y., Elsherbiny, A., Costantino, S., Carmona, E., Mes-Masson, A.M., *et al.* (2018). Replication Protein A Availability during DNA Replication Stress Is a Major Determinant of Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res* 78, 5561-5573.

Berte, N., Piee-Staffa, A., Piecha, N., Wang, M., Borgmann, K., Kaina, B., and Nikolova, T. (2016). Targeting Homologous Recombination by Pharmacological Inhibitors Enhances the Killing Response of Glioblastoma Cells Treated with Alkylating Drugs. *Mol Cancer Ther* 15, 2665-2678.

Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A., and Lobrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J* 28, 3413-3427.

Bian, L., Meng, Y., Zhang, M., and Li, D. (2019). MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. *Mol Cancer* 18, 169.

Bianchini, G., Balko, J.M., Mayer, I.A., Sanders, M.E., and Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 674-690.

Boland, C.R., Koi, M., Chang, D.K., and Carethers, J.M. (2008). The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 7, 41-52.

Bowden, N.A. (2014). Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Lett* 346, 163-171.

- Brandt, S., Samartzis, E.P., Zimmermann, A.K., Fink, D., Moch, H., Noske, A., and Dedes, K.J. (2017). Lack of MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex detection occurs frequently in low-grade epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 17, 44.
- Brill, E., Yokoyama, T., Nair, J., Yu, M., Ahn, Y.R., and Lee, J.M. (2017). Prexasertib, a cell cycle checkpoint kinases 1 and 2 inhibitor, increases in vitro toxicity of PARP inhibition by preventing Rad51 foci formation in BRCA wild type high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget* 8, 111026-111040.
- Brown, J.S., O'Carrigan, B., Jackson, S.P., and Yap, T.A. (2017). Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov* 7, 20-37.
- Burma, S., Chen, B.P., and Chen, D.J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 5, 1042-1048.
- Caldecott, K.W. (2014). DNA single-strand break repair. *Exp Cell Res* 329, 2-8.
- Cannavo, E., and Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* 514, 122-125.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, Hays, L., Morgan, W.F., and Petrini, J.H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-486.
- Cole, A.J., Dwight, T., Gill, A.J., Dickson, K.A., Zhu, Y., Clarkson, A., Gard, G.B., Maidens, J., Valmadre, S., Clifton-Bligh, R., *et al.* (2016). Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Sci Rep* 6, 26191.
- Coley, H.M. (2004). Development of drug-resistant models. *Methods Mol Med* 88, 267-273.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26, 249-261.
- Cortez, A.J., Tudrej, P., Kujawa, K.A., and Lisowska, K.M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 81, 17-38.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713-1716.
- Cramer, D.W., Bast, R.C., Jr., Berg, C.D., Diamandis, E.P., Godwin, A.K., Hartge, P., Lokshin, A.E., Lu, K.H., McIntosh, M.W., Mor, G., *et al.* (2011). Ovarian cancer biomarker performance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 365-374.
- Crum, C.P., Drapkin, R., Miron, A., Ince, T.A., Muto, M., Kindelberger, D.W., and Lee, Y. (2007). The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 19, 3-9.

- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194-198.
- Damia, G., and Broggini, M. (2019). Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair. *Cancers (Basel)* *11*.
- Dasari, S., and Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* *740*, 364-378.
- Davis, A., Tinker, A.V., and Friedlander, M. (2014). "Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol Oncol* *133*, 624-631.
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* *8*, 1129-1135.
- de Sousa Cavalcante, L., and Monteiro, G. (2014). Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol* *741*, 8-16.
- Desai-Mehta, A., Cerosaletti, K.M., and Concannon, P. (2001). Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* *21*, 2184-2191.
- Dobbelstein, M., and Sorensen, C.S. (2015). Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nat Rev Drug Discov* *14*, 405-423.
- Dupre, A., Boyer-Chatenet, L., Sattler, R.M., Modi, A.P., Lee, J.H., Nicolette, M.L., Kopelovich, L., Jasin, M., Baer, R., Paull, T.T., *et al.* (2008). A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol* *4*, 119-125.
- Fields, E.C., McGuire, W.P., Lin, L., and Temkin, S.M. (2017). Radiation Treatment in Women with Ovarian Cancer: Past, Present, and Future. *Front Oncol* *7*, 177.
- Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* *16*, 238-246.
- Friedlander, M., Trimble, E., Tinker, A., Alberts, D., Avall-Lundqvist, E., Brady, M., Harter, P., Pignata, S., Pujade-Lauraine, E., Sehouli, J., *et al.* (2011). Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* *21*, 771-775.
- Gachechiladze, M., Skarda, J., Soltermann, A., and Joerger, M. (2017). RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies. *Int J Cancer* *141*, 1286-1294.
- Gayther, S.A., Russell, P., Harrington, P., Antoniou, A.C., Easton, D.F., and Ponder, B.A. (1999). The contribution of germline BRCA1 and BRCA2 mutations to familial ovarian cancer: no evidence for other ovarian cancer-susceptibility genes. *Am J Hum Genet* *65*, 1021-1029.

- Gee, M.E., Faraahi, Z., McCormick, A., and Edmondson, R.J. (2018). DNA damage repair in ovarian cancer: unlocking the heterogeneity. *J Ovarian Res* *11*, 50.
- Gobbini, E., Cesena, D., Galbiati, A., Lockhart, A., and Longhese, M.P. (2013). Interplays between ATM/Tell1 and ATR/Mec1 in sensing and signaling DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* *12*, 791-799.
- Goff, B. (2012). Symptoms associated with ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* *55*, 36-42.
- Goff, B.A., Mandel, L., Muntz, H.G., and Melancon, C.H. (2000). Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer* *89*, 2068-2075.
- Goodman, M.T., Howe, H.L., Tung, K.H., Hotes, J., Miller, B.A., Coughlin, S.S., and Chen, V.W. (2003). Incidence of ovarian cancer by race and ethnicity in the United States, 1992-1997. *Cancer* *97*, 2676-2685.
- Guan, L.Y., and Lu, Y. (2018). New developments in molecular targeted therapy of ovarian cancer. *Discov Med* *26*, 219-229.
- Guo, C., Song, C., Zhang, J., Gao, Y., Qi, Y., Zhao, Z., and Yuan, C. (2020). Revisiting chemoresistance in ovarian cancer: Mechanism, biomarkers, and precision medicine. *Gene & Diseases*.
- Hah, S.S., Stivers, K.M., de Vere White, R.W., and Henderson, P.T. (2006). Kinetics of carboplatin-DNA binding in genomic DNA and bladder cancer cells as determined by accelerator mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* *19*, 622-626.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hartmann, L.C., and Lindor, N.M. (2016). The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med* *374*, 454-468.
- Hay, T., Matthews, J.R., Pietzka, L., Lau, A., Cranston, A., Nygren, A.O., Douglas-Jones, A., Smith, G.C., Martin, N.M., O'Connor, M., *et al.* (2009). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor treatment regresses autochthonous Brca2/p53-mutant mammary tumors in vivo and delays tumor relapse in combination with carboplatin. *Cancer Res* *69*, 3850-3855.
- Hinkula, M., Pukkala, E., Kyyronen, P., and Kauppila, A. (2006). Incidence of ovarian cancer of grand multiparous women--a population-based study in Finland. *Gynecol Oncol* *103*, 207-211.
- Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* *361*, 1475-1485.



- Hohl, M., Kwon, Y., Galvan, S.M., Xue, X., Tous, C., Aguilera, A., Sung, P., and Petrini, J.H. (2011). The Rad50 coiled-coil domain is indispensable for Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1124-1131.
- Hopfner, K.P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T., Owen, B.A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J.L., McMurray, C.T., *et al.* (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* *418*, 562-566.
- Huang, R.X., and Zhou, P.K. (2020). DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct Target Ther* *5*, 60.
- Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., and Jackson, S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* *455*, 689-692.
- Huncharek, M., and Muscat, J. (2011). Perineal talc use and ovarian cancer risk: a case study of scientific standards in environmental epidemiology. *Eur J Cancer Prev* *20*, 501-507.
- Hunn, J., and Rodriguez, G.C. (2012). Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol* *55*, 3-23.
- Chen, X., Niu, H., Chung, W.H., Zhu, Z., Papusha, A., Shim, E.Y., Lee, S.E., Sung, P., and Ira, G. (2011). Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1015-1019.
- Chien, J., and Poole, E.M. (2017). Ovarian Cancer Prevention, Screening, and Early Detection: Report From the 11th Biennial Ovarian Cancer Research Symposium. *Int J Gynecol Cancer* *27*, S20-S22.
- Cho, K.R., and Shih Ie, M. (2009). Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* *4*, 287-313.
- Choi, M., Kipps, T., and Kurzrock, R. (2016). ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* *15*, 1781-1791.
- Ilan, Y. (2020). Overcoming Compensatory Mechanisms toward Chronic Drug Administration to Ensure Long-Term, Sustainable Beneficial Effects. *Mol Ther Methods Clin Dev* *18*, 335-344.
- Ishida, S., McCormick, F., Smith-McCune, K., and Hanahan, D. (2010). Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell* *17*, 574-583.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071-1078.
- Jacobs, I., and Bast, R.C., Jr. (1989). The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* *4*, 1-12.
- Jayson, G.C., Kohn, E.C., Kitchener, H.C., and Ledermann, J.A. (2014). Ovarian cancer. *Lancet* *384*, 1376-1388.

- Jeggo, P.A., Pearl, L.H., and Carr, A.M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer* 16, 35-42.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 335-346.
- Johnson, N., Li, Y.C., Walton, Z.E., Cheng, K.A., Li, D., Rodig, S.J., Moreau, L.A., Unitt, C., Bronson, R.T., Thomas, H.D., *et al.* (2011). Compromised CDK1 activity sensitizes BRCA-proficient cancers to PARP inhibition. *Nat Med* 17, 875-882.
- Kaelin, W.G., Jr. (2005). The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 5, 689-698.
- Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., and Nakano, H. (2003). Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* 36, 9-17.
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., and Elledge, S.J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* 349, aaa5612.
- Karlsson, K.H., and Stenerlow, B. (2004). Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions. *Radiat Res* 161, 517-527.
- Karnitz, L.M., and Zou, L. (2015). Molecular Pathways: Targeting ATR in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 21, 4780-4785.
- Kessous, R., Oceau, D., Klein, K., Tonin, P.N., Greenwood, C.M.T., Pelmus, M., Laskov, I., Kogan, L., Salvador, S., Lau, S., *et al.* (2018). Distinct homologous recombination gene expression profiles after neoadjuvant chemotherapy associated with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 148, 553-558.
- Kim, H., George, E., Ragland, R., Rafail, S., Zhang, R., Krepler, C., Morgan, M., Herlyn, M., Brown, E., and Simpkins, F. (2017a). Targeting the ATR/CHK1 Axis with PARP Inhibition Results in Tumor Regression in BRCA-Mutant Ovarian Cancer Models. *Clin Cancer Res* 23, 3097-3108.
- Kim, J.H., Grosbart, M., Anand, R., Wyman, C., Cejka, P., and Petrini, J.H.J. (2017b). The Mre11-Nbs1 Interface Is Essential for Viability and Tumor Suppression. *Cell Rep* 18, 496-507.
- Kim, M.K., James, J., and Annunziata, C.M. (2015a). Topotecan synergizes with CHEK1 (CHK1) inhibitor to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 15, 196.
- Kim, Y.J., Kim, T.W., Park, S.R., Kim, H.T., Ryu, S.Y., and Jung, J.Y. (2015b). Expression of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in cisplatin nephrotoxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 40, 12-17.
- Kishimoto, S., Yasuda, M., and Fukushima, S. (2017). Changes in the Expression of Various Transporters as Influencing Factors of Resistance to Cisplatin. *Anticancer Res* 37, 5477-5484.

- Koczkowska, M., Krawczynska, N., Stukan, M., Kuzniacka, A., Brozek, I., Sniadecki, M., Debniak, J., Wydra, D., Biernat, W., Kozłowski, P., *et al.* (2018). Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients. *Cancers (Basel)* 10.
- Konstantinopoulos, P.A., Ceccaldi, R., Shapiro, G.I., and D'Andrea, A.D. (2015). Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov* 5, 1137-1154.
- Kubelac, P., Genestie, C., Auguste, A., Mesnage, S., Le Formal, A., Pautier, P., Gouy, S., Morice, P., Bentivegna, E., Maulard, A., *et al.* (2020). Changes in DNA Damage Response Markers with Treatment in Advanced Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)* 12.
- Kuchenbaecker, K.B., Hopper, J.L., Barnes, D.R., Phillips, K.A., Mooij, T.M., Roos-Blom, M.J., Jervis, S., van Leeuwen, F.E., Milne, R.L., Andrieu, N., *et al.* (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* 317, 2402-2416.
- Kurian, A.W., and Ford, J.M. (2015). Multigene Panel Testing in Oncology Practice: How Should We Respond? *JAMA Oncol* 1, 277-278.
- Kurman, R.J., and Shih Ie, M. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol* 186, 733-747.
- Kwon, J.S., Tinker, A., Pansegrau, G., McAlpine, J., Housty, M., McCullum, M., and Gilks, C.B. (2013). Prophylactic salpingectomy and delayed oophorectomy as an alternative for BRCA mutation carriers. *Obstet Gynecol* 121, 14-24.
- La Vecchia, C. (2017). Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev* 26, 55-62.
- Labidi-Galy, S.I., Papp, E., Hallberg, D., Niknafs, N., Adleff, V., Noe, M., Bhattacharya, R., Novak, M., Jones, S., Phallen, J., *et al.* (2017). High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun* 8, 1093.
- Landen, C.N., Jr., Birrer, M.J., and Sood, A.K. (2008). Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 26, 995-1005.
- Lee, J.M., Gordon, N., Trepel, J.B., Lee, M.J., Yu, M., and Kohn, E.C. (2015). Development of a multiparameter flow cytometric assay as a potential biomarker for homologous recombination deficiency in women with high-grade serous ovarian cancer. *J Transl Med* 13, 239.
- Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 177, 1053-1064.
- Lightfoot, M., Montemorano, L., and Bixel, K. (2020). PARP Inhibitors in Gynecologic Cancers: What Is the Next Big Development? *Curr Oncol Rep* 22, 29.

- Lloyd, R.L., Wijnhoven, P.W.G., Ramos-Montoya, A., Wilson, Z., Illuzzi, G., Falenta, K., Jones, G.N., James, N., Chabbert, C.D., Stott, J., *et al.* (2020). Combined PARP and ATR inhibition potentiates genome instability and cell death in ATM-deficient cancer cells. *Oncogene* 39, 4869-4883.
- Lobachev, K., Vitriol, E., Stemple, J., Resnick, M.A., and Bloom, K. (2004). Chromosome fragmentation after induction of a double-strand break is an active process prevented by the RMX repair complex. *Curr Biol* 14, 2107-2112.
- Lopez-Guerrero, J.A., Romero, I., and Poveda, A. (2015). Trabectedin therapy as an emerging treatment strategy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *Chin J Cancer* 34, 41-49.
- Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y., Jackson, S.P., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J* 23, 2674-2683.
- Madariaga, A., Lheureux, S., and Oza, A.M. (2019). Tailoring Ovarian Cancer Treatment: Implications of BRCA1/2 Mutations. *Cancers (Basel)* 11.
- Mah, L.J., El-Osta, A., and Karagiannis, T.C. (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24, 679-686.
- Mallen, A., Soong, T.R., Townsend, M.K., Wenham, R.M., Crum, C.P., and Tworoger, S.S. (2018). Surgical prevention strategies in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 151, 166-175.
- Manchanda, R., Legood, R., Antoniou, A.C., Pearce, L., and Menon, U. (2018). Commentary on changing the risk threshold for surgical prevention of ovarian cancer. *BJOG* 125, 541-544.
- Marchetti, C., De Felice, F., Palaia, I., Perniola, G., Musella, A., Musio, D., Muzii, L., Tombolini, V., and Panici, P.B. (2014). Risk-reducing salpingo-oophorectomy: a meta-analysis on impact on ovarian cancer risk and all cause mortality in BRCA 1 and BRCA 2 mutation carriers. *BMC Womens Health* 14, 150.
- Mariappan, L., Jiang, X.Y., Jackson, J., and Drew, Y. (2017). Emerging treatment options for ovarian cancer: focus on rucaparib. *Int J Womens Health* 9, 913-924.
- Matulonis, U.A., Sood, A.K., Fallowfield, L., Howitt, B.E., Sehouli, J., and Karlan, B.Y. (2016). Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16061.
- McCuaig, J.M., Stockley, T.L., Shaw, P., Fung-Kee-Fung, M., Altman, A.D., Bentley, J., Bernardini, M.Q., Cormier, B., Hirte, H., Kieser, K., *et al.* (2018). Evolution of genetic assessment for BRCA-associated gynaecologic malignancies: a Canadian multisociety roadmap. *J Med Genet* 55, 571-577.
- Menon, U., Karpinskyj, C., and Gentry-Maharaj, A. (2018). Ovarian Cancer Prevention and Screening. *Obstet Gynecol* 131, 909-927.

- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., and Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health* *11*, 287-299.
- Monk, B.J., Kaye, S.B., Poveda, A., Herzog, T.J., Aracil, M., Nieto, A., Badri, N., Parekh, T.V., Tanovic, A., and Galmarini, C.M. (2014). Nibrin is a marker of clinical outcome in patients with advanced serous ovarian cancer treated in the phase III OVA-301 trial. *Gynecol Oncol* *132*, 176-180.
- Moore, R.G., McMeekin, D.S., Brown, A.K., DiSilvestro, P., Miller, M.C., Allard, W.J., Gajewski, W., Kurman, R., Bast, R.C., Jr., and Skates, S.J. (2009). A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* *112*, 40-46.
- Moynahan, M.E., and Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 196-207.
- Naccarati, A., Rosa, F., Vymetalkova, V., Barone, E., Jiraskova, K., Di Gaetano, C., Novotny, J., Levy, M., Vodickova, L., Gemignani, F., *et al.* (2016). Double-strand break repair and colorectal cancer: gene variants within 3' UTRs and microRNAs binding as modulators of cancer risk and clinical outcome. *Oncotarget* *7*, 23156-23169.
- Nakamura, M., Obata, T., Daikoku, T., and Fujiwara, H. (2019). The Association and Significance of p53 in Gynecologic Cancers: The Potential of Targeted Therapy. *Int J Mol Sci* *20*.
- Naskou, J., Beiter, Y., van Rensburg, R., Honisch, E., Rudelius, M., Schlenz, M., Gottstein, J., Walter, L., Braicu, E.I., Sehouli, J., *et al.* (2020). EZH2 Loss Drives Resistance to Carboplatin and Paclitaxel in Serous Ovarian Cancers Expressing ATM. *Mol Cancer Res* *18*, 278-286.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* *391*, 407-410.
- Nicolas, J.M., Bouzom, F., Hugues, C., and Ungell, A.L. (2017). Oral drug absorption in pediatrics: the intestinal wall, its developmental changes and current tools for predictions. *Biopharm Drug Dispos* *38*, 209-230.
- O'Connor, M.J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell* *60*, 547-560.
- Ohrvik, H., Nose, Y., Wood, L.K., Kim, B.E., Gleber, S.C., Ralle, M., and Thiele, D.J. (2013). Ctr2 regulates biogenesis of a cleaved form of mammalian Ctr1 metal transporter lacking the copper- and cisplatin-binding ecto-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, E4279-4288.
- Olsen, C.M., Green, A.C., Whiteman, D.C., Sadeghi, S., Kolahdooz, F., and Webb, P.M. (2007). Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* *43*, 690-709.

- Ovejero-Sanchez, M., Gonzalez-Sarmiento, R., and Herrero, A.B. (2021). Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. *Neoplasia* 23, 515-528.
- Owen, D.H., Williams, T.M., Bertino, E.M., Mo, X., Webb, A., Schweitzer, C., Liu, T., Roychowdhury, S., Timmers, C.D., and Otterson, G.A. (2019). Homologous recombination and DNA repair mutations in patients treated with carboplatin and nab-paclitaxel for metastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 134, 167-173.
- Patch, A.M., Christie, E.L., Etemadmoghadam, D., Garsed, D.W., George, J., Fereday, S., Nones, K., Cowin, P., Alsop, K., Bailey, P.J., *et al.* (2015). Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 521, 489-494.
- Pelucchi, C., Galeone, C., Talamini, R., Bosetti, C., Montella, M., Negri, E., Franceschi, S., and La Vecchia, C. (2007). Lifetime ovulatory cycles and ovarian cancer risk in 2 Italian case-control studies. *Am J Obstet Gynecol* 196, 83 e81-87.
- Petroni, M., Sardina, F., Infante, P., Bartolazzi, A., Locatelli, E., Fabretti, F., Di Giulio, S., Capalbo, C., Cardinali, B., Coppa, A., *et al.* (2018). MRE11 inhibition highlights a replication stress-dependent vulnerability of MYCN-driven tumors. *Cell Death Dis* 9, 895.
- Pilie, P.G., Tang, C., Mills, G.B., and Yap, T.A. (2019). State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 81-104.
- Ray Chaudhuri, A., Callen, E., Ding, X., Gogola, E., Duarte, A.A., Lee, J.E., Wong, N., Lafarga, V., Calvo, J.A., Panzarino, N.J., *et al.* (2016). Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* 535, 382-387.
- Reid, B.M., Permuth, J.B., and Sellers, T.A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* 14, 9-32.
- Riches, L.C., Trinidad, A.G., Hughes, G., Jones, G.N., Hughes, A.M., Thomason, A.G., Gavine, P., Cui, A., Ling, S., Stott, J., *et al.* (2020). Pharmacology of the ATM Inhibitor AZD0156: Potentiation of Irradiation and Olaparib Responses Preclinically. *Mol Cancer Ther* 19, 13-25.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Rojas, V., Hirshfield, K.M., Ganesan, S., and Rodriguez-Rodriguez, L. (2016). Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci* 17.
- Roos, W.P., Thomas, A.D., and Kaina, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* 16, 20-33.

Rottenberg, S., Jaspers, J.E., Kersbergen, A., van der Burg, E., Nygren, A.O., Zander, S.A., Derksen, P.W., de Bruin, M., Zevenhoven, J., Lau, A., *et al.* (2008). High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 17079-17084.

Russell, M.R., Walker, M.J., Williamson, A.J., Gentry-Maharaj, A., Ryan, A., Kalsi, J., Skates, S., D'Amato, A., Dive, C., Pernemalm, M., *et al.* (2016). Protein Z: A putative novel biomarker for early detection of ovarian cancer. *Int J Cancer* *138*, 2984-2992.

Saini, P., Li, Y., and Dobbstein, M. (2015). Wee1 is required to sustain ATR/Chk1 signaling upon replicative stress. *Oncotarget* *6*, 13072-13087.

Saravi, S., Katsuta, E., Jeyaneethi, J., Amin, H.A., Kaspar, M., Takabe, K., Pados, G., Drenos, F., Hall, M., and Karteris, E. (2020). H2A Histone Family Member X (H2AX) Is Upregulated in Ovarian Cancer and Demonstrates Utility as a Prognostic Biomarker in Terms of Overall Survival. *J Clin Med* *9*.

Seeber, A., Hegnauer, A.M., Hustedt, N., Deshpande, I., Poli, J., Eglinger, J., Pasero, P., Gut, H., Shinohara, M., Hopfner, K.P., *et al.* (2016). RPA Mediates Recruitment of MRX to Forks and Double-Strand Breaks to Hold Sister Chromatids Together. *Mol Cell* *64*, 951-966.

Sekine, M., Nagata, H., Tsuji, S., Hirai, Y., Fujimoto, S., Hatae, M., Kobayashi, I., Fujii, T., Nagata, I., Ushijima, K., *et al.* (2001). Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 and clinicopathologic analysis of ovarian cancer in 82 ovarian cancer families: two common founder mutations of BRCA1 in Japanese population. *Clin Cancer Res* *7*, 3144-3150.

Sekine, M., Nishino, K., and Enomoto, T. (2021). BRCA Genetic Test and Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy for Hereditary Breast and Ovarian Cancer: State-of-the-Art. *Cancers (Basel)* *13*.

Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genoio, M.M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokallio, A., Romoli, F., *et al.* (2014). DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol Cell* *53*, 7-18.

Shiotani, B., and Zou, L. (2009). Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell* *33*, 547-558.

Schoch, S., Gajewski, S., Rothfuss, J., Hartwig, A., and Koberle, B. (2020). Comparative Study of the Mode of Action of Clinically Approved Platinum-Based Chemotherapeutics. *Int J Mol Sci* *21*.

Slatnik, C.L., and Duff, E. (2015). Ovarian cancer: Ensuring early diagnosis. *Nurse Pract* *40*, 47-54.

Slipicevic, A., Holth, A., Hellesylt, E., Trope, C.G., Davidson, B., and Florenes, V.A. (2014). Wee1 is a novel independent prognostic marker of poor survival in post-chemotherapy ovarian carcinoma effusions. *Gynecol Oncol* *135*, 118-124.

- Stewart, C., Ralyea, C., and Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs* 35, 151-156.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
- Stracker, T.H., and Petrini, J.H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 90-103.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.
- Sultana, R., Abdel-Fatah, T., Abbotts, R., Hawkes, C., Albarakati, N., Seedhouse, C., Ball, G., Chan, S., Rakha, E.A., Ellis, I.O., *et al.* (2013). Targeting XRCC1 deficiency in breast cancer for personalized therapy. *Cancer Res* 73, 1621-1634.
- Sultana, R., McNeill, D.R., Abbotts, R., Mohammed, M.Z., Zdzienicka, M.Z., Qutob, H., Seedhouse, C., Laughton, C.A., Fischer, P.M., Patel, P.M., *et al.* (2012). Synthetic lethal targeting of DNA double-strand break repair deficient cells by human apurinic/apyrimidinic endonuclease inhibitors. *Int J Cancer* 131, 2433-2444.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209-249.
- Syed, A., and Tainer, J.A. (2018). The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem* 87, 263-294.
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., and Zhang, Z. (2017). GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res* 45, W98-W102.
- Titus-Ernstoff, L., Perez, K., Cramer, D.W., Harlow, B.L., Baron, J.A., and Greenberg, E.R. (2001). Menstrual and reproductive factors in relation to ovarian cancer risk. *Br J Cancer* 84, 714-721.
- Tomao, F., D'Incalci, M., Biagioli, E., Peccatori, F.A., and Colombo, N. (2017). Restoring platinum sensitivity in recurrent ovarian cancer by extending the platinum-free interval: Myth or reality? *Cancer* 123, 3450-3459.
- Tomasova, K., Cumova, A., Seborova, K., Horak, J., Koucka, K., Vodickova, L., Vaclavikova, R., and Vodicka, P. (2020). DNA Repair and Ovarian Carcinogenesis: Impact on Risk, Prognosis and Therapy Outcome. *Cancers (Basel)* 12.



- Torre, L.A., Trabert, B., DeSantis, C.E., Miller, K.D., Samimi, G., Runowicz, C.D., Gaudet, M.M., Jemal, A., and Siegel, R.L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68, 284-296.
- Trujillo, K.M., Roh, D.H., Chen, L., Van Komen, S., Tomkinson, A., and Sung, P. (2003). Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends. *J Biol Chem* 278, 48957-48964.
- Tsukamoto, Y., Mitsuoka, C., Terasawa, M., Ogawa, H., and Ogawa, T. (2005). Xrs2p regulates Mre11p translocation to the nucleus and plays a role in telomere elongation and meiotic recombination. *Mol Biol Cell* 16, 597-608.
- Turk, A.A., and Wisinski, K.B. (2018). PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. *Cancer* 124, 2498-2506.
- Tworoger, S.S., Fairfield, K.M., Colditz, G.A., Rosner, B.A., and Hankinson, S.E. (2007). Association of oral contraceptive use, other contraceptive methods, and infertility with ovarian cancer risk. *Am J Epidemiol* 166, 894-901.
- Umakanthan, S., Chattu, V.K., and Kalloo, S. (2019). Global epidemiology, risk factors, and histological types of ovarian cancers in Trinidad. *J Family Med Prim Care* 8, 1058-1064.
- Unger, F.T., Klasen, H.A., Tchertchian, G., de Wilde, R.L., and Witte, I. (2009). DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* 9, 359.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S.M. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* 119, 777-788.
- Vargas, A.N. (2014). Natural history of ovarian cancer. *Ecancermedicalsecience* 8, 465.
- Visconti, R., Della Monica, R., and Grieco, D. (2016). Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *J Exp Clin Cancer Res* 35, 153.
- Vodicka, P., Vodenkova, S., Opattova, A., and Vodickova, L. (2019). DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients. *Mutat Res* 843, 95-110.
- Wagstaff, A.J., Ward, A., Benfield, P., and Heel, R.C. (1989). Carboplatin. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer. *Drugs* 37, 162-190.
- Walker, J.L., Powell, C.B., Chen, L.M., Carter, J., Bae Jump, V.L., Parker, L.P., Borowsky, M.E., and Gibb, R.K. (2015). Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. *Cancer* 121, 2108-2120.
- Wang, S., Zhang, H., Cheng, L., Evans, C., and Pan, C.X. (2010). Analysis of the cytotoxic activity of carboplatin and gemcitabine combination. *Anticancer Res* 30, 4573-4578.

- Weigelt, B., Comino-Mendez, I., de Bruijn, I., Tian, L., Meisel, J.L., Garcia-Murillas, I., Fribbens, C., Cutts, R., Martelotto, L.G., Ng, C.K.Y., *et al.* (2017). Diverse BRCA1 and BRCA2 Reversion Mutations in Circulating Cell-Free DNA of Therapy-Resistant Breast or Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 6708-6720.
- West, S.C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 435-445.
- Wilson, S.H., Beard, W.A., Shock, D.D., Batra, V.K., Cavanaugh, N.A., Prasad, R., Hou, E.W., Liu, Y., Asagoshi, K., Horton, J.K., *et al.* (2010). Base excision repair and design of small molecule inhibitors of human DNA polymerase beta. *Cell Mol Life Sci* 67, 3633-3647.
- Wiltzius, J.J., Hohl, M., Fleming, J.C., and Petrini, J.H. (2005). The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* 12, 403-407.
- Wong-Brown, M.W., van der Westhuizen, A., and Bowden, N.A. (2020). Targeting DNA Repair in Ovarian Cancer Treatment Resistance. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 32, 518-526.
- Yang, W.L., Gentry-Maharaj, A., Simmons, A., Ryan, A., Fourkala, E.O., Lu, Z., Baggerly, K.A., Zhao, Y., Lu, K.H., Bowtell, D., *et al.* (2017). Elevation of TP53 Autoantibody Before CA125 in Preclinical Invasive Epithelial Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 5912-5922.
- Ye, Q., Chen, L., Yin, X., Liu, Y.J., Ji, Q., and Zhao, E. (2014). Development of serous ovarian cancer is associated with the expression of homologous recombination pathway proteins. *Pathol Oncol Res* 20, 931-938.
- Ying, S., Hamdy, F.C., and Helleday, T. (2012). Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res* 72, 2814-2821.
- Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16, 2-9.
- Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., and Yu, X. (2009). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol* 19, 524-529.
- Zhang, Y., and Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer* 134, 1013-1023.
- Zheng, F., Zhang, Y., Chen, S., Weng, X., Rao, Y., and Fang, H. (2020). Mechanism and current progress of Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomed Pharmacother* 123, 109661.
- Zheng, H., Shao, F., Martin, S., Xu, X., and Deng, C.X. (2017). WEE1 inhibition targets cell cycle checkpoints for triple negative breast cancers to overcome cisplatin resistance. *Sci Rep* 7, 43517.

Zhou, H., Zhao, H., Liu, H., Xu, X., Dong, X., and Zhao, E. (2018). Influence of carboplatin on the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through mTOR/p70s6k signaling pathway. *J BUON* 23, 1732-1738.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.

### **Internetové databázy**

American Cancer Society, 2018. *Ovarian Cancer Stages* [online]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>

American Cancer Society, 2021. *Key Statistics for Ovarian Cancer* [online]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>

Cancer Research UK, 2020. *Ovarian Cancer survival statistics* [online]. Dostupné z: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/ovarian-cancer/survival#heading-Zero>

Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice, 2018. *Incidence a mortalita rakoviny vaječníku* [online]. Dostupné z: <https://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>

National Cancer Institute, 2020. *Cancer Stat Facts: Ovarian Cancer* [online]. Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>

## Príloha

**Tabuľka P1:** Štádia OC podľa American Cancer Society (2018). Klasifikácia TMN systémom, pričom T predstavuje veľkosť nádoru, N rozšírenie do lymfatických uzlín a M metastázovanie do okolitých tkanív. Ďalšie kategórie, ktoré neboli spomenuté v tabuľke sú: TX (hlavný nádor nemôže byť posúdený vzhľadom na nedostatok informácií), T0 (bez dôkazu primárneho nádoru) a NX (okolité lymfatické uzliny nemôžu byť posúdené vzhľadom na nedostatok informácií).

AJCC	Štádium	FIGO	Opis štádia
I	T1 N0 M0	I	Nádor je lokalizovaný len vo vaječníku (alebo vaječníkoch) alebo vajcovodoch (T1).  Nádor nie je rozšírený do okolitých lymfatických uzlín (N0) alebo distálnych tkanív (M0).
IA	T1a N0 M0	IA	Nádor lokalizovaný v jednom vaječníku a je upevnený v jeho vnútri; alebo: nádor sa nachádza vo vnútri len jedného vajcovodu. Nádor sa nenachádza na vonkajšom povrchu ani vaječníka, ani vajcovodu. Nádorové bunky sa nenachádzajú v tekutine (ascity) alebo výlučkov z brušnej alebo panvovej dutiny (T1a).  Nádor nie je rozšírený do okolitých lymfatických uzlín (N0) alebo distálnych tkanív (M0).
IB	T1b N0 M0	IB	Nádor je lokalizovaný v oboch vaječníkoch alebo vajcovodoch, ale nie na ich vonkajšom povrchu. Nádorové bunky sa nenachádzajú v ascitoch alebo výlučkoch z brušnej alebo panvovej dutiny (T1b).  Nádor nie je rozšírený do okolitých lymfatických uzlín (N0) alebo distálnych tkanív (M0).
IC	T1c N0 M0	IC	Nádor je v jednom alebo oboch vaječníkoch, alebo vajcovodoch a ani jedno z nasledujúcich charakteristík nie je prítomné: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tkanivo (kapsula), obklopujúce nádor, je prasknuté následkom operácie, čo by umožňovalo nádorovým bunkám preniknúť do brušnej alebo panvovej dutiny (tzv. <b>chirurgický únik</b>). Toto štádium sa nazýva <b>IC1</b>.</li> <li>• Nádor sa nachádza na vonkajšom povrchu aspoň jedného z vaječníkov alebo vajcovodov <b>alebo</b> prasknutie kapsuly ešte pred operáciou (uvoľnenie nádorových buniek do brušnej alebo panvovej dutiny). Toto štádium sa nazýva <b>IC2</b>.</li> <li>• Nádorové bunky sú prítomné v ascitoch alebo výlučkoch z brušnej alebo panvovej dutiny. Toto štádium sa nazýva <b>IC3</b>.</li> <li>•</li> </ul> Nádor nie je rozšírený do okolitých lymfatických uzlín (N0) alebo distálnych tkanív (M0).
II	T2 N0 M0	II	Nádor je prítomný v jednom alebo oboch vaječníkoch alebo vajcovodoch a rozšíril sa do okolitých orgánov (maternica, močový mechúr, esovitá kľučka hrubého čreva, konečník) v panve <b>alebo</b> je prítomná primárny peritoneálny nádor (T2).  Nádor nie je rozšírený do okolitých lymfatických uzlín (N0) alebo distálnych tkanív (M0).
IIA	T2a N0 M0	IIA	Nádor sa rozšíril a prešiel do maternice alebo vajcovodu, alebo vaječníkov (T2a).  Nádor nie je rozšírený do okolitých lymfatických uzlín (N0) alebo distálnych tkanív (M0).

Príloha

IIB	T2a N0 M0	IIB	Nádor je prítomný na vonkajšom povrchu alebo vrástol do blízkych orgánov v panvovej dutine ako je močový mechúr, esovitá kľučka hrubého čreva alebo konečník (T2b). Nádor nie je rozšírený do okolitých lymfatických uzlín (N0) alebo distálnych tkanív (M0).
IIIA1	T1 alebo T2 N1 M0	IIIA	Nádor je prítomný v jednom alebo oboch vaječníkoch alebo vajcovodoch, <b>alebo</b> je prítomný primárny peritoneálny nádor (T1) a môže byť rozšírený alebo vrastený do blízkych okolitých orgánov v panvovej dutine (T2). nádor je rozšírený len do retroperitoneálnych (panvových a/alebo para-aortických) lymfatických uzlín.  Nádor nie je rozšírený do distálnych tkanív (M0).
IIIA2	T3a N0 alebo N1 M0	IIIA2	Nádor je prítomný v jednom alebo oboch vaječníkoch alebo vajcovodoch, <b>alebo</b> je prítomný primárny peritoneálny nádor a je rozšírený alebo vrastený do orgánov v panvovej oblasti. Nádor nie je v brušnej dutine (mimo panvovej dutiny) počas operácie viditeľný voľným okom , ale počas laboratórnych vyšetrení je možné zachytiť malé vrstvy nádoru v ohraničení brušnej dutiny.  Nádor môže no nemusí byť rozšírený do retroperitoneálnych lymfatických uzlín (N0 alebo N1), ale nie je rozšírený do distálnych tkanív (M0).
IIIB	T3b N0 alebo N1 M0	IIIB	Nádor je prítomný v jednom alebo oboch vaječníkoch alebo vajcovodoch, <b>alebo</b> je prítomný primárny peritoneálny nádor a je rozšírený alebo vrastený do orgánov v panvovej dutine. Vrstvy nádoru sú dostatočne veľké na to, aby boli zachytené okom chirurga, ale v priemere nie sú väčšie než 2cm (T3b).  Nádor môže no nemusí byť rozšírený do retroperitoneálnych lymfatických uzlín (N0 alebo N1), ale nie je rozšírený do distálnych tkanív (M0).
IIIC	T3c N0 alebo N1 M0	IIIC	Nádor je prítomný v jednom alebo oboch vaječníkoch alebo vajcovodoch, <b>alebo</b> je prítomný primárny peritoneálny nádor a je rozšírený alebo vrastený do orgánov v panvovej dutine. Vrstvy nádoru sú v priemere väčšie ako 2cm a môžu sa nachádzať na vonkajšom povrchu (kapsula) pečene alebo sleziny (T3c).  Nádor môže no nemusí byť rozšírený do retroperitoneálnych lymfatických uzlín (N0 alebo N1), ale nie je rozšírený do distálnych tkanív (M0).
IVA	Žiadne T Žiadne N M1a	IVA	Nádorové bunky sú prítomné v tekutine obkolesujúcej pľúca (tzv. zhubný pleurálny výtok) bez prítomnosti nádoru v ostatných oblastiach ako je pečeň, slezina, črevo alebo lymfatické uzliny mimo brušnej dutiny (M1a).
IVB	Žiadne T Žiadne N M1b	IVB	Nádor je rozšírený do vnútra sleziny alebo pečene, do lymfatických uzlín mimo retroperitoneálnych uzlín, a/alebo do ostatných orgánov alebo tkanív mimo peritoneálnej dutiny ako sú pľúca či kosti (M1b).