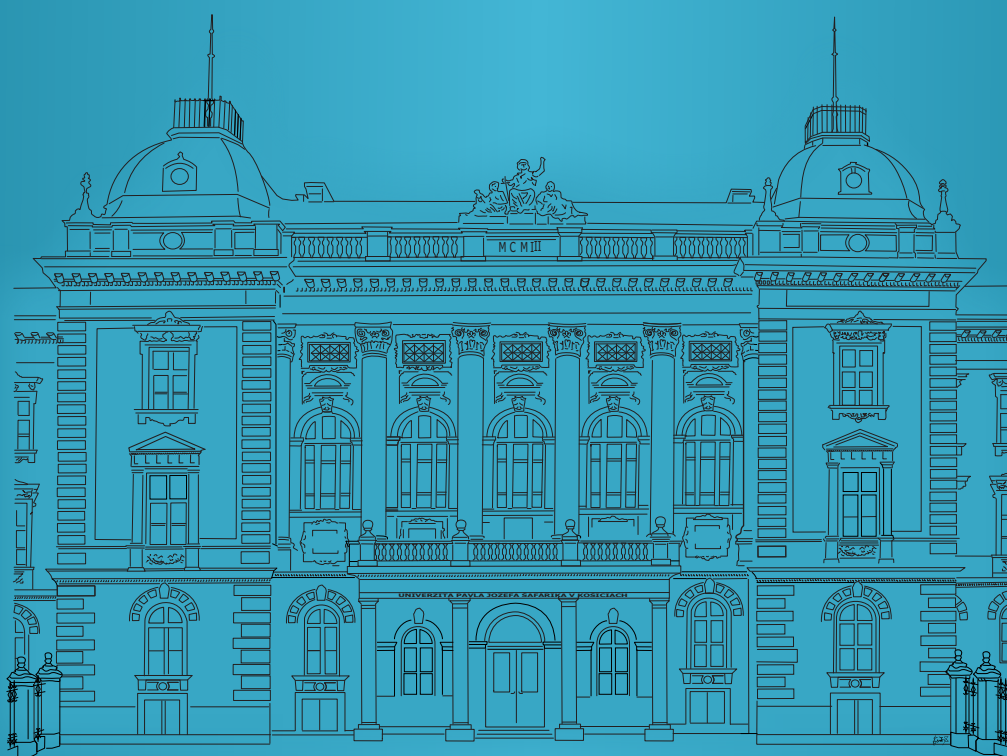




FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA



UNIVERSITAS ŠAFARIKIANA

Tomus 78, No. 1, 2024



FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA

Časopis FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA publikuje recenzované pôvodné vedecké práce, prehľadné referáty, kazuistiky, výskumné správy z oblasti základného, aplikovaného a klinického výskumu v odboroch humánnej medicíny a príbuzných vied. Uverejňuje tiež abstrakty z vedeckých a odborných podujatí spoluorganizovaných UPJŠ LF.

Pokyny pre autorov: <http://www.lf.upjs.sk/foliamedica>

**Predseda
redakčnej rady**

doc. MUDr. Roman BEŇAČKA, CSc.

Vedecký redaktor

doc. MUDr. Jozef FIRMENT, PhD.

Redakčná rada

prof. MUDr. Andrej BÖÖR, CSc.
prof. MUDr. Zuzana GDOVINOVÁ, CSc., FESO, FEAN
prof. MUDr. Ján JAKUŠ, DrSc.
Dr. h. c. prof. MUDr. Pavol Jarčuška PhD.
prof. MUDr. Ján MOJŽIŠ, DrSc.
doc. RNDr. Ján SABO, CSc., univer. prof.
Dr.h.c. prof. MUDr. Leonard SIEGFRIED, CSc.

FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA

časopis pre lekárske, farmaceutické a biologické vedy

Ročník 78 Číslo 1/2024
ISSN 1337-7817

Vydáva:

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
IČO: 00 397 768

Lekárska fakulta,
Tr. SNP 1, 040 11 Košice
e-mail: LF-sekr-tajomnik@upjs.sk
<https://www.medic.upjs.sk>

Vydavateľstvo:

ŠafárikPress, Moyzesova 9, 040 01 Košice

Vychádza 2x ročne.
Časopis je registrovaný na MK SR
pod č.: EV 3564/09.

Rukopisy a objednávky na adrese:

Redakcia Folia Medica Cassoviensia
ÚLISM, UPJŠ LF, Tr. SNP 1, 040 11 Košice
e-mail: LF-foliamedica@upjs.sk
<https://www.lf.upjs.sk/foliamedica>

Tlač:

EQUILIBRIA, s.r.o., Textilná 4, 040 12 Košice

dátum vydania: júl 2024

Grafický návrh obálky:

doc. MUDr. Roman BEŇAČKA, CSc.

Technická a grafická úprava:

Martina Trochanová

Obsah

Prehľadný vedecký článok

Prehĺbený dych (sigh) -- osobitý dychový vzor generovaný v ústredí respiračnej rytmogenézy <i>Roman Beňačka</i>	5
---	---

Vedecké práce in extenso

Vývoj prehĺbených dychov počas epizódy perakútnej hypoxie - kvantitatívna analýza <i>Roman Beňačka</i>	15
Pilotná štúdia proteómu CD4+ T-lymfocytov u pacientov s triple negatívnym karcinómom prsníka s využitím hmotnostnej spektrometrie <i>Michal Marcin, Miroslav Marcin, Mária Kacírová, Martin Menkyna, Michaela Šulíková, Soňa Tkáčiková, Peter Bober, Michal Alexovič, Dávid Tóth, Marek Lenárt, Dominik Šafčák, Ján Sabo</i>	24
Niektoré aspekty molekulárnych mechanizmov Luminál A karcinómu prsníka: Proteomické zmeny CD8+ T-lymfocytov <i>Galina Laputková, Mária Kacírová, Martin Menkyna, Soňa Tkáčiková, Peter Bober, Ivan Talian, Dávid Tóth, Marek Lenárt, Dominik Šafčák, Ján Sabo</i>	32
Analýza vplyvu Luminal A karcinómu prsníka na proteomický profil CD4+ T-lymfocytov <i>Ivan Talian, Mária Kacírová, Martin Menkyna, Soňa Tkáčiková, Peter Bober, Michaela Šulíková, Michal Alexovič, Marek Lenárt, Dávid Tóth, Dominik Šafčák, Ján Sabo</i>	41
Zmeny proteómu monocytov CD14 periférnej krvi u pacientok s Luminal A podtypom karcinómu prsníka <i>Dávid Tóth, Lule Tomiq, Gabriel Lipčei, Peter Urdzík, Michaela Šulíková, Martin Menkyna, Mária Kacírová, Soňa Tkáčiková, Ivan Talian, Peter Bober, Marek Lenárt, Ján Sabo</i>	48
Analýza proteínov subpopulácie CD4 T-lymfocytov periférnej krvi pacientok s karcinómom prsníka luminál B <i>Michaela Šulíková, Peter Bober, Jozef Parnica, Martin Menkyna, Mária Kacírová, Miroslav Marcin, Dávid Tóth, Marek Lenárt, Dominik Šafčák, Ján Sabo</i>	55
Pilotná analýza proteínov subpopulácie CD8+ T-lymfocytov z periférnej krvi pacientok s triple negatívnym karcinómom prsníka <i>Jozef Parnica, Michaela Šulíková, Mária Kacírová, Martin Menkyna, Soňa Tkáčiková, Dávid Tóth, Marek Lenárt, Dominik Šafčák, Ján Sabo</i>	62
Analýza proteínov subpopulácie CD8+ T-lymfocytov periférnej krvi pacientok s benigným nádorom prsníka <i>Jozef Parnica, Michaela Šulíková, Martin Menkyna, Mária Kacírová, Soňa Tkáčiková, Dávid Tóth, Marek Lenárt, Dominik Šafčák, Ján Sabo</i>	70

Prehlbený dych (sigh) — osobitý dychový vzor generovaný v ústredí respiračnej rytmogenézy

Roman Beňačka^{1*}

¹Ústav patologickej fyziológie, UPJŠ Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, Košice, * Korešp. autor

Práca popisuje charakteristiky osobitého typu dychového vzoru pomenovaného v 60-tych r. 20. st. ako tzv. prehĺbený dych (*augmented breath*), alebo hlboký dych (*deep breath*) resp. vzdych (*sigh*), ktorý sa vyskytuje u ľudí i iných cicavcov spontánne počas dňa, spánku, v pokoji ako aj počas námahy a osobitne počas hypoxie či asfyxie. Dlhý bol považovaný len za periférny či centrálny incitovaný chemoreflexný prejav resp. mechanoreflexný prejav iniciovaný z pľúcnej aferencie – archaický involutárny vzor umožňujúci zvýšiť maximálny inflačný efekt na konci inšpiria a tým antiatelektatický účinok. Tento dvojfázový typ dychu bol istý čas považovaný za *gasp* superponovaný za vrchol eupnoického výbojového vzoru, teda ako kombinácia dvoch roky známych a osobitých typov dychov. V 90-tych rokoch len málokoho zaujímal. Pred 20-timi rokmi bol však s veľkým prekvapením prvý raz identifikovaný v záznamoch na rytmických rezoch z mozgového kmeňa. V ostatnom desaťročí sa etabloval ako samostatný vzor generovaný v neurónoch preBötzingerovho komplexu – základného respiračného noeu vital súc generovaný v osobitých neurónoch na základe fázových zmien membránových vlastností a osobitej architektúry zúčastnených iónových konduktancií. Je inherentnou súčasťou motorických, respiračných a vegetatívnych reakcií z mozgového kmeňa spúšťaných z limbického systému pri emočných stavoch, úzkosti a strese.

Kľúčové slová: respiračná rytmogenéza, prehĺbený dych, vzdych, dychový vzor, respiračné dysrytmie

Keywords: respiratory rhythmogenesis, deep breath, sigh, breathing pattern, respiratory dysrhythmias

Úvod

Dýchanie je jedna z najzložitejších, ak nie najzložitejšia forma fyziologických behaviorálnych prejavov integrovaná s celým radom iných procesov pre celý rad úloh, vrátane metabolických potrieb, statických a mechanických skeletálnych postúr, emocionálnych a kognitívnych zmien v správaní a prejavoch [6, 28, 37, 48, 51]. Tieto väzby sú obojsmerné, tak ako dýchanie pomáha pri zdvíhaní predmetov, tlaku na stolicu, plači, hovorení až po korekciu metabolického acidózy, oxygenáciu; mení sa v reakcii na bolesť, úzkosť, obavy, radosť, túžbu a úľavu. Naopak, dýchanie môže byť hnacím motorom úzkosti, paniky, hyperventilácie alkalózy a neuromuskulárnej hyperexcitability. Tak ako sa dýchanie mení podľa potrieb spolu s kardiovaskulárnymi, metabolickými a motorickými odpoveďami v rámci rôznych behaviorálnych vzorov emočného prežívania, stresu, úzkosti i radosti aj dýchanie dokáže naopak meniť kognitívne, emocionálne a metabolické stavy v spätnej väzbe [50, 51, 60]. Jedným z podobných prejavov sú dychové vzory, ktoré sú obvyklou súčasťou hypoxickej respiračnej odozvy. Dlhšie sa považovali za čisto reflexné deje a dnes ich vnímame ako predpripravené vzory zúčastňujúce sa komplexnejších reakcií [2, 17, 24, 51, 72, 83, 84, 85].

Charakteristika prehĺbených dychov

Forma dychového vzoru

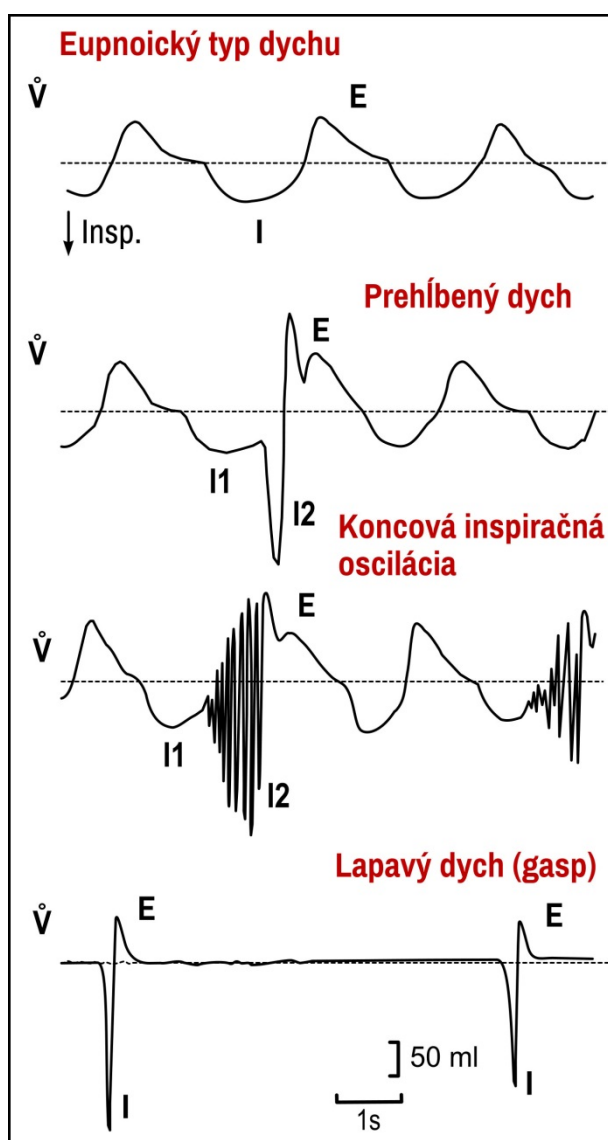
Pokojný dýchanie (Obr.1), ktorého inšpirium je obvykle ploché, býva sporadicky a často bez povšimnutia prerušované u človeka a iných cicavcov tzv. *prehĺbenými dychmi* (*angl. deepbreaths, large breaths, augmented breaths, AB*)

resp. vzdychmi (*angl. sighs*) [7, 11, 13, 20, 41, 52, 58, 67, 72]. Reynolds a spol. [52, 53] prisúdili medzi prvými tomuto fenoménu reflexný charakter (tzv. *inspiration augmenting reflex*). Na základe podobnosti vzdychov s Headovou paradoxnou inflačnou reakciou, krátkosti a intenzite aktivity, sa malo za to, že forsírovaný vdych na konci inšpiria počas vzdychov, môže predstavovať lapavé dychy - *gasp*y, ktoré sú superponované na vrcholovú fázu eupnoického inšpiria [7, 52, 53, 57]. Táto hypotéza dávala do súvislosti zvýšený výskyt vzdychov tesne pred nástupom apnoe s včasnými postapnoickými *gasps*ami [9, 10, 11, 18].

Prehĺbené dychy sú charakteristické predĺžením a výrazným prehĺbením koncovej časti inšpiria s výsledným, zväčša viac ako dvojnásobným nárastom dychového objemu [7, 9, 24, 53]. Okrem inšpiria dochádza aj k variabilnému predĺženiu expíria, čo vedie k celkovému predĺženiu dychového cyklu. Zvyšuje sa nielen inšpiračný ale aj priemerný expiračný prietok. Na rozdiel od inšpiračného objemu však k nárastu expiračného objemu obvykle nedochádza [7, 9, 11, 20, 21, 41, 44, 45]. Prehĺbené dychy sú obvykle nasledované inhibíciou nasledujúceho dychu s poklesom dychového objemu, skrátením inšpiria a variabilným skrátením expíria [9, 13, 21, 30, 52, 77, 78]. Tieto účinky pretrvávajú variabilne počas niekoľkých nasledujúcich dychových cyklov. V priebehu spánku môže inhibícia prerásť do apnoe [8, 22, 31, 32].

Výskyt prehĺbených dychov

Spontánne prehĺbené dychy. Dychy podobné AB sa objavujú spontánne (*SAB, spontaneous AB*) už počas embryonálneho života [16] a u detí sa vyskytujú niekedy až každých 5-10 minút [29]. Výskyt takýchto prejavov



Obrázok 1 Typické pneumotachografické krivky základných dychových vzorov generovaných v mozgovom kmeni. Tzv. **eupnoický typ dychu** je príznačný postupne narastajúcou intenzitou inšpiria. Tzv. **lapavý dych – gasp** je príznačný úsečným spazmodickým priebehom inšpiria. **Prehĺbený dych** je typický dvojfázovým inšpiriom s kompaktným forsírovaným prehĺbením dychu. Táto aktivita, ako sme medzi prvými ukázali sa môže počas ťažkej hypoxie rozpadat' na tzv. **koncové inspiračné oscilácie** [10].

pretrvávajú, aj keď s nižšou frekvenciou, až do dospelosti [83, 84].

Výskyt SAB je obzvlášť častý u **novorodencov** [21], a to tak počas bdenia i spánku (~10-20/ hod), ktorý tvorí v tomto období tvorí prevažnú časť dňa [23, 71, 72]. U dospelých jedincov je výskyt sporadických AB nižší a oproti bdelému stavu ich možno častejšie pozorovať počas spánku i keď so značnou interindividuálnou variabilitou (~ 1-25 prehĺbených dychov za noc) [44]. Vzduchy sa obvykle vyskytujú vo všetkých štádiách spánku; u dospelých najčastejšie v štádiu I NREM, u novorodencov častejšie počas REM spánku [4, 44].

Zvýšený výskyt SAB môže byť **postoperačným nálezhom** po chirurgických výkonoch v hornej časti abdominál-

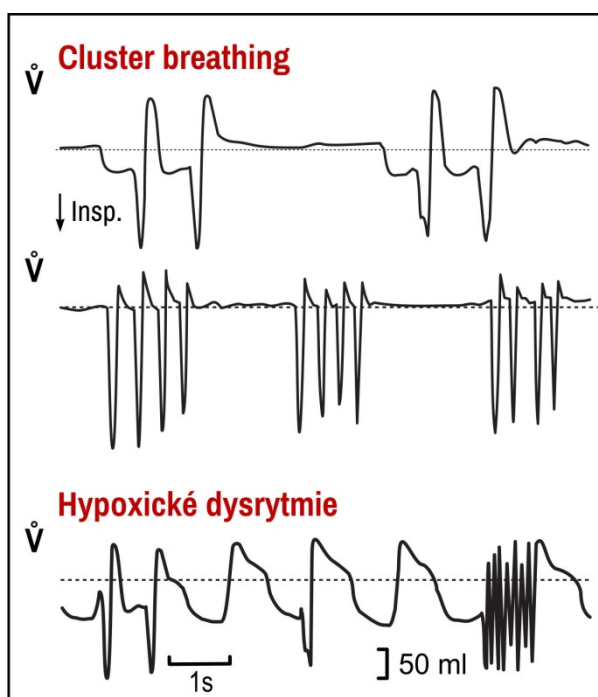
nej dutiny a pripisuje sa im význam pri normalizácii dočasnej reflexnej inhibície diafragmatickej kontrakility po laparotómii [34]. Výskyt AB je typickým nálezom pri **emočných reakciách**, pri bolesti, pri psychickom vypätí a strese. Je patognomickým nálezom u pacientov s panickou poruchou a anxióznymi stavmi [85]. Existuje teda predpoklad, že nie sú len doprovodným javom, ale inherentnou súčasťou patogenézy týchto ochorení.

Indukované formy prehĺbených dychov

Dychy podobné spontánne sa vyskytujúcim involutárnym vzdychom, resp. prehĺbeným dychom (tzv. *spontaneous augmented breaths, SAB*) možno u človeka i zvierat vyprovokovať viac alebo menej úspešne, pravidelne a reprodukovateľne rôznymi experimentálnymi podnetmi [9, 11, 13, 18, 19, 24]. Tieto, tzv. **indukované prehĺbené dychy (IAB)** sa podobajú SAB inspiračno -expiračným dychovým vzorom, nie však výskytom, frekvenciou alebo pretrvávajúcimi zmenami dýchania. Človek môže imitovať - náhle prehĺbiť inšpirium na jeho konci vôľovo, ale bez typickej expiračnej odozvy a následných postreflexných fenoménov (útlmu dýchania) typických pre SAB [11, 81, 84].

Na reflexnej iniciácii vzdychov v centrálnych respiračných štruktúrach mozgového kmeňa sa pravdepodobne zúčastňujú rôzne mechanoreflexné a najmä chemoreflexné podnety z periférnych i z centrálnych receptorov [17].

Plúcna mechanoreceptčná aferentácia. Významným stimulom pre zvýšenú indukciiu AB sú zmeny plúcnej ventilácie, zmeny statických i dynamických parametrov. Dokumentuje to množstvo experimentálnych dát získaných *in vivo*, kedy sa vzdychy podarilo vyprovokovať použitím *okluzívnych, deflačných alebo, inflačných manévrov* v dýchacích cestách [17, 58, 72, 76, 78]. Pri spúšťaní reflexu sa



Obrázok 2 Niektoré formy periodických a anomálnych dychov pri poikilokapnickej hypoxii. Zobrazené sú tu len pneumotachogramy [11, 13].



Obrázok 3 Prehĺbené dychy ako súčasť Cheyne-Stokesovho dýchania. On-line záznam (s artefaktmi) priebehu záverečnej fázy perakútnej anoxickej hypoxie na animálnom modeli s vybudením prehĺbených dychov vo fáze maxim hyperventilačnej periódy a neskôr úsekmi tonickej aktivity (T) v perióde minima. Po nástupe apnoe sa objavujú lapavé dychy (gasp, G). Tonická inspiračná aktivita môže byť ekvivalentom tzv. apneustického dychu, ktorý je mimo mechanickej lézie mosta málo známy. Skr. EVG II, elektrokardiogram z II. konč. zvodu (prítomné pohybové artefakty); PTG, pneumotachogram; Ph, IntPh, natívna a integrovaná aktivita n. phrenicus; BiF, bifrontálne EEG; BP, tlak krvi z katétra, $P_{ET}CO_2$ a $P_{ET}O_2$, expir. parciálne tlaky plynov [11].

môžu zúčastňovať aferenty z pľúcnych mechanoreceptorov z pomaly sa adaptujúcich receptorov pľúcneho rozpätia (PSR), alebo rýchlo sa adaptujúcich receptorov (RAR) [20, 25, 57].

Chemická aferentácia. Selektívnou periférnou chemostimuláciou karotických receptorov je možné AB fakultatívne vyvolať i u vagotomovaných zvierat [24, 45, 47]. Podobne, vzdychy možno vyvolať aj selektívnou centrálnou chemostimuláciou lokálnymi zmenami pH/ CO_2 na ventrálnom bulbárnom povrchu alebo hyperoxickou hyperkapniou, a to aj po bilaterálnej vagotómii alebo karotickej chemodenervácii [11, 17, 20]. Kombinácia uveďených mechanoreceptívnych a chemoreceptívnych stimulov zjavne iniciuje zvýšený výskyt AB pri poikilokapnickej, izokapnickej alebo hyperkapnickej hypoxii až anoxii, hyperoxickej hyperkapnii alebo pri sufokačnej asfyxii [11, 13]. Počas hypoxie alebo asfyxie sa vzdychy pomerne pravidelne objavujú v rámci Cheyneho - Stokesovho dýchania (Obr. 3) v maximách inspiračno - expiračného úsilia a striedané sú s úsekmi hypoventilácie alebo apneustického tonusu (Obr. 2) [11]. Počas apnoe sa môžu objaviť skupiny dychov typu „cluster breathing“ pozostávajúce z gaspov alebo z dvojfázových inspií podobných prehĺbeným dychom (Obr.2) [9]. Alebo ich možno detegovať v strede či na záver skupín 3-5 dychov oddelených apneustickými alebo apnoickými pauzami. Tento periodický vzor sa objavuje nielen počas hypoxickej hyperventilácie ale tiež približne v 10% prípadov pri obnovení dýchania po experimentálnom apnoe [9, 10, 11, 13]. Pri anoxickej poikilokapnickej hypoxii výskyt prehĺbených dychov - vzdychov graduje s trvaním expozície [11]. Hoci sa v počtoch AB počas hypoxií s variabilne udržiavanou hladinou CO_2 rozdiely obvykle nezistili [13, 17, 47, 76] niektorí autori popisujú vyšší výskyt AB počas hypokapnickej oproti hy-

perkapnickej hypoxii, čo naznačuje význam pH/ CO_2 -dependentnej chemoreceptie pri spúšťaní AB [25, 51].

Mozaiku rôznych možných aferentných spúšťacích zón dopĺňajú poznatky, že dychy podobné vzdychom možno vyvolať stimuláciou z HDC (horných dých. ciest) [40] a to mechanicou stimuláciou sliznice hypofaryngu a velofaryngeálnej steny nazofaryngu u králikov. Existujú tiež údaje o vyvolaní vzdychov z hypofaryngu a laryngu u mačiek [24], s najväčšou pravdepodobnosťou však ide o spazmodické inflačné reflexy podobné tzv. sniff-like aspiračnému reflexu, ktoré prerušujú eupnoické typy dychov [9, 11].

Rôznorodosť periférnych i centrálnych podnetov pri ktorých dochádza k vzniku AB, variabilita výskytu a nízka prediktivita poukazovali na skutočnosť, že prehĺbené dychy nie sú výsledkom jednoduchého reflexného mechanizmu, ale súčasťou centrálnie generovaného procesu (Obr. 4.) [11]. Ani jeden z podnetov však nie je sám o sebe pre spontánny výskyt AB dostatočný. Po deaferentácii (vagová denervácia) pretrvávajú u mačiek AB *in vivo* [11, 17] a tiež po transplantácii pľúc u ľudí [61]. Podporou centrálného mechanizmu AB je fakt, že vzor identický s AB možno registrovať v neuronálnej aktivite z rezov mozgového kmeňa zahrňajúccoh pore BötC *in vitro*, ako je uvedené ďalej [37].

Neuronálna aktivita počas vzdychov

Aktivita neuromuskulárnych jednotiek

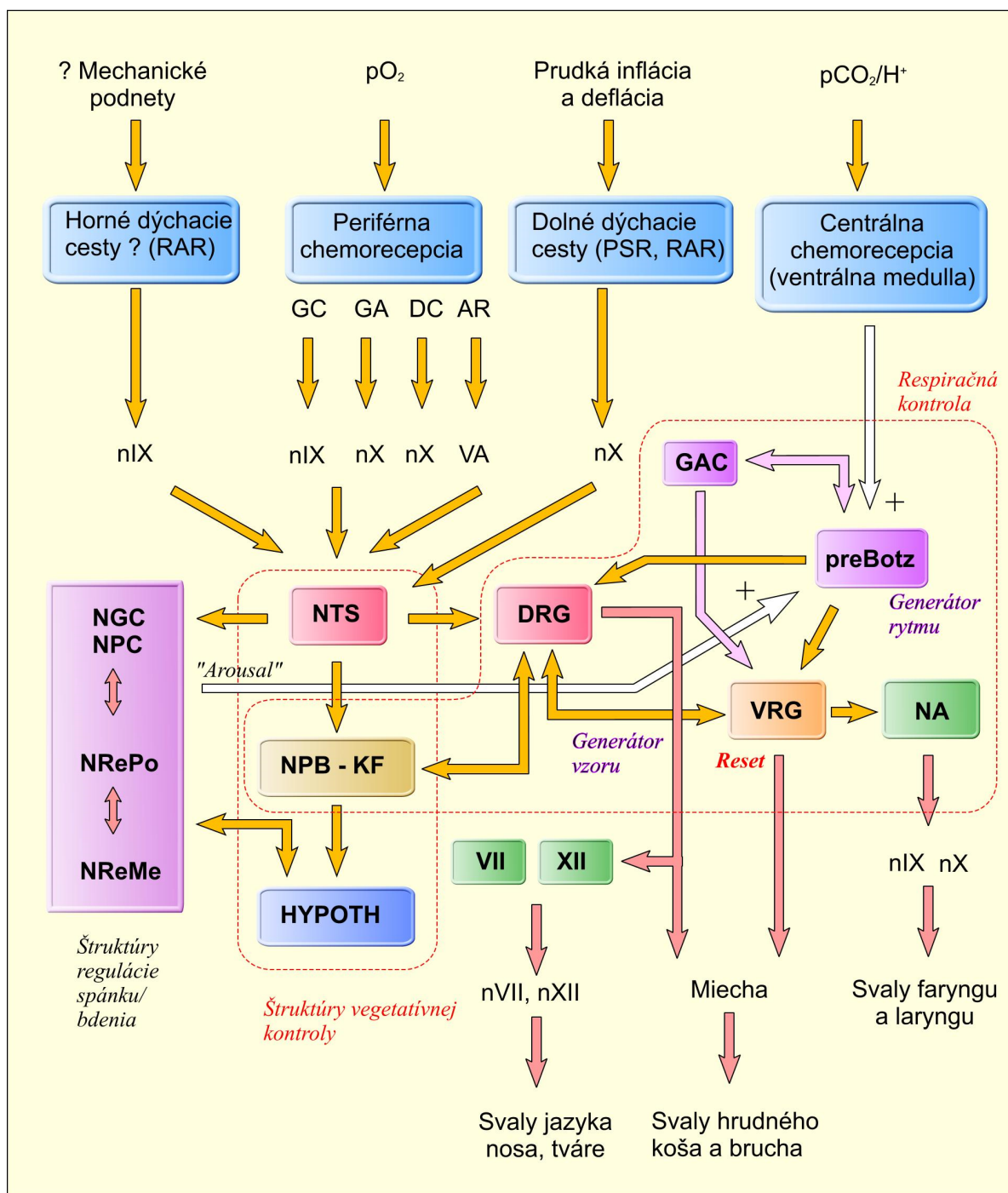
Elektrofyziológické štúdie potvrdili, že vo výboji inšpiračných jednotiek možno počas AB rozlíšiť 2 diskkrétne fázy: tzv. I1 fázu, ktorá sa dĺžkou, formou a intenzitou výbojovej aktivity podobá tzv. eupnoickému inspiíu a I2 fázu, charakterizovanú krátkou kompaktnou salvou výbojov často násobne vyššej intenzity ako počas I1, ktorá nastupuje obvykle bez evidentného časového predelu v terminál-

nej časti inšpiria. Tento „dvojfázový“ vzor, s malými ale existujúcimi rozdielmi v čase nástupu a vrcholovej intenzite výboja v I2 fáze, bol popísaný u všetkých inšpiračných svalových jednotiek, napr. v *kostálnej a krurálnej časti bránice a interkostálnych svaloch* [9, 11, 12, 13, 76, 77.] ako aj v jednotkách *facio-branchiogénnej oblasti* – vo svaloch *jazyka, faryngu, laryngu a nosa* [24, 78]. (Obr. 5).

U väčšiny popisovaných inšpiračných jednotiek, sa zistilo, že aktivita počas I2 fázy AB je v odpovedi na rôzne podnety (chemické, mechanické) omnoho uniformnejšia

ako I1 fáza [76]. Týmto pomerne invariantným vzorom sa často prirovnávala ku lapavému dychu [65]. Nutné je však uviesť, že na rozdiel od gaspu frekvencia ani amplitúda výboja v I2 fáze AB nemá zostupný charakter (*angl. decrementing*) [12]. Na druhej strane, aktivita v I2 fáze nie je „iba“ zosilneným pokračovaním aktivity v I1 fáze. Výbojová synchronizácia respir. jednotiek v I2 fáze (tzv. HFO, vysokofrekvenčné oscilácie) má odlišnú charakteristiku ako tá počas výbojov v I1 fáze, ktorá je podobná eupnoe [12].

Okrem evidentných zmien v inšpiračnej fáze dochádza



Obrázok 4. Zjednodušená schéma plauzibilných aferentov pri tvorbe prehĺbených dychov. Skratky: AR- arteriálne receptory, DRG a VRG - dorzálna a ventrálna respiračná skupina, GAC - gaspové centrum vo ventrolaterálnej predl. mieche, GA a GC - glomi aorticum et caroticum, NRePo/NReMe - retikulárne jadrá pontínne a mezencefalické, NPBL-KF - nucl. parabrachiales a Kolliker-Fuse, HYPOTH - hypothalamus, pre-Bötz - pre Bötzingerv komplex, NGC a NPC - ncl. gigantocellularis et parvocellularis, VII, XII - ncl. n. facialis et hypoglossus, NA - nucl. ambiguus, NTS - nucl. tractus solitarii, DC - dýchacie cesty, RAR - mechanoreceptory s rýchlou adaptáciou, VA - viscerálne aferenty. [11]

né jadro a parafaciálna respiračná skupina (RTN/ pFRG), ktorá hrá úlohu v tzv. pre- inspiriu, aktívnom expiriu a zabezpečuje vplyv pH/CO₂dependentnej centrálnej chemorecepce [24, 26, 28, 42] a (3) post-inspiračný komplex (PiCo), regulujúci post-inspirium [5].

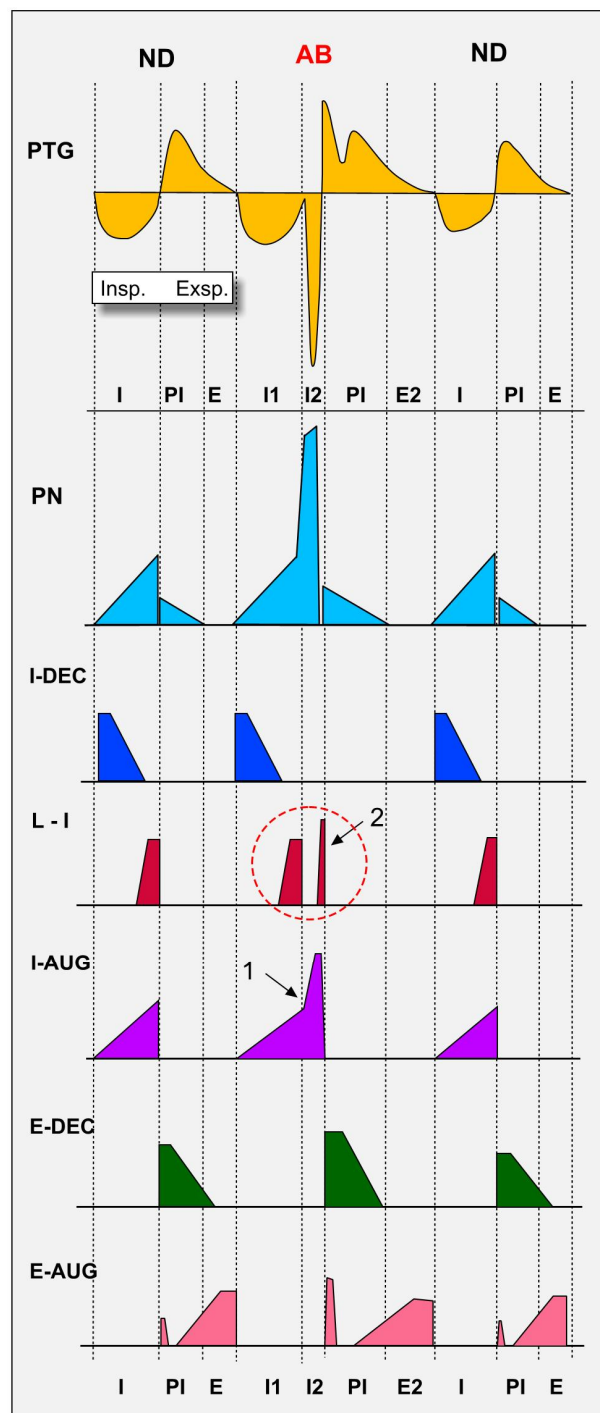
Prvé poznatky ohľadne tvorby respiračného rytmu v autonómnej skupine neurónov s pacemakerovými

vlastnosťami v pre-Bötzigerovom komplexe (pre-preBötzc) v záznamoch *in vitro* boli datované do prvej polovice 90-tych rokov [62] a znamenali významný upgrade etablovaného sieťového modelu respiračnej rytmogenézy vybudovaného na vzájomných fázicky - modulovaných excitačných a inhibičných synaptických väzbách [54, 55]. Progres v metodológii záznamov respiračného rytmu z rezov z neonatálneho a juvenilného mozgu kmeňa *in vitro* alebo *ex vivo* rozšíril možnosti skúmania respiračných neuronálnych populácií popísaných *in vivo* [55] najmä pri definovaní ich membránových vlastností, iónových konduktancií, účinku rôznych transmitterov a farmakomodulantov [14, 36; 37]. Začiatkom milénia referovalo viac prác, že neuróny preBötzc sú schopné generovať mimo monofázickej eupnoickej aktivity aj iné formy inspiračnej aktivity, vrátane „dvojfázovej“ aktivity typickej pre prehĺbené dychy (AB) [37]. Neskôršie dáta získané *in vitro* u novonarodených hlodavcov ukázali, že nejde len o občasné prejavy, či arytmiu, ale že neuróny preBötzc sú vskutku schopné súčasne produkovať dva rytmy s odlišnými parametrami - eupnoe a prehĺbené dychy. Tieto nie sú nutne produktom synaptických interakcií v rámci neuronálnej siete, ale výsledkom rekonfigurácie membránových vlastností s účasťou konkrétnych iónových neurónálnych konduktancií [14, 16, 36, 74, 75].

Prítomnosť 2 vzorov oscilačnej aktivity v tej istej neuronálnej sieti mnohých prekvapila. O to viac, že *in vivo* AB viac ako rytmus pripomínali skôr arytmiu (extra-aktivitu) - napr. gaspovú aktivitu intervenujúcu do „fragilnej“ terminálnej fázy eupnoického inspiria (porucha ukončenia inspiria). Len pre pripomenutie, eupnoický dych a gasp - ako základné dychové formy sa odlišujú nielen priebehom membránového potenciálu a výbojovej aktivity v neuronálnych jednotkách (typ. *augmenting* - pre eupnoe) a tzv. *decrementing* pre gasp) ale aj miestom genézy - pre eupnoe v pre-Bötzc a pre gasp vo ventrálnej rostrálnej medulárnej retikulárnej formácii [63, 65]. Ak eliminujeme štruktúry pre-Bötzc, gasp po istý čas perzistuje [49].

O to prekvapujúcejšie bolo zistenie, že oba rytmy sa vyvíjajú už prenatálne [14, 26, 27, 28]. Na rezoch z mozgového kmeňa obsahujúcich RTN/pFRG a preBötzc je možné u hlodavcov zaznamenávať z pre-Bötzc rytmickú respiračnú aktivitu už na 14. embryonálny deň (E 14,5- E15) [73]. Eupnoický rytmus je neskôr, najvčasnejšie v E16,5 ale obvykle v E17-E18, doplnený o rytmickú výskyt aktivity podobnej AB. Od eupnoickej sa líši nižšou frekvenciou cyklu, vysokou amplitúdou výboja a tvarom [16, 73] (Obr. 7).

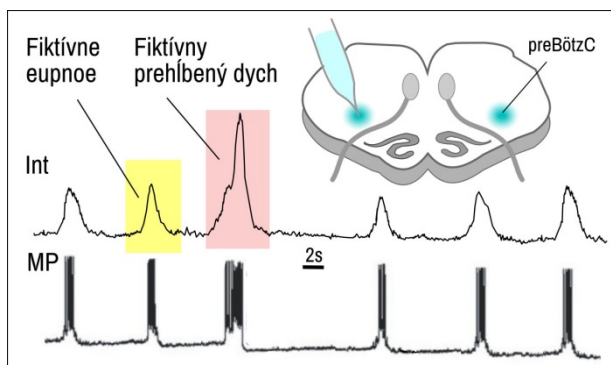
Sprvu sa predpokladalo, že eupnoický vzor i AB musia byť generované v dvoch odlišných subpopuláciách neurónov v rámci pre-Bötzc [75]. Neskôršie práce ukázali, že okrem malého počtu neurónov, ktoré sú aktívne len počas AB (<5 %; tzv. AB-neuróny) väčšina neurónov v pre-Bötzc sa zúčastňuje tak na eupnoickej aktivite ako aj na AB (tzv. AB+E-neuróny). Buď ide skutočne o identické neuróny, alebo o doposiaľ neodlíšené veľmi tesne funkčne prepojené subpopulácie [16]. Predikované AB+E- neuróny sú teda schopné počas eupnoe generovať vysokofrekvenčnú/ níz-



Obrázok 6 Výbojový vzor bulbárnych respiračných neurónov počas prehĺbených dychov. Aktivita v neurónoch I-AUG pokračuje bez prerušenia aj v I2 fáze prehĺbených dychov a inspirium je ukončené až druhou suplementárnou aktiváciou v neurónoch L-I. PTG - pneumotachogram; PN, aktivita n. phrenicus; I-DEC, včasné inspir. neuróny, L-I, neskoré inspir. neuróny; I-AUG, ramp-like inspir. neuróny; E-DEC, včasné expir. neuróny; E-AUG, neskoré expir. neuróny [11].

koamplitúdovú rytmickú monofázickú aktivitu, zatiaľ čo počas vdychov tvoria nízko-frekvenčnú/ vysokoamplitúdovú rytmickú aktivitu s dvojfázovým vzorom výbojov [35, 36, 37, 75, 79]. Na rozdiel od eupnoickej aktivity je tvorba AB determinovaná prítomnosťou vápnikových kanálov typu P/Q [36,37]. Aktivita druhej fázy AB sa zjavne odlišuje; založená je na pomalých vnútrobunkových osciláciách Ca^{2+} poháňaných periodickým uvoľňovaním vápnika z vnútrobunkových zásob [74]. Je zaujímavé, že myši s knock-outom tohto kanálika umierajú na pneumóniu a atelektázu krátko po narodení [51]. Hoci je prítomnosť gCa^{2+} P/Q typu konduktancií rozhodujúca pre tvorbu AB, nie je zdá sa jedinou podmienkou. V AB+E- neurónoch, na rozdiel od AB- neurónov generujúcich iba AB, sú zrejme potrebné aj β -adrenergné receptory [79]. Ich stimulácia izoproterenolom ovplyvňuje (zvyšuje frekvenciu) AB ale neovplyvňuje eupnoe [51, 74]. Je zrejme, že intracelulárny nárast cAMP v neurónoch po stimulácii receptorov mení účinok perzistentného sodíkového prúdu (INAP) [73, 74, 75, 79].

Je zrejme, že v rámci ontogenézy, od prenatálneho štádia až do dospelosti, sa mechanizmus tvorby AB dotvára podobne ako pri eupnoe početnými synaptickými interakciami v rámci ponto-bulbárnej respiračnej siete. To odzrkadľuje aj variabilitu a vývoj AB v reakcii na celý rad skôr spomínaných mechano- a chemoreflexných podnetov pri indukovaných AB *in vivo* [15, 16, 38, 47, 51, 75].



Obrázok 7 Fiktívne eupnoe a prehĺbený dych zo spontánne rytmického rezu z oblasti rostrálnej predĺženej miechy *in vitro*. Skr. Int, integrovaná výbojová aktivita, MP, membránový potenciál. Schematicky prepracované [50, 73].

Fyziologický význam prehĺbených dychov

Optimalizácia pľúcnej ventilácie a oxygenácie

Pri úvahách o význame prehĺbených dychov, sa viacerí autori zhodli v názore, že pomerne plytké pokojné, dýchanie, pri ktorom je hlavná frakcia inšpirovaného vzduchu distribuovaná do stredných a dolných pľúcnych polí by bez občasného prehĺbeného inšpiria nutne viedlo ku kolapsu terminálnych bronchiolov v pomerne veľkej oblasti pľúc. Výskyt občasných prehĺbených dychov je jedným z automatizmov, ktorý má **zamedzovať vznik atelektáz**. AB zvyšujú nielen compliance pľúc, a funkčný reziduálny objem, ale prispievajú tiež k zmenám v kompozícii surfaktantu, čo má za následok zvýšenie povrchového napätia alveo-

lárnej steny a tým aj zlepšenie alveolo-kapilárnej difúzie plynov [20, 21, 41]. Avšak vyšší výskyt AB v prípadoch s obmedzenou pľúcnou funkciou však nebol vždy potvrdený - napr. u kvaruplegikov (lézia C6 a C7), ktorí majú v dôsledku paralyzovaných torakálnych a auxiliárnych svalov rýchle, povrchné dýchanie [11]. Významné rozdiely nie sú ani u predčasne narodených nezrelých novorodencov, ktorí majú obvykle zníženú compliance a nižšiu reziduálnu kapacitu pľúc [21, 86]. Počas prehĺbených dychov dochádza popri redistribúcii vzduchu do málo ventilovaných apikálnych pľúcnych polí aj k súbežnej reflexnej pulmonálnej arteriolárnej dilatácii, čo prispieva k regulácii ventilačno - perfúzných pomerov v pľúcach [7, 11, 20, 45]. Tento antiatelektatický účinok môže vysvetliť zvýšený výskyt spontánnych i hypoxicky navodených AB u novorodencov alebo u malých zvierat (potkan, myš), ktoré majú pľúca s malými a spontánne kolabujúcimi alveolmi v porovnaní s ľuďmi alebo väčšími zvieratami (pes, mačka) [7, 71, 72] alebo vyšší výskyt prehĺbených dychov u nezrelých novorodencov v porovnaní s donosenými plodmi [4]. Arteficiálna aplikácia prehĺbených dychov pri mechanickej ventilácii s vysokým pozitívnym koncovým expiračným tlakom zlepšuje tiež oxygenáciu a pľúcnu elasticitu pri ARDS [50, 51].

Prehĺbené dychy - vdychy môžu byť súčasťou **centrálnych dychových porúch** - objavujú sa pri postapnoickej obnove dýchania po epizóde **centrálneho alebo obštrukčného spánkového apnoe**, vyskytujú sa pri **hyperventilačnom syndróme** [11, 50, 51], pri **nezrelosti pľúc u novorodencov** [33] a pri **chronickej hypoxii** [1, 3, 6, 13, 46, 85].

Spontánne AB sa často vyskytujú u zvierat i u ľudí na prechode z bdenia do spánku a pri únave a zmenách vigility počas dňa, paralelne so zíváním, čo napovedá, že AB podobne ako napr. zívanie sú aktívne prejavy rekonfigurácie respiračnej neuronálnej siete ako súčasť behaviorálnych reakcií pri zmenách bdlosti [22, 43]. AB sa vyskytujú **počas spánku**, zriedkakedy však náhodne, skôr ako súčasť hyperventilačno - hypoventilačných somnických periodických zmien dýchania v súvislosti s epizódami hypo- a apnoických stavov, ktoré vdychy buď predchádzajú (48%) alebo po nich nasledujú (52%) [44]. Ich výskyt je sprevádzaný nárastom elektromyografickej aktivity (EMG), zvýšením frekvencie v elektroencefalograme (EEG), zmenami frekvencie srdcovej činnosti v závislosti od fázy spánku (napr. akcelerácia počas NREM a REM vs. decelerácia počas NREM u novorodencov) a zvýraznením normálnej variability srdcovej frekvencie [11, 12, 17, 18, 44]. Mnohé z týchto „fyziologických“ reakcií sú alterované u detí so SIDS, u ktorých je výskyt AB nízky [4, 11, 23, 25, 44, 50].

Súčasť emočných behaviorálnych reakcií

Prehĺbené dychy - povzdychy sa objavujú často **počas negatívnych emočných reakcií** [1, 2], pričom ich výskyt tu zjavne nemá súvis s respiračnou - antiatelektatickou funkciou [66]. Vyskytujú sa napr. typicky pri **bolesti**, či už akútnej (pri **traume**) alebo chronickej (napr. pri lumbago, reumatoidnej artritíde) [48, 49, 56], pri **strachu** [50, 64],

úzkosti [64, 80, 83], smútku, utrpenia až zúfalstve [50, 51], tiež pri unipolárnej depresii alebo depresívnej fáze bipolárnej depresie [50, 66] ale aj pri agresivite [51, 70]. Nevyskytujú sa však tak často počas samotného negatívneho emočného pólu, ale obvykle až počas úľavy, poklesu napätia, odľahnutia a nasledujúceho posunu pozitívnych emócií. V tomto kontexte vidíme prehlbené dychy u detí, po dlhej epizóde plaču a vzlyku. Keďže tento zvukový prejav sa deje viac v exspiračnej polohe môžu AB prehlbením inspirovať korigovať aj zmeny prievdušnosti v pľúcach.

Ako ukázali práce u experimentálnych zvierat prehlbené dychy – povzdychy môžu pôsobiť dokonca ako **sociálny signál** - prejav upokojenia a bezpečia – teda signál opačný k poplašnému volaniu a v rámci skupiny sa šíria lavínovite, ostatne podobne ako napr. zívanie [50, 51]. Prehlbené dychy môžu mať podobnú úlohu aj u ľudí. Ľudia komunikujú emocionálne stavy radosťou, úsmevom, ale aj mračením sa, plačom či hnevom [70] ale aj povzdychom úľavy [65, 66, 80, 82, 83, 84]. Výskyt prehlbených dychov je u ľudí patognomickým nálezom pri **panikej poruche** [59, 85, 86] vedúc k hyperventilačnej hypokapnii, alkalóze a nervovo-svalovej hyperexcitabilite [66, 84, 85]. Hypokapnia sa však nedostáva k norme ani po vymiznutí vzdychov, čo zjavne poukazuje aj na istú poruchu chemoreflexnej kontroly [1, 2, 51, 59, 85]. Existuje predpoklad, že prehlbené dychy nie sú nejakým doprovodným javom, ale inherentnou súčasťou týchto prejavov [1, 2, 47, 48, 50, 85].

Arousal a stresová odpoveď

Ako ukázali viaceré staršie ale aj posledné práce osobitné miesto pri spúšťaní prehlbených dychov môže mať limbický systém a hypotalamus s početnými descendnými polysynaptickými dráhami do hornej časti (periaqueductálna sivá hmota) a dolnej časti (katecholaminergné a serotonínové jadrá) mozgového kmeňa a do miechy, ktoré sú súčasťou nervových eferentných dráh stresu vrátane antinocitívnej a obrannej motorickej odpovede – boj alebo útek [1, 2, 80, 84]. Glogowska a spol. [24] medzi prvými vyslovili nepriamo myšlienku, že prehlbené dychy pri hypoxickom ataku môžu byť respiračným korelátom aktivácie – arousal – aktivačného stavu v mozgu.

Vzdychy resp. prehlbené dychy sa často vytvárajú počas fázových biických prechodov - z bdlosti do spánku alebo naopak [22, 43, 60]. U dojčiat sa reakcia arousal často začína prehlbenými dychmi, po ktorých nasleduje otvorenie očí a zmena polohy hlavy v kontexte orientačných reakcií, ktoré sledujeme u cicavcov [38, 39]. Skutočnosť, že prehlbené dychy sú motorickou súčasťou komplexnejších behaviorálnych reakcií je príklad u spiacich dojčiat. Pri polohe na bruchu so zanorenou tvárou dochádza logicky k istej akumulácii CO₂ a zníženiu príjmu O₂. Hyperkapnická a hypoxická zmena vyvoláva chemoreflexne a mechanoreflexne zmenu od eupnoe k prehlbeným dychom, aktivita ktorých sprevádza reakciu arousal a automatické otáčanie

hlavy do strán, čo v podstate odstraňuje faktory obmedzujúce dýchanie a spánok dieťaťa [38, 39, 81, 86]. Generovanie prehlbených dychov je teda mechanizmus, ktorý nie je prepojený so zmenami metabolického stavu mozgu, ale sú nápomocné pri iniciácii subkortikálnej aj kortikálnej hladiny aktivačného arousal [47, 86]. Prehlbené dychy sú adaptačnou reakciou, ktorá brskne reaguje na zmeny krvných plynov a iniciuje sériu udalostí, ktoré vedú k reakcii aktivácie - arousal, ktorá obnoví dieťaťu prísun kyslíka [38, 51, 39, 71, 72, 80, 81, 83, 84].

Záver

Za posledné dve desaťročia sa parciálny fenomén akým boli dovtedy prehlbené dychy dostal na najužšieho okruhu záujmu respiračnej neurofyziológie. Ukázalo sa, že ide o jeden zo základných respiračných vzorov a nevytvára sa v preBötC ako modifikácia alebo superpozícia dychov ale ako osobitá dvojfázová forma inspirovia, ktorú je možné registrovať aj *in vitro* a detegovať v embryonálnom štádiu vývoja i v dospelosti [37, 73, 74]. Z jednoduchšej ventilačnej odpovede evokovanej mechanicky pľúcnou hyperinfláciou [39, 71] alebo chemorecepčne - zmenami krvných plynov a hypoxiou [7, 9, 24, 72] sa prehlbený dych stal súčasťou obrannej stresovej odpovede a motorickou súčasťou prebúdzacej reakcie arousal v CNS, ktorá prebieha aj pri absencii zmyslových a chemických stimulov [17, 18, 19, 71].

Summary

The review describes the characteristics of a specific type of breathing pattern named in the 1960s as augmented breath, or deep breath or sigh, which occurs spontaneously in humans and other mammals during the day, sleep, at rest as well as during exertion and especially during hypoxia or asphyxia. It has long been regarded as merely a peripheral or centrally initiated chemoreflex or mechanoreflex manifestation initiated from pulmonary afferentation, respectively - an archaic involuntarily involuted pattern allowing to increase the maximal inflation effect at the end of inspiration and thus the antiatelectatic effect. This biphasic type of breath was for some time considered to be gasp superposed as the apex of the eupnoic discharge pattern, that is, as a combination of two known and distinctive types of breaths for years. Twenty years ago, with great surprise, it was first identified in recordings on a few hundred micron rhythmic sections from the brainstem. In the last decade it has established itself as a distinct pattern generated in neurons of the preBöttinger complex, a fundamental respiratory node vital being generated in distinct neurons based on phase changes in membrane properties and the peculiar architecture of the ionic conductances involved. It is an intrinsic part of the motor, respiratory and autonomic responses of the limbic system in the brainstem during emotional states, anxiety and stress.

the airways in stress—a review in search of intersections. *Biol. Psychol* 84: 57–65, 2010.

Literatúra

1. Abelson, J.L., Khan, S., Giardino, N.: HPA axis, respiration and

2. Abelson, J.L., Khan, S., Lyubkin, M. et al.: Respiratory irregularity and stress hormones in panic disorder: exploring potential linkages. *Depress. Anxiety* 25: 885–887, 2008.
3. Ajayi, I.E., Mills, P.C.: Effects of the hippocampus on the motor expression of augmented breaths. *PLoS One* 12(8):e0183619, 2017.
4. Alvarez, J.E., Bodani, J., Fajardo, C.A., Kwiatkowski, K., Cates, D.B., Rigatto, H.: Sighs and their relationship to apnea in the newborn infant. *Biol. Neonate*, 63(3):139-146, 1993.
5. Anderson, T.M., Garcia, A.J. 3rd, Baertsch, N.A., Pollak, J., Bloom, J.C., Wei, A.D., Rai, K.G., Ramirez, J.M.: A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature*, 536: 76–80, 2016.
6. Baertsch, N.A., Baertsch, H.C., Ramirez, J.M.: The interdependence of excitation and inhibition for the control of dynamic breathing rhythms. *Nat. Commun* 9: 843, 2018.
7. Bartlett, D., Jr.: Origin and regulation of spontaneous deep breaths. *Respir. Physiol.*, 12: 230-243, 1971.
8. Bastianini S, Alvente S, Berteotti C, Bosi M, Lo Martire V, Silvani A, Valli A, Zoccoli G.: Post-sigh sleep apneas in mice: Systematic review and data-driven definition. *J. Sleep. Res.* 28(6):e12845, 2019.
9. Beňačka, R.: Elektrofyziologická analýza respiračných zmien a cerebrálne monitorovanie počas akútnej hypoxie a respiračného zlyhania. *Kandidátska dizertačná práca*. Košice, 163 s. 1993.
10. Beňačka, R.: The end-inspiratory oscillations induced by progressive hypoxia in cat: comparison with augmented breaths. *Eur. Respir. J.*, 8 (Suppl. 19): 163, 1995.
11. Beňačka, R.: Hypoxicky a reflexne navodené spazmodické inspiračné deje a ich význam. *LF UPJŠ, Košice*, 154 s. 2002.
12. Beňačka, R., Kurpas, M., Tomori, Z.: High-frequency oscillations and motor-recruitment strategy in respiratory muscles during reflexly-evoked activities in cats. *Eur. Respir. J.*, 9 (Suppl. 23): s.131, 1996.
13. Beňačka, R., Tomori, Z.: CO₂ - dependent patterning of respiratory, circulatory and brain responses under severe hypoxia and post-apnoeic recovery. *Eur. Respir. J.*, 16 (Suppl. 31), 546, 2000.
14. Blanco, C.E.: Maturation of fetal breathing activity. *Biol. Neonate* 65: 182–188, 1994.
15. Borrus, D.S., Stettler, M.K., Grover, C.J., Kalajian, E.J., Gu, J., Conradi Smith, G.D., Del Negro, C.A.: Inspiratory and sigh breathing rhythms depend on distinct cellular signalling mechanisms in the preBötzinger complex. *J. Physiol.*: 10.1113/JP285582, 2024.
16. Chapuis, C., Autran, S., Fortin, G., Simmers, J., Thoby-Brisson, M.: Emergence of sigh rhythmogenesis in the embryonic mouse. *J. Physiol.*, 592(10):2169-2181, 2014.
17. Cherniack, N.S., von Euler C., Glogowska, M., Homma I.: Characteristics and rate of occurrence of spontaneous and provoked augmented breaths in cats and rabbits. *Acta Physiol. Scand.*, 16: 349-360, 1981.
18. Cohen, G., Henderson-Smart, D.J.: The characteristics and frequency of augmented breaths during CO₂-induced hyperpnoea of newborn infants. *J. Physiol.*: 490(Pt 2): 551–557, 1996.
19. da Silva, A.C.L., de Matos, N.A., de Souza, A.B.F., Castro, T.F., Cândido, L.D.S., Oliveira MADGS et al.: Sigh maneuver protects healthy lungs during mechanical ventilation in adult Wistar rats. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 245(15):1404-1413, 2020.
20. Davies, A., Roumy, M.: The inspiratory augmenting effect of lung irritant receptor activity. *J. Physiol.*, 275: 14-16, 1978.
21. Davis, G.M., Moscato, J.: Changes in lung mechanics following sighs in premature newborns without lung disease. *Pediatr. Pulmonol.*, 17(1): 26-30, 1994.
22. Eckert, D.J., Jordan, A.S., Merchia, P. et al.: Central sleep apnea: pathophysiology and treatment. *Chest*, 131: 595 – 607, 2007.
23. Eiselt, M., Curzi-Dascalova, L., Leffler C, Christova, E.: Sigh-related heart rate changes during sleep in premature and full-term newborns. *Neuropediatrics* 23(6): 286-291, 1992.
24. Glogowska, M., Richardson P.S., Widdicombe J.G., Winning, A.J.: The role of the vagus nerves, peripheral chemoreceptors and other afferent pathways in the genesis of augmented breaths in cats and rabbits. *Respir. Physiol.*, 16: 179-196, 1972.
25. Golder, F.J., Davenport, P.W., Johnson RD, Reier PJ, Bolser D.C.: Augmented breath phase volume and timing relationships in the anesthetized rat. *Neurosci. Lett.*, 373(2): 89–93, 2005.
26. Gray, P.A., Janczewski, W.A., Mellen, N., McCrimmon, D.R., Feldman, J.L.: Normal breathing requires preBötzinger complex neurokinin-1 receptor- expressing neurons. *Nat. Neurosci.* 4: 927–930, 2001.
27. Greer, J.J.: Control of breathing activity in the fetus and newborn. *Compr. Physiol.*, 2: 1873–1888, 2012.
28. Guyenet, P.G., Bayliss, D.A.: Neural control of breathing and CO₂ homeostasis. *Neuron* 87: 946–961, 2015.
29. Hoch, B., Bernhard, M., Hinsch, A.: Different patterns of sighs in neonates and young infants. *Biol. Neonate*, 74: 16–21, 1998.
30. Issa, F.G., Porostocky, S., Feroah, T.: Effect of sleep and sighing on upper airway resistance in mongrel dogs. *J. Appl. Physiol.*, 77(2): 856-861. 1994.
31. Issa, F.G., Porostocky, S.: Effect of sleep on changes in breathing pattern accompanying sigh breaths. *Respir. Physiol.*, 93(2): 175-187, 1993.
32. Janczewski, W.A., Feldman, J.L.: Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J. Physiol.*, 570: 407–420, 2006.
33. Jost, K., Latzin, P., Fouzas, S., Proietti, E., Delgado-Eckert, E.W., Frey, U., Schulzke, S.M.: Sigh-induced changes of breathing pattern in preterm infants. *Physiol. Rep.*, (11): e12613, 2015.
34. Katagiri, H., Katagiri, M., Kieser, T.M., Easton, P.A.: Diaphragm function during sighs in awake dogs after laparotomy. *Appl. Physiol.* 83(5): 1588-1594, 1997.
35. Li, P., Janczewski, W.A., Yackle, K., Kam, K., Pagliardini, S., Krasnow, M.A., Feldman, J.L.: The peptidergic control circuit for sighing. *Nature*. 530(7590): 293-297, 2016.
36. Lieske, S.P., Ramirez, J.M.: Pattern-specific synaptic mechanisms in a multifunctional network. I. Effects of alterations in synapse strength. *J. Neurophysiol.*, 95: 1323–1333, 2006.
37. Lieske, S.P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., Ramirez, J.M.: Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nature Neurosci.*, 3(6): 600–607, 2000.
38. Lijowska, A., Reed, N., Chiodini, B., Thach, B.T.: Sequential arousal and airway-defensive behavior of infants in asphyxial sleep environments. *J. Appl. Physiol.*, 83: 219 – 228. 1997.
39. McNamara, F., Wulbrand, H., Thach, B.: Characteristics of the infant arousal response. *J. Appl. Physiol.*, 85: 2314-2321. 1998
40. Miyaoka, Y., Takahashi, Y., Sato, S., Shimada, K.: Autonomic nervous reflexes in respiration elicited by mechanical stimulation of the velopharyngeal region in rabbit. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 26: 177- 180. 1989.
41. Nicholas, T.E., Power, J.H.T., Barr, H.A.: The pulmonary consequences of the deep breaths. *Respir. Physiol.*, 49: 315-324, 1982.
42. Onimaru, H., Homma, I.: A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J. Neurosci.*, 23: 1478–1486, 2003.
43. Orem, J., Trotter, R.H.: Medullary respiratory neuronal activity during augmented breaths in intact unanesthetized cats. *J. Appl. Physiol.*, 74(2): 761-769, 1993.
44. Perez-Padilla, R., West, P., Kryger, M.H.: Sighs during sleep in adult humans. *Sleep*, 6(3):234-43. 1983.

45. Prabhu, M.B., Mink, J.T., Graham, B.L., Cotton, D.J.: Effect of deep breaths on gas mixing and diffusion in the lung. *Respir. Physiol.*, 79: 195-204, 1990.
46. Prys-Picard, C.O., Kellett, F., Niven, R.M.: Disproportionate breathlessness associated with deep sighing breathing in a patient presenting with difficult-to-treat asthma. *Chest*, 130: 1723 - 1725, 2006.
47. Qureshi, M., Khalil, M., Kwiatkowski, K., Alvaro, R.E.: Morphology of sighs and their role in the control of breathing in pre-term infants, term infants and adults. *Neonatology*, 96(1):43-49, 2009.
48. Ramirez, J.M., Baertsch NA. The dynamic basis of respiratory rhythm generation: One Breath at a Time. *Annu Rev. Neurosci.* 41:475-499. 2018.
49. Ramirez, J.M., Schwarzacher, S. W., Pierrefiche, O., Olivera, B. M., Richter, D. W.: Selective lesioning of the cat pre-Botzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *J. Physiol.*, 507, 895-907, 1998.
50. Ramirez, J.M., Vlemincx, E., Baertsch, N.A., Severs, L.J.: The sigh and related behaviors. *Handb. Clin Neurol.*, 188:357-372. 2022
51. Ramirez, J.M.: The integrative role of the sigh in psychology, physiology, pathology, and neurobiology. *Prog. Brain Res.*, 209: 91-129, 2014
52. Reynolds, L.B., Jr., Hilgeson, M.D.: Increase in breathing frequency following the reflex deep breath in anaesthetized cats. *J. Appl. Physiol.*, 20(3): 491-495, 1965.
53. Reynolds, L.B.: Characteristic of an inspiration augmenting reflex in anaesthetized cats. *J. Appl. Physiol.*, 17, 638-688, 1962.
54. Richter, D.W., Ballanyi, K., Schwarzacher, S.: Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2: 788-793, 1993,
55. Richter, D.W., Smith, J.C.: Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology (Bethesda)* 29: 58-71, 2014.
56. Robbins, M.L., Mehl, M.R., Holleran, S.E. et al.: Naturalistically observed sighing and depression in rheumatoid arthritis patients: a preliminary study. *Health Psychol.* 30: 129-133. 2011.
57. Romaniuk, J.R., Be, W.K.M., Karczewski, W.A., Malinowska, M.: Augmented breath provoked by lung inflation in cat. *Acta Neurobiol. Exp.*, 49: 2-3, 1989.
58. Sant'Ambrogio, G., Millic-Emili, J., Camporesi, E.: Occurrence of deep breath after a period of airway occlusion. *Pflügers Arch.*, 32: 95-104, 1971.
59. Schwartz, G.E., Goetz, R.R., Klein, D.F. et al.: Tidal volume of respiration and "sighing" as indicators of breathing irregularities in panic disorder patients. *Anxiety*, 2: 145-148. 1996.
60. Severs, L.J., Vlemincx, E., Ramirez, J.M.: The psychophysiology of the sigh: I: The sigh from the physiological perspective. *Biol. Psychol.*, 170: 108313, 2022.
61. Shea, S.A., Horner, R.L., Banner, N.R., McKenzie, R. et al.: The effect of human heart-lung transplantation upon breathing at rest and during sleep. *Respir. Physiol.*, 72: 131 - 149. 1988.
62. Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W., Feldman, J.L.: Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 254: 726-729, 1991.
63. Smith, J.C., Abdala, A.P., Borgmann, A., Rybak, I.A., Paton, J.F. Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. *Trends Neurosci.*, 36: 152-162, 2013.
64. Soltysik, S., Jelen, P.: In rats, sighs correlate with relief. *Physiol Behav.*, 85: 598 - 602, 2005.
65. St. John, W.M., Bledsoe, T.A., Sokol, H.W.: Identification of medullary loci critical for neurogenesis of gasping. *J. Appl. Physiol.*, 56(4), s. 1008-1019, 1984.
66. Studer, R.K., Danuser, B., Hildebrandt, H. et al.: Hyperventilation in anticipatory music performance anxiety. *Psychosom Med* 74: 773-782, 2012.
67. Szereda-Przestaszewska, M., Bartlett, D. Jr., Wise, J.C.H.: Changes in respiratory frequency and end -expiratory volume accompanying augmented breaths in cats. *Pflügers Arch.*, 346: 29 - 33, 1976.
68. Takeda, M., Matsumoto, S.: Discharge patterns of dorsal and ventral respiratory group neurons during spontaneous augmented breaths observed in pentobarbital anaesthetized rats. *Brain Res.*, 749(1): 95 - 100, 1997.
69. Takeda, M., Matsumoto, S.: Medullary post-inspiratory neuronal and diaphragm post-inspiratory activities during spontaneous augmented breaths in anaesthetized rats. *Brain Res.*, 758(1-2): 218 - 222, 1997.
70. Teigen, K.H.: Is a sigh "just a sigh"? Sighs as emotional signals and responses to a difficult task. *Scand. J. Psychol.*, 49:49-57. 2008.
71. Thach, B.T., Lijowska, A.: Arousals in infants. *Neuroscience* 80(3): 811-819, 1997.
72. Thach, B.T., Taeusch, W. Jr.: Sighing in newborn human infants: Role of inflation - augmenting reflex. *J. Appl. Physiol.* 41(4): 502-507. 1976.
73. Thoby - Brisson, M.: Neural mechanisms for sigh generation during prenatal development. *J. Neurophysiol.*, 120(3):1162-1172, 2018.
74. Toporikova, N., Chevalier, M., Thoby-Brisson, M.: Sigh and Eupnea Rhythmogenesis Involve Distinct Interconnected Subpopulations: A Combined Computational and Experimental study. *Neuro*, 2 (2) ENEURO.0074-14.2015; 2015.
75. Tryba, A.K., Peña, F., Lieske, S.P. Viemari, J.C., Thoby-Brisson M, Ramirez, J.M.: Differential modulation of neural network and pacemaker activity underlying eupnea and sigh-breathing activities. *J. Neurophysiol.* 99: 2114 - 2125, 2008.
76. Van Lunteren, E., Haxiu, M.A., Goldman, D., Cherniack, N.S.: Costal and crural diaphragm and intercostal muscle activity during augmented breaths in cats. *Neurosci. Lett.*, 56: 283-288, 1985.
77. Van Lunteren, E., Prabhakar, N.R., Cherniack, N.S., Haxiu, M.S., Dick, T.E.: Inhibition of expiratory muscle EMG and motor unit activity during augmented breaths in cats. *Respir. Physiol.*, 72, , s. 303-314, 1988.
78. Van Lunteren, E., Van De Graaff, W.B., Parker, D.M., Strohl, K.P., Mitra, J., Salamone, J., Cherniack, N.S.: Activity of upper airway muscles during augmented breaths. *Respir. Physiol.*, 53: 87-98. 1983.
79. Viemari, J.C., Tryba, A.K.: Bioaminergic neuromodulation of respiratory rhythm in vitro. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 168: 69 - 75, 2009.
80. Vlemincx, E, Abelson JL, Lehrer PM et al. (). Respiratory variability and sighing: a psychophysiological reset model. *Biol. Psychol.* 93: 24-32, 2013.
81. Vlemincx, E., Meulders, M., Abelson, J.L.: Sigh rate during emotional transitions: more evidence for a sigh of relief. *Biol. Psychol.*, 125: 163-172, 2017.
82. Vlemincx, E., Van Diest I, Van den Bergh O.: A sigh of relief or a sigh to relieve: the psychological and physiological relief effect of deep breaths. *Physiol. Behav.*, 165: 127-135, 2016.
83. Vlemincx, E., Van Diest, I., De Peuter, S. et al. : Why do you sigh? Sigh rate during induced stress and relief. *Psychophysiology* 46: 1005-1013, 2009.
84. Vlemincx, E., Van Diest, I., Van den Bergh, O.: Emotion, sighing, and respiratory variability. *Psychophysiology*, 52: 657-666, 2015.
85. Wilhelm, F.H., Trabert, W., Roth, W.T.: Characteristics of sighing in panic disorder. *Biol. Psychiatry*, 49(7): 606-614, 2001.
86. Yamashiro, S.M., Iyer, N.P.: Infant periodic breathing and apneic threshold. *Physiol Rep.*, 12(2):e15915, 2024.

Vývoj prehĺbených dychov počas epizódy perakútnej hypoxie - kvantitatívna analýza

Roman Beňačka^{1*}

¹Ústav patologickej fyziológie, UPJŠ Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, Košice, * *Korešp. autor*

Práca kvantifikuje výskyt, časovú distribúciu a zmeny parametrov dychového vzorupôčas tzv. prehĺbených dychov (*S*, *sighs*) vyvolaných epizódou anoxickej hypoxie. Tieto mimorytmické prejavy sú charakteristické v záznamoch prietokových zmien a integrovanej inspiračnej muskulárnej aktivite rýchlym a úsečným spazmodickým inspirom avýbojom v inspiračných jednotkách, ktorý je superponovaný za vrcholovú časť predchádzajúcej rytmickej inspiria (I1 štádium)rozširujúc tak celý dych a tvoriac suplementárne neskoré štádium inspiria (I2 štádium). Frekvencia *S* v rámci sledovaných epizód hypoxie narastá s dĺžkou trvania hypoxickej expozície a kulminuje tesne pred zánikom rytmickej respirácie. Maximálnu amplitúdu dosahovali *S* v druhej polovici hypoxickej epizódy (70%-interval), konzistentne s maximami fázickej aktivity. Periodický výskyt solitárnych amplitúdovo takmerinvariantných prehĺbených dychov je prítomný len v malom počte. Typický je kumulatívny výskyt postupných alterácií v I2-štádiu a inspiračno-expiračnom prechode až do spustenia prehĺbeného dychu. Počas hypoxickej expozície sa mení intenzita i trvanie suplementárnej aktivity v I2-fáze *S*. Práca diskutuje tieto nálezy v kontexte súdobého náhľadu o tvorbe prehĺbených dychov ako alternatívneho respiračného vzoru generovaného priamo v centre respiračného rytmu v pre-Bötzingrovej oblasti.

Kľúčové slová: perakútna hypoxia, poikilokapnia, prehĺbený dych, vzdych, dychový vzor, respiračné dysrhythmie, dýchacie svaly

Keywords: peracute hypoxia, poikilocapnia, augmented breath, sigh, breathing pattern, respiratory dysrhythmias, respiratory muscles

Úvod

U cicavcov je eupnoický dychový vzor zložený z dvoch vzájomne sa striedajúcich ventilačných fáz (inspiria a expíria), ktoré sú v neuronálnych štruktúrach mozgového kmeňa kódované v 3 neurogénnych fázach (inspirium-post-inspirium - expirium). prerušované spontánnymi tzv. prehĺbenými dychmi (*deep breaths*) zosinenými dychmi (*augmented breaths*) [2, 7, 21, 31], resp. vzdychmi (*S*, *sighs*) [3, 10, 12, 29]. Tieto formy dychov obsahujú vdychové i výdychové úsilie vysokej amplitúdy, po ktorom zvyčajne nasleduje zmena respiračného vzoru - predĺženie dychov, niekedy aj utlmenie dýchania [21, 22, 26, 27].

Prehĺbené dychy - vzdychy (*S*) pozostávajú z iniciálnej fázickej časti inspiria s kvázi postupne narastajúcou aktivitou v inspiračných neuromuskulárnych jednotkách (typ ramplike), reprezentujúc tak včasné inspirium (I1) a druhej časti, ktorá je tvorená spazmodickou inspiračnou aktivitou (I2 štádium) nasadajúcou variabilne za prietokové maximum alebo až do terminálnej časti prvej časti inspiria. Uvedené zmeny možno sledovať v inspiračných a expiračných neuronálnych i motorických jednotkách [26, 27, 31, 32]. Pripisuje sa im mechanoreflexný a chemoreflexný pôvod [2, 9, 10, 33]. Dlhobol tento vzor považovaný za intrúziu gaspu (lapavý dych), ktorý je superponovaný na vrchol rytmickej inspiria, ako doplnok eupnoickej časti dychu a obvykle bol sprevádzaný zvýraznením tzv. postinspiračného výboja v inspiračných jednotkách [24, 27]. Dnešné náhľady prezentujú prehĺbený dych ako osobitý vzor, ktorý je generovaný v bulbárnom generátore inspiračnej fázickej (eupnoickej) aktivity v preBötzingerovom komplexe

(pre-BötC) [18, 19, 30]. Prehĺbené dychy možno pozorovať už počas fetálneho života, hoci sa objavujú neskôr ako prejavy fázickej rytmickej aktivity. Počas postnatálneho vývoja slúžia pri podpore (adaptácii fázického dýchania pri udržiavaní optimálnej vzdušnosti pľúc [5, 12, 17, 29, 33]. Viacero prác popísalo aj zmeny ktoré vyvolávajú prehĺbené dychy pri modifikácii následných dychov, po vagotómii, či systémovom podávaní látok ovplyvňujúcich transmisiiu [10, 25]. Prehĺbené dychy možno vyvolať za experimentálnych podmienok, napr. rýchlou infláciou pľúc alebo defláciou, náhlým uvoľňovaním oklúzie dýchacích ciest, aplikáciou látky P do pľúcneho alebo systémového obehu, výraznými zmenami telesnej teploty, ako aj priamym zásahom do rostrálneho ventrálneho bulbárneho povrchu [6, 10, 22]. Často sa objavujú počas systémovej hypoxie rôzneho typu, hyperkarbémie, asfyxie alebo ischémie [6, 7, 9, 10], teda pri výraznej chemickej stimulácii (*overdrive*) alebo dráždením z pľúcnej mechanorecepce [2, 7, 9]. Hlavným funkčným významom prehĺbených dychov je antiatelektatický účinok, a to aj počas spontánneho dýchania zabezpečujúc ventilovanie dočasne spontánne rekolabujúcich častí pľúc. Vyššiu frekvenciu prehĺbených dychov možno zaznamenať u nezrelých novorodencov, ale aj detí a dospelých pri pľúcnych ochoreniach, zápaloch, edéme pľúc, ARDS a pod. [8, 17, 18, 23]. Vo zvýšenej miere sa tiež objavujú aj v súvisi s niektorými behaviorálnymi zmenami, napr. pri panike, v neuropsychofyziológii stresu a pod. [22, 23].

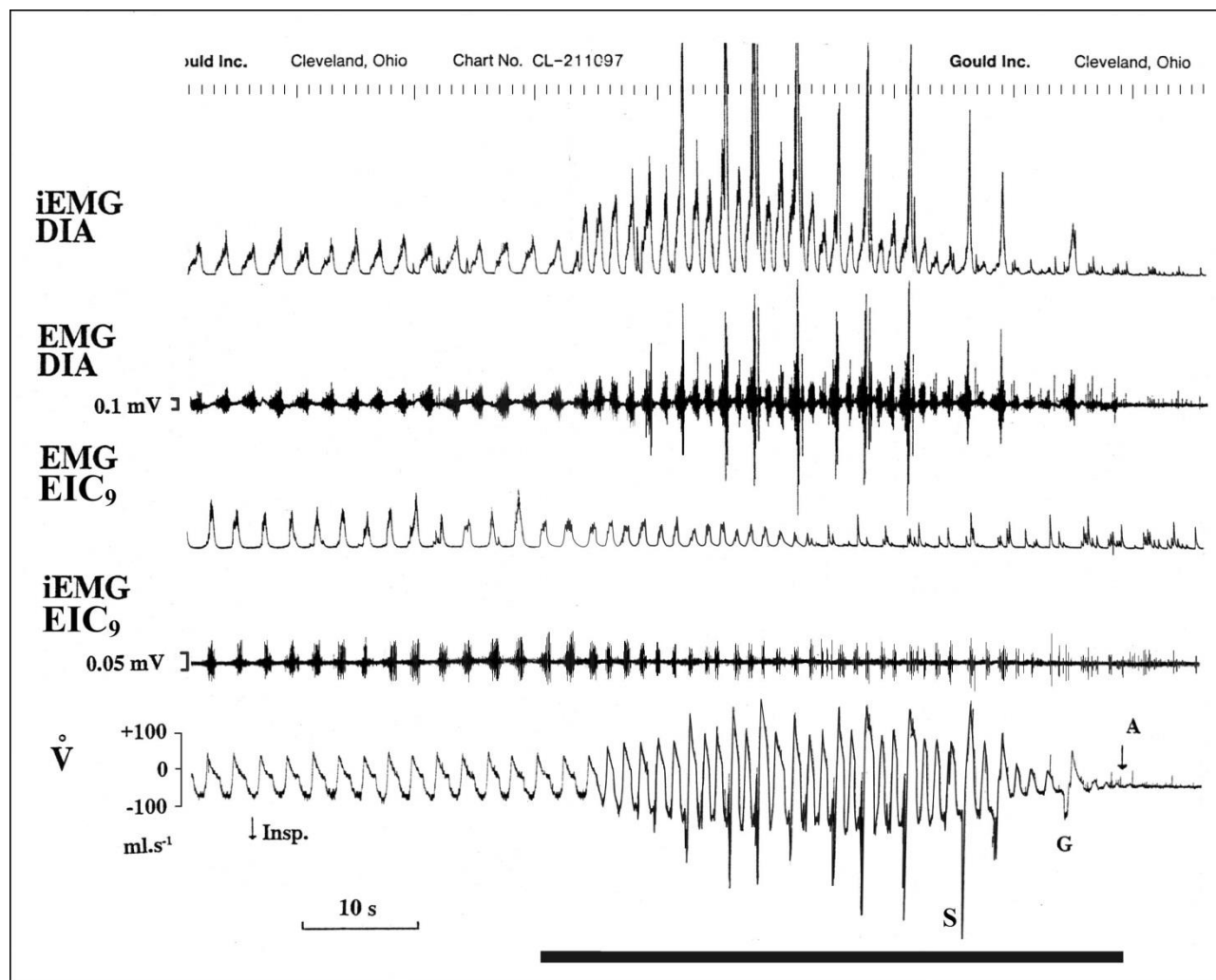
Z literatúry je najznámejší epizodický resp. periodický výskyt vzdychov s tzv. refraktérnymi pauzami. Počas miernej a stredne ťažkej hypoxie sa tento modus nemení.

Uvedená práca prekladá aj málo známe tendencie vývoja vzdychov počas epizódy poikilokapnickej hypoxie končiac prerušením dýchania. Ukazuje, že počas perakútnej hypoxie sa prehĺbené vzdychy objavujú aperiodicky, takmer kontinuálne, vyvíjajú sa z abortívnych foriem do plne vyvinutého dychového vzoru. Poukazuje to na skutočnosť že podobne ako pri Cheyneovom-Stokesom dychovom vzore, alebo iných periodických formách dýchania ako ej tzv. cluster breathing, sú prehĺbené dychy u cicavcov pomerne bežnou súčasťou respiračnej odpovede pri hypoxii [18]. Práca porovnáva vývoj časových i amplitúdových zmien jednotlivých častí dychového cyklu a vzdychov počas kompenzačnej hyperventilácie. Poukazuje na skutočnosť, že tieto mimorytmické prejavy reagujú na hypoxiu konzistentne s fázickou časťou dychov, čo môže naznačovať, že na ich vzniku sa podieľajú podobné mechanizmy, ako pri genéze fázickej - eupnoickej rymickej zložky dychov, na čo poukazujú viaceré práce z posledného obdobia [20].

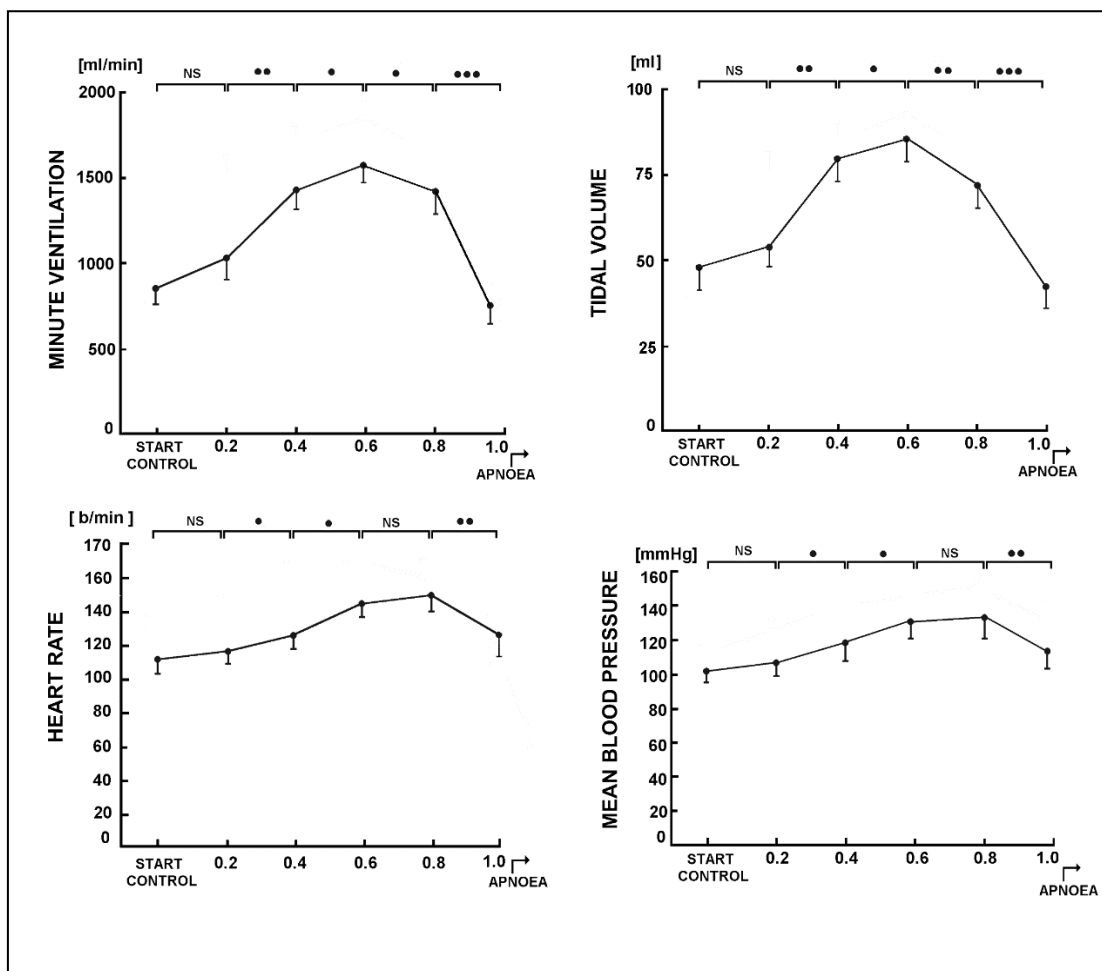
Materiál a metodika

Všeobecná príprava Prezentované výsledky vychádzajú z archivovaných údajov a spracovaných údajov z viacerých experimentálnych protokolov na modeli perakútnej hypoxie v súlade s príslušnými etickými princípmi, normami práce pod dohľadom a schválených poverenou autoritou. Záverečný súbor zahŕňa 342 hypoxicky navodených prehĺbených dychov z pôvodných experimentálnych štúdií u 13 mačiek oboch pohlaví v celkovej pentobarbitalovej anestézii ($20-40 \text{ mg.kg}^{-1}$ i.p. úvod; suplementácia $4-5 \text{ mg.kg}^{-1}$ i.p. alebo 1 mg.kg^{-1} i.v. za hodinu v) s využitím lokálnej anestézie podľa potreby ($1-2 \text{ ml}$ mezokaínu, $3-10\%$), s normálnou teplotou (T_t $36-37^\circ\text{C}$ v rekte) adýchajúcich spontánne ($\text{FiO}_2 \sim 21\%$) endotracheálnou kanylou v tracheotomickej incízii.

Špeciálne registrácie. Prezentované prietokové dáta boli namerané vysoko senzitívnou pneumotachografickou hlavickou (Lillyho typ; dynamický odpor $\sim 30 \text{ Pa}$; mŕtvy priestor $<3 \text{ cm}^3$; lineárny výstup do 7 l.min^{-1}) pripojenou k



Obrázok 1 Kontinuálny záznam prehĺbených dychov počas epizódy perakútnej anoxickej hypoxie. V natívnom i v integrovanom zázname EMG exspiračných interkostálnych svalov 9-teho medzirebria (EMG a iEMG EIC9) si možno všimnúť, že pri intenzívnej inspiračnej odpovedi ($\dot{V}$, tracheálny prietok vzduchu) dochádza k jej útlmu a pôvodne fázická aktivita, sa rozdelí do solitárnych výbojov. Skr. A, začiatok apnoe; EMG DIA, iEMG DIA, natívna a integrovaná elektromyografická aktivita bránice; S, prehĺbený dych (sigh); $\dot{V}$, tracheálny prietok vzduchu. Horizontálna čiara označuje trvanie poikilokapnickej hypoxickej expozície ($\text{FiO}_2 < 5\%$).



Obrázok 2 Dvojfázová respiračná a kardiovaskulárna odpoveď počas hypoxickej epizódy. Abscisa: parametre minútovej ventilácie (V_E) a veľkosť dychového objemu (TV) (vľavo a vpravo hore), frekvencie srdca (HR) a stredného arteriálneho tlaku krvi (MAP) (vľavo a vpravo dole) v normalizovanom intervalovom zobrazení počas hypoxických epizód ($n=19$) (ordináta): Skr.: Start, Control, začiatok hypoxie, kontrolné dáta; Apnoe, ukončenie expozície. Údaje sú $M \pm SD$ z 3-4 dychov (horné panely) alebo 5 vzoriek (dolné panely) bezprostredne pred koncom príslušného intervalu. Porovnávané sukcesívne intervaly: počet symbolov zodpovedá $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$. NS, nesignifikantné.

pneumotachografu (PTG). Z výdychového segmentu hlavičky sa odoberali vzorky pre meranie $P_{ET}O_2$ a $P_{ET}CO_2$. Hypoxia bola navodená vdychovaním N_2 obtekajúceho PTG hlavičku ($\sim 1-3$ l.min $^{-1}$; výstupný tlak < 5 Pa). Dynamické prietoky a tlaky počas hypoxickej hyperventilácie dosahovali 3-9 l.min $^{-1}$ a 30-170 Pa, takže arteficiálny metodický bias bol minimalizovaný. U vybraných objektov ($n=6$) v použitom súbore bola katétrizovaná femorálna tepna (meranie arteriálneho tlaku krvi, TK; resp. výpočet stredného tlaku krvi MAP), event. femorálna žila (supl. anestetika resp. aplikácia 10 ml 10% glukózy resp. 6 % dextran v izotonickom roztoku podľa potreby).

V práci sú prezentované simultánne záznamy elektromyografickej (EMG) aktivity ($n=6$ subjektov) kostálnej bránice (DIA), inspiračných (IIC; medzirebrie T4-6) event. expiračných (EIC; T7-9) interkostálnych svalov registrované implantovateľnými bipolárnymi metalickými elektródami (Ag alebo Pt) izolovanými teflónom ($\varnothing 0,5-1$ mm, vzdialenosť pólův 4-7 mm). Natívna aktivita bola predzosilnená, zosilnená, filtrovaná pásmovým filtrom, jednosmerne preklopená a integrovaná (čas. konšt. 70-100 ms).

Protokol a záznamy dát. U každého subjektu, ktorého dáta boli použité, boli vykonané 3-4 poikilokapnické hypoxické testy ($FIO_2 < 5\%$). K obnoveniu dýchania do kontrolného stavu po útlme dochádzalo spontánne event. riadenou podpornou ventiláciou (150-500 Pa; inspírium 0,7-1 s, expírium 1-1,4 s) s použitím 80-100% O_2 (6 l.min $^{-1}$). U každého subjektu boli archivované natívne alebo AD-vzorkované dáta: PTG, EMG, TK, EKG pre off-line analýzu. Pre vizuálnu kontrolu boli on-line registrované (termocitlivý zapisovač) tracheálny prietok vzduchu, $P_{ET}O_2$ a $P_{ET}CO_2$, systémový arteriálny tlak (TK), voliteľne EMG bránice (DIA) alebo inspiračných a expiračných interkostálnych svalov a EKG (II. zvod),

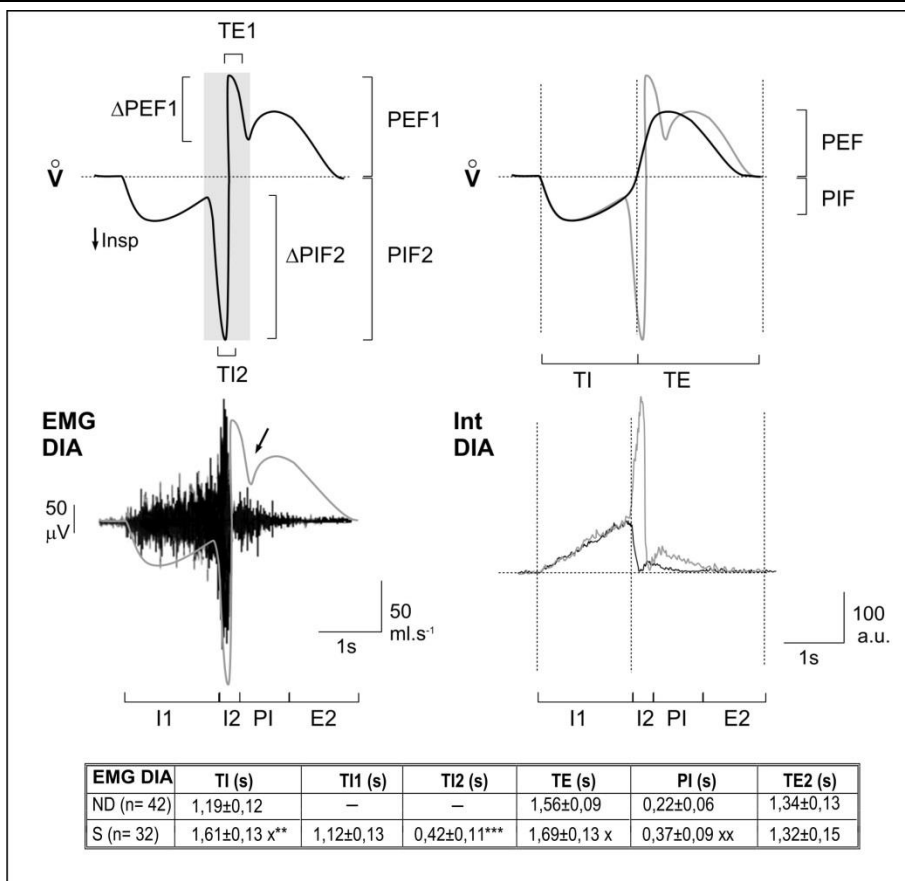
Hodnotenie. Pre zhodnotenie výskytu a vývoja prehĺbených dychov a ich maximálnej a minimálnej intenzity, bola dĺžka hypoxickej epizódy vyjadrená časom [s] či počtom dychov normalizovaná do relatívnej dátovej škály (dĺžka hypoxie v rozsahu 0-100 %; resp. 0-1). Podobne, boli normalizované aj parametre PTG- záznamu: časové parametre TI a TE [s] (trvanie inspíria a expíria), prietokové parametre PIF a PEF [ml/s] (maxim. prietoky počas in-

spíria a expíria) a odvodené hodnoty. Umožnilo to analyzovať celú epizódu respiračnej odpovede až do vzniku apnoe ako jeden špecifický dej a porovnať tendenciu ich vývoja na rozdiel od bežných metód skúmajúcich len vybrané úseky počas epizódy. Dáta integrovanej EMG aktivity boli normalizované podľa arbitrážnej škály. Pre štatistické porovnania bol použitý Wilcoxon-Mann-Whitneyho test. Výsledky sú prezentované ako $M \pm SEM$, ak nie je uvedené inak. Rozdiely sa považovali za významné ak $P < 0,05$ (Statistica, Statsoft Inc.).

Výsledky

Celková ventilačná a cirkulačná odpoveď. Hypoxická expozícia vyvolala bezprostrednú hyperventilačnú (evidentnú v PTG i v EMG záznamoch) i cirkulačnú reakciu (Obr. 1 a 2) ukončenú nástupom apnoe. Respiračná odpoveď trvala v celom súbore v 86 ± 8 s a zahŕňala 25 ± 4 dychových cyklov ($n=38$, $M \pm SD$). Hypoxia bola spúšťacím faktorom mimofázických prejavov vo forme intrúzií spazmodickej inspiračnej aktivity v neskoršej časti fázického inspiéria, ktoré prehĺbujú a predlžujú inspirium vo forme analyzovaných tzv. prehĺbených dychov (S, sighs) ($n=342$). Prudké inspirium počas prehĺbených dychov bolo v PTG záznamoch nasledované zosilnenou odpoveďou (zákmitom) v úvode expíria. Tento jav je spôsobený jednak spätným nárazom vzduchu z dýchacích ciest pľúcnou elasticitou, ale, ako možno sledovať aj na obr. 1 v istej miere aj slabšou ale detekovateľnou aktivitou expiračných svalov (Obr. 1). Počas poikokapnickej hypoxickej hyperventilačnej reakcie dochádza k útlmu fázickej expiračnej aktivity, k čomu prispieva aj výskyt prehĺbených dychov. (Obr. 1)

Počiatková *stimulačná fáza* respiračnej odpovede na hypoxiu sa vyznačovala narastajúcou kompenzačnou hyperventiláciou (Obr. 2 hore) s progresívnym zvyšovaním prietokových amplitúd. Nasledujúca *inhibičná fáza* sa prejavovala redukciou aktivácie alebo útlmom respiračnej odpovede pod kontrolnú úroveň, ktoré bola ukončená apnoe. Hyperpnoické úsilie kulminovalo medzi 60 - 80-tým percentilom ($\sim 70\%$) trvania hypoxickej epizódy, čo poukazuje na skutočnosť, že útlm respiračnej stimulácie nevznikol náhle až pri apnoe (Obr. 2). Hyperventilačná odpoveď bola



Obrázok 3 Typický záznam tzv. prehĺbeného dychu (sigh). Vľavo hore, penumotachografický záznam (PTG) s parametrami; vpravo hore – superponované záznamy normálneho dychu (ND) a prehĺbeného dychu (S). PEF1 vyznačuje maximálny expiračný prietok po prehĺbenom dychu Vľavo a vpravo dole – EMG krurálnej bránice (EMG DIA) so superponovanou prietokovou krivkou a –superponované záznamy integrovanej EMG aktivity DIA (Int DIA) pri normálnom (hrubo) a prehĺbeného dychu (tenká línia). Vo ventilačnom i neuromotorickom výstupe počas vzdychu sú prítomné 2 odlišné úseky – I1 štádium (eupnoický inspiračný vývoj) a I2 štádium (augmentačná gaspu-podobná inspiračná aktivita). Počas expíria dochádza k zosilneniu post-inspiračného výboja (PI fáza). Aktivita so zostupným vzorom svahu je nasledované útlmom EMG DIA počas aktívneho expíria (fáza E2, neskoré expírium). Skr. PIF, PEF, vrcholový inspiračný a expiračný prietok; TI, TE trvanie inspiéria a expíria. Dáta uvedené v tabuľke sú $M \pm SEM$.

typicky sprevádzaná stimulačnou cirkulačnou reakciou, načo poukazuje nárast arteriálneho tlaku krvi a srdcovej frekvencie maximami posunutými oproti ventilácii do 80-teho percentilu hypoxie (oproti kontrole nárast 1,3-krát a 1,5-krát, $P < 0,001$). K významnému poklesu došlo až neskôr po nástupe apnoe (Obr. 2 dole) – tzn. cirkulačná odpoveď sa oneskorovala a pretrvávala i bez ventilačnej reakcie. Tento nález poukazuje na istú regulačnú respiračno-

Formy dychov	DIA a.j.	IIC4 a.j.	EIC9 a.j.
ND	110±4,7	112±5,4	95±4,1
S	372,4±9,9 xx	436,3±10,7 xxx	67,4±4,2 x

Tabuľka. 2 Amplitúda maximálnej dosiahnutej neuromuskulárnej aktivity. Dáta sú uvedené ako $M \pm SEM$. Normálne dychy (ND) ($n=42$) vs. prehĺbené dychy (S) ($n=32$)cca v 50- 60% dĺžky trvania anoxickej epizódy. x, $P < 0,05$; xx $P < 0,01$; xxx, $P < 0,005$.

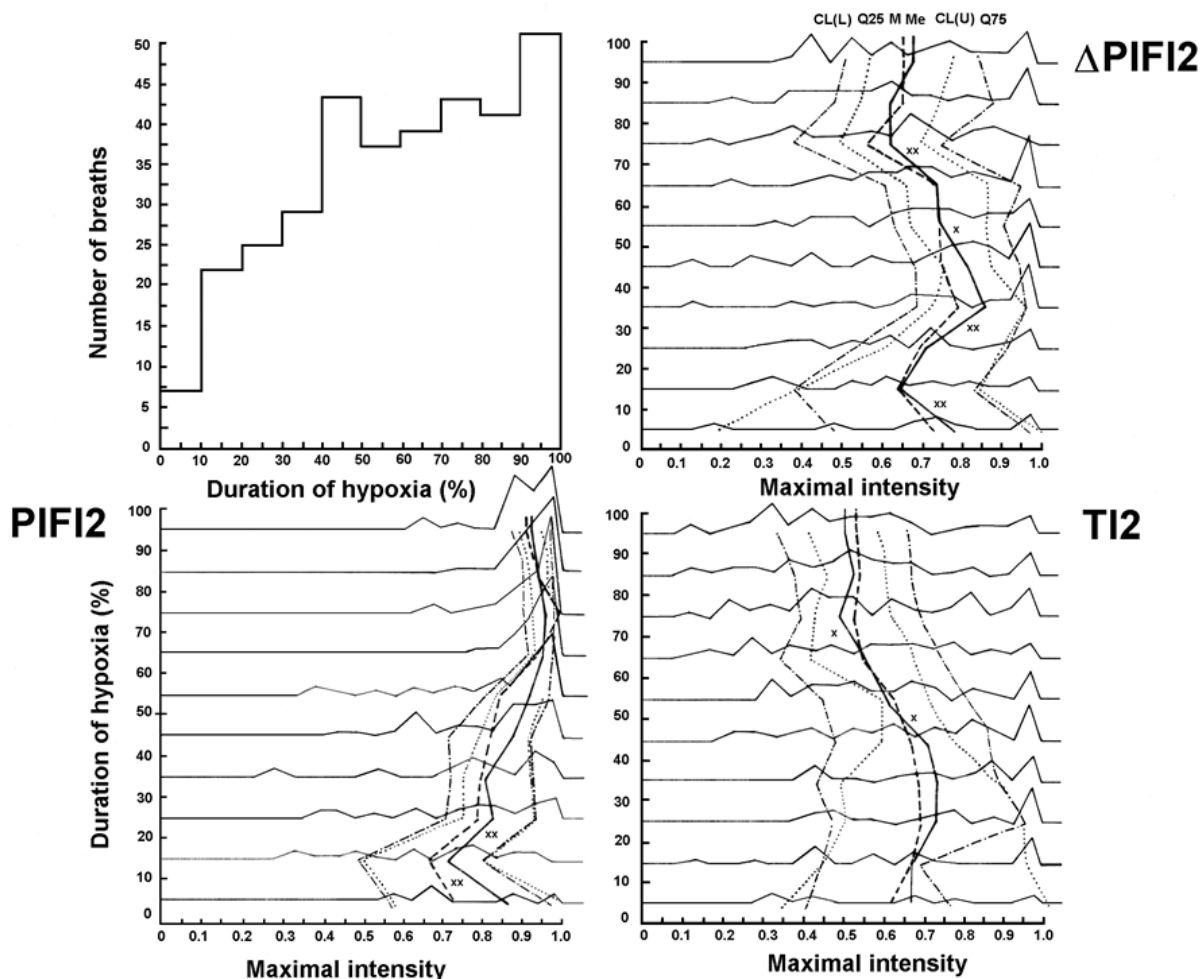
Parameter	Normálne dychy (n=93)	Prehĺbené dychy (n=59)
VT(ml)	53,7 ± 2,6	87,6 ± 4,6xx
PIF I1 (ml.s ⁻¹)	48,7 ± 3,1	52,3 ± 5,3
PIF I2 (ml.s ⁻¹)	-	187 ± 6,3+++
PEF E2 (ml.s ⁻¹)	71,4 ± 3,8	65,2 ± 4,7
TI (s)	1,21 ± 0,09	1,68 ± 0,13xx
TE (s)	1,42 ± 0,11	1,82 ± 0,14xx
TTOT(s)	2,64 ± 0,10	3,54 ± 0,12xx
VTI/TI (ml.s ⁻¹)	38,9 ± 28	50,2 ± 2,2xx
VTE/TE (ml.s ⁻¹)	35,2 ± 1,8	42,1 ± 2,9x
TI/TTOT	0,46 ± 0,02	0,51 ± 0,01

Tabuľka. 1. Charakteristika ventilometrických dát pri prehĺbených dychoch. M±SEM. Kontrola (pred epizódou hypoxie) vs. prehĺbené dychy (cca v 50- 60% dĺžky trvania hypoxiekej epizódy. x, P<0,05; xx P<0,01; xxx, P<0,005; Porovnanie medzi PIF1 a. PIF2, +++, P<0,001.

cirkulačnú dichotómiu v reakcii na perakútnu hypoxiu, do-

bre známu aj z iných štúdií.

Charakteristiky prehĺbených dychov. V zázname tracheálneho prietoku a tiež v natívnom a integrovanom EMG inspiračných jednotiek možno rozlíšiť 2 štádia, resp. fázy inspiria (Obr. 3): *skoré štádium* (štádium I1) s postupne narastajúcou inspiračnou aktivitou (tzv. ramp-like) a *neskoré štádium* (štádium I2) so salvou výbojovinspiračnej aktivity vysokej amplitúdy podobnej gaspu. V EMG táto mimofázická aktivita nasleduje za predošlým fázickým výbojom (I1); v PTG nasadá ako vysokoamplitúdové rozšírenie za plochším prietokovým maximom (PIF) riadneho inspiria (Obr. 3). Trvanie TI1 počas S sa významne neodlišuje od dĺžky trvania fázických dychov (TI) v EMG (Obr. 3) a podobné výsledky možno sledovať aj v PTG (tab.1; TI1 vs. TI). Maximálna amplitúda iEMG v inspiračných svaloch (napr. DIA) počas S je výrazne väčšia ako počas ND (P < 0,001) (Tab.2), v následnom exspíriu je intenzita výbojov v EIC T9 signifikantne nižšia u S ako pri ND (P < 0,05). Trva-



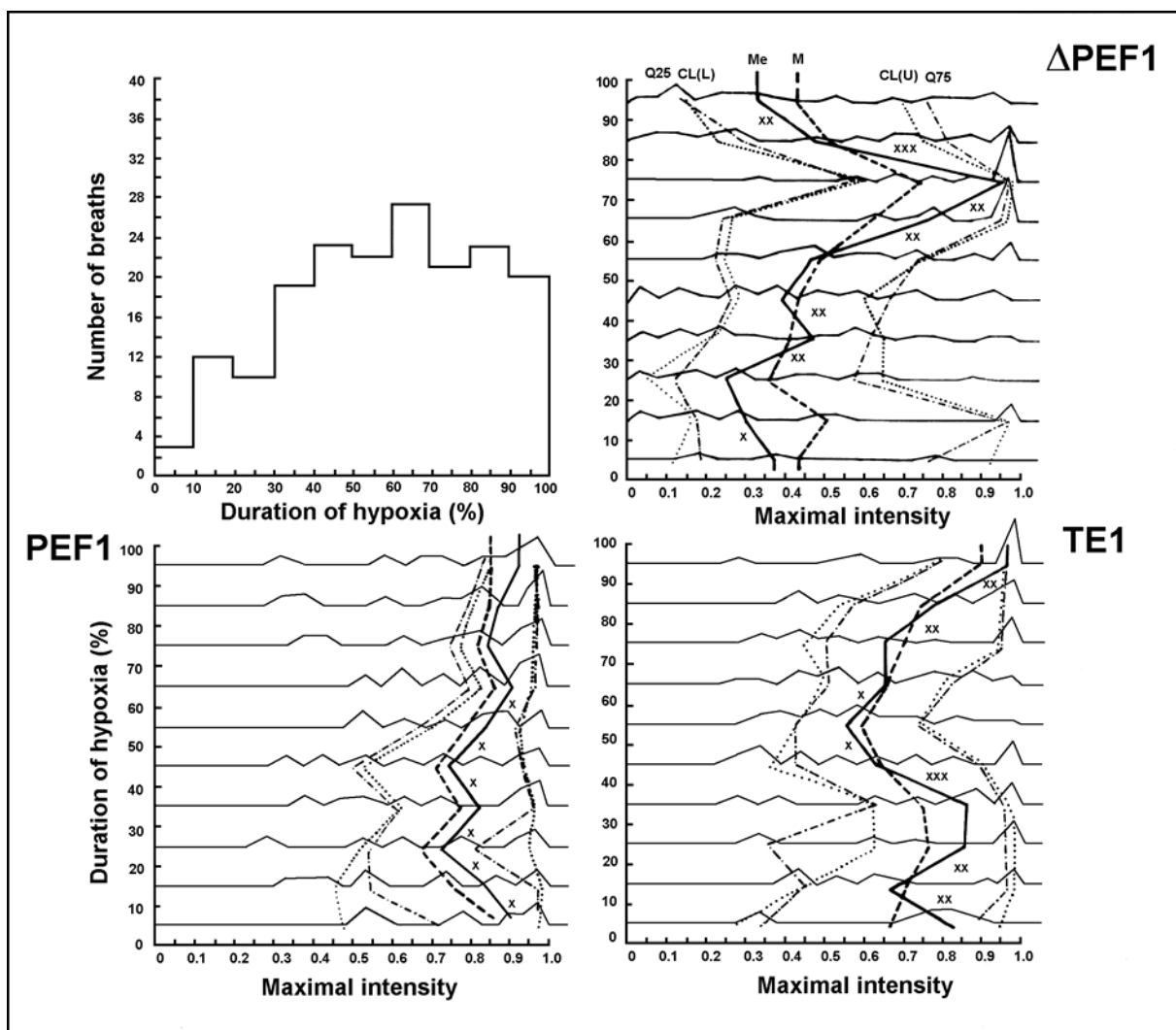
Obrázok 4. Výskyt a inspiračné parametre prehĺbených dychov – vzdychov (S) počas normokapnickej perakútnej hypoxie ($F_{iO_2} < 5\%$). Horný panel vľavo ukazuje kumulatívny graf výskytu prehĺbených dychov. Trvanie hyperventilačnej epizódy (v sek.) bolo u všetkých záznamov (n = 32) kvôli porovnaniu normalizované (10%-né intervaly). Na ďalších paneloch sú 3D grafy zobrazujúce frekvenčné krivky dosiahnutého maxima pre PIF2 (vrcholového inspiračného prietoku počas augmentácie), $\Delta PIF2$ (prietokového interceptu; rozdiel voči predchádzajúcemu maximu fázickej časti inspiria (PIF1) a maxim trvania (TI2) inspiračnej augmentácie AB (n = 342) normalizované v škále 0-1 (ordináta); Abscisa: normalizované intervaly trvania inspiria (0-100%). Popisné štatistické premenné: Me, medián (hrubá čiara); M, priemer (čiarkovane), Q25-075, horný a dolný kvartil a horný CL(U) a dolný CL(L) horná a dolná limita konfidénčného intervalu pre medián. x, P < 0,05, xx, P<0,01 xxx, P<0,005 v porovnaní s priermi predchádzajúceho intervalu.

nie expiračnej (TE) fázy v iEMG počas S je mierne dlhšie ako u ND ($P < 0,05$). Deje sa to na úkor predĺženia post-inspiračného výboja PI v EMG bránice a IIC T4 (Obr. 3).

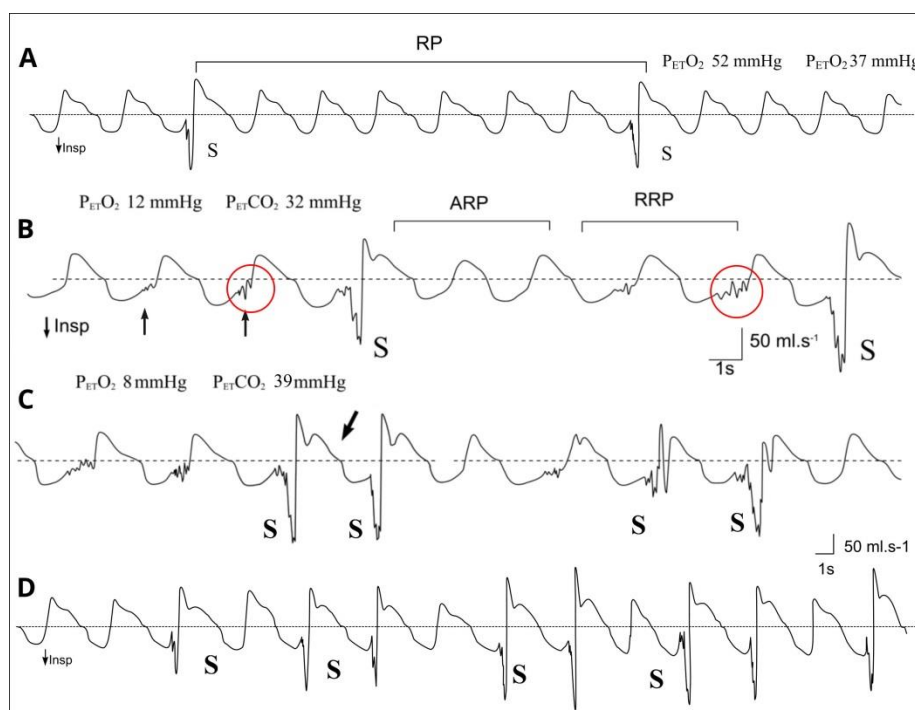
Podobné koreláty platia v PTG záznamoch. Celkové trvanie dychov (T_{tot}), trvanie inšpiria (TI) ako aj expiria (TE) sú signifikantne dlhšie počas S oproti ND (Obr. 3, Tab. 1) ($P < 0,01$). Výrazne vyšší u S je dosiahnutý objem dychov (V_T), maximálny inspiračný prietok (PIF2) a podobne aj tzv. inspiračný a expiračný „drive“ (V_{TI}/TI ; V_{TE}/TE) (Tab. 1)

Počas sledovaných epizód hypoxie ($n=38$) u 13 subjektov bolo analyzovaných 342 S (Obr. 3). Ich výskyt a varíoval od 3 – 13 S počas 1 epizódy (normalizovane 2-8 S počas 10 sukcesívnych dychov). Počet prehĺbených dychov počas perakútnej hypoxie stúpa takmer exponenciálne (Obr. 4; vľavo hore). Ďalší menší vrchol bol nájdený približne v po-

lovici hypoxickej expozície. Najkoncíznejším nálezom bol vývoj hodnôt vrcholového inspiračného prietoku (PIF12). V prevažnej väčšine prípadov dosahuje maximálne hodnoty v závere hypoxie (70-100 percentil), pričom ku koncu hypoxickej epizódy sa znižuje aj ich variabilita. (Obr. 4). Zmeny v intenzite mimofázického výboja, aktivity (napr. PIF(I2)) majú prakticky rovnaký priebeh, ako maximá fázického inšpiria (PIF resp. PIF(I1)). Výsledky pre časové parametre (TI2) boli omnoho variabilnejšie. Ukazujú, že počas hypoxie dochádza k skráteniu trvania mimorytmickej inspiračnej aktivity I2, najmä medzi 50-70 percentilom trvania hypoxie (Obr. 4). Celkovo v súbore, TI2 bolo významne dlhšie v prvej polovici trvania hyperventilácie v porovnaní s druhou polovicou (50 – 100 %). Relatívny prietokový prírastok v I2-štádiu oproti ($\Delta PIF12$) dosahoval maximálne hodnoty približne v polovici trvania hypoxickej ven-



Obrázok 5. Expiračné parametre sériovo idúcich prehĺbených dychov (S, vzdychov) počas epizódy poikilokapnickej hypoxie. Horný panel vľavo: distribúcia S (kumulatívne dáta) s výrazným včasným expiračným spätným prietokovým nárazom ($n = 179$). Trvanie hyperventilačnej epizódy (v sek.) bolo normalizované (10%-né intervaly) u všetkých záznamov ($n = 38$). Ďalšie panely: 3D grafy frekvenčných kriviek maxím pre PEF1 (vrcholový expiračný prietok (PEF = PIF1) počas spätného vzduchového nárazu, jeho trvanie TE1 a $\Delta PEF1$ (rozdiel v maximálnom expiračnom prietoku oproti maximu fázickej časti expiria (E2)). Ordináta: maximálna intenzita (normalizované). Abscisa: trvanie hypoxickej epizódy (normalizované; 0-100%). Popisné štatistické údaje: Me, medián (hrubá čiara); M, priemer (čiarkovane), Q25-Q75, horný a dolný kvartil a horný CL(U) a dolný CL(L) horná a dolná limita konfidenčného intervalu pre medián. x, $P < 0,05$, xx, $P < 0,01$ xxx, $P < 0,005$ v porovnaní s priermi predchádzajúceho intervalu.



Obrázok 6 Vývoj prehĺbených dychov (S) a dychových atypií pri perakútnej hypoxii. **Panel A:** výskyt samostatných vzdychov (S) s absolútnou refrakteritou (RP) počas miernej hypoxie **B:** hypoxický „vývoj“ prehĺbených dychov cez rad prehľbujúcich sa porúch na inšpiro-expiračnom prechode (šípky) nasledovaný absolútnou (ARP) a relatívnou refrakternou fázou (RRP). **Panel C:** Akumulácia zmien dych po dychu v neskorom inšpiriu končia v dubletoch s následným resetom. **Panel D:** Takmer kontinuálny priebeh prehĺbených dychov.

tilačnej odpovede (interval 30 – 50 %). Dáta na konci hypoxie sú podobné, ako na začiatku, menej konzistentné ako pri PIF2, viacvariabilnejšie, menej konzistentné ako pri parametri PIF2. Ku koncu hypoxickej epizódy sa súbežne s PIF2 výrazne zvyšovali aj maximá fázickej časti hyperventilačného úsilia (tzn. PIF resp. PIF1). Naviac I2 štádium S nenasadalo na koniec, ale už za vrcholom fázického inšpiria (67% S v interval 70-90 percentilu), čo sa odráža na zmenšení parametra $\Delta PIF2$.

Maximálny expiračný prietok počas S sa registroval na začiatku E fázy (PEF1) a počas výrazného expiračného zákmitu v PTG (Obr. 2). V tomto čase, tesne pred nástupom zostupného post-inspiračného výboja v EMG Dia (Obr. 3 dole), sa objavovali osamotené salvy aktivity v EMG zázname expiračných jednotiek (EIC T9), avšak hypoxia viedla celkovo k inhibícii expiračnej fázickej aktivity. Je teda zrejmé, že mimo pasívneho návratu daného elasticitou pľúc je v pozadí tohto forsírovaného výkyvu prietokových zmien aj svalová aktivita. Prietokové maximá PEF1 aj jeho trvanie (TE1) (Obr. 5) vykazujú vyššiu variabilitu. Ich hodnota narastá smerom ku koncu hypoxie (60-90 percentil trvania). Tendencia vývoja parametra $\Delta PEF1$ - tzn. expiračného PTG zákmitu pred nástupom fázického expira, je veľmi podobná ako u parametra PIF2 (Obr. 4 vs. Obr. 5). Maximá dosahuje tento parameter medzi 70 - 90 % trvania hypoxie ($P < 0,01$). Sumárne, dĺžka trvania TI2 a $\Delta PIF2$ dosahuje maximá v prvej polovici hyperventilácie; všetky ďalšie v druhej polovici. V druhej polovici hypoxickej expozície sa so zvyšujúcou frekvenciou vzdychov a celkovým skrátením trvania inšpiria skracuje i trvanie I2 fázy

vzdychov (TI2, panel dole vpravo) ($P < 0,05$).

Vývoj prehĺbených dychov

Periodický výskyt vzdychov a oscilačných dychov (Obr. 6A) je typický pre spontánne dýchanie - tzn. samostatne sa vyskytujúce S, ktoré sú oddelené rôzne dlhou a pravidelnou periódou (15-58 s). pri miernej hypoxii. Pri perakútnej hypoxii je zriedkavejší (3 testy; ~15,5% testov; 5-6 S na 21 ± 2 dychov). Perióda medzi vzdychmi sa skracuje a počet vzdychov narastá v priebehu hypoxie v priemere asi 1,6 krát ($P < 0,05$)

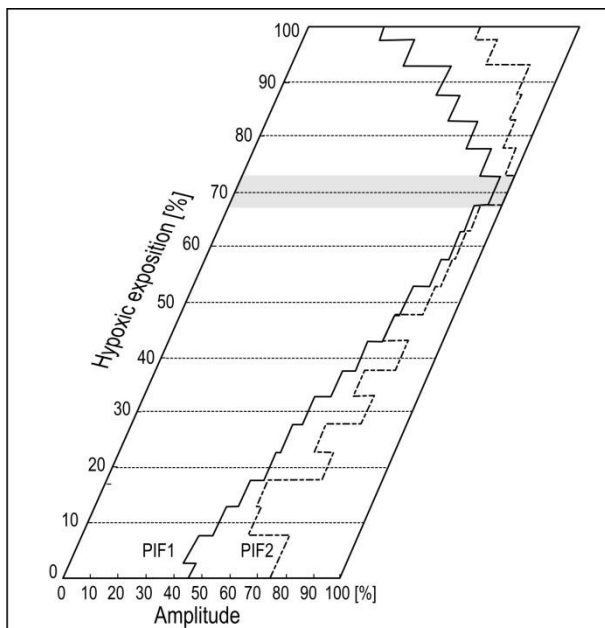
Postupný vývoj prehĺbených dychov (Obr. 6B, C) je charakterizovaný alteráciami v neskorom inšpiriu a inšpiračno - expiračnom prechode, ktoré kulminujú vývojom prehĺbených dychov (15 testov; 38,5%). S postupom hypoxie sa zvyšuje frekvencia i amplitúda.

Kontinuálny výskyt prehĺbených dychov (Obr. 6D) bol najčastejším nálezom počas perakútnej hypoxie (20 testov; 53%). Nevykazuje refrakteritu. Prehĺbené dychy, ktorých amplitúda sa zvyšuje s postupom hypoxie sú oddelené 1-2 fázickými dychmi.

Diskusia

Perakútna anoxická hypoxia vedie k závažným poruchám rytmogenézy, pri ktorých sa objavujú celkom atypické dychové formy so zmenami v štruktúre inšpiračnej fázickej aktivity, najmä v jej terminálnej časti - v inšpiračno-expiračnom prechode. Táto časť respiračného cyklu je mimoriadne fragilná a náchylná na rôzne intrúzie, napr. reflexné prejavy pri impulznej elektrickej alebo tlakovej stimulácii v nazofaryngu a orofaryngu (aspiračný reflex). Napr. pri kontinuálnej elektrickej alebo tlakovej impulznej stimulácii je práve I2 fáza najsusceptibilnejšia na rôzne mimorytmické intrúzie (Obr. 6C). Tieto zmeny môžeme najlepšie sledovať v citlivom zázname endotracheálneho prietoku vzduchu s citlivou odporovou hlavicou, nakoľko vo výbojom vzore n. phrenicus alebo bránice ich možno ľahko prehliadnuť. Sú tiež dobre detekovateľné na natívnych resp. integrovaných záznamoch svalovej aktivity s nízkou časovou konštantou (približne 0,4-0,7).

Typický periodický výskyt solitárnych vzdychov počas hypoxie je dobre známy [2,10, 21, 22]. Rytmicita ich výskytu sa popisuje nielen v kontexte istého akumulatívneho a refraktérneho mechanizmu aký môžeme pozorovať napr. u periodických foriem dýchania (cluster breathing, Cheyneho - Stokesove dýchanie atď.) ale aj u iných rytmických neuronálnych procesov. Práca ukazuje, že pri intenzívnej-



Obrázok 7. Konzistentný výskyt maxim vo fázickej (PIF1) i mimofázickej časti inspiria (PIF2) vo vybraných záznamoch tzv. prehĺbených dychov pri akútnej hypoxii.

šej chemickej stimulácii sa prehĺbené dychy objavujú s vyššou frekvenciou i amplitúdou, sú menej pravidelné a vyvíjajú sa prakticky kontinuálne dych po dychu. Extrémnejšie podmienky demaskujú mechanizmus pri periodizácii S vo forme stupňujúcich sa porúch. Podobné javy, skracovanie periódy, výskyt v pároch či hniezdach ako aj iné dysrytmické atypie sú známe aj počas spánku. Prehĺbené dychy sa akumulujú nezriedka pred vznikom spánkového apnoe alebo po obnovení dýchania [3, 16]. Akumulácia S do „hniezd“ sa objavuje aj u novorodencov najmä počas ventilačných manévrov, zahŕňajúc množstvo chemo- a mechanoreceptívnych podnetov [12, 17]. Ako ukázala aj táto práca prehĺbené dychy nepredstavujú amplitúdovo i trvaním invariantné formy dychov. Zmenami frekvencie i parametrov arytmiická časť I2 prehĺbených dychov reaguje na zmeny chemickej stimulácie (pokles O_2 a event nárast CO_2) na čo poukázali aj niektoré predošlé [7, 8, 9, 10, 11]. Prezentované dáta ukazujú, že fáziká časť hyperpnoického úsilia (dychová amplitúda) nekulminuje za záver tesne pred ukončením dýchania ale približne v 3/4 trvania tejto epizódy (tzn. 75% trvania predapnoickej fázy) (Obr. 2). Podobne prehĺbené dychy, ich I2 zložka nárastom intenzity postupne graduje (PIF2 na obr. 4) do 70-80 % trvania hypoxickej epizódy. To naznačuje, že I2 reaguje na chemický „drive“ podobnou odpoveďou ako fáziká časť dychu, teda kvantitatívnou moduláciou, nie odpoveďou typu „všetko alebo nič“, ako by sme napr. mohli usudzovať pri gaspe (lapavom dychu) (Obr. 1). Poukazuje to, popri všetkých odlišnostiach v tvare inspiračného výboja (I1 a I2 štádium S), na istú regulačnú spriahnutosť medzi štruktúrami zodpovedajúcimi za tvorbu S a eupnoickú aktivitu pri reakcii na chemické inzulty. Dobré to ilustrujú priemery maxim I1 a I2 aktivity na obr. 7, vybrané z 20 testov s kontinuálnym vývojom prehĺbených dychov.

Počet prehĺbených dychov a ich intenzita narastá

s priebehom hypoxickej expozície (Obr. 4 a Obr. 5 vľavo hore). Tento efekt je pomerne konzistentný a s malou variabilitou v celej vzorke. Amplitúda I2- štádia prehĺbených dychov (Obr. 4; PIF12) kulminuje počas hypoxickej expozície koherentne s maximami fázikkej aktivity (Obr. 7 PIF1 vs. PIF2) - tzn. v 70 – 75 % úseku trvania hypoxie. Trvanie dychových fáz i trvanie prehĺbených dychov je v prvej časti hyperventilačnej odpovede vždy variabilnejšie, o to viac počas expíria. Prechodné predĺženie TI2 je nasledované vždy skrátením trvania (Obr. 4 T2; 60-80-ty percentil); pričom TE1 má esovitý priebeh. Maximá PEF1 vykazujú menej konzistentný nárast ako PIF2 (Obr. 4 a Obr. 5).

Práca neanalyzovala detailne zmeny prejavu v neuromuskulárnych jednotkách; uvedené záznamy DIA resp. IIS T4 slúžia skôr pre ozrejmienie PTG. Popísané dve odlišné zložky aktivity počas inspiria (I1 a I2) akcentovaná postinspiračná aktivita i inhibícia expiračnej aktivity sú konzistentné svýsledkami iných autorov [11, 13, 31, 32].

K problematike prehĺbených dychov a ich mechanizmov sa objavilo za posledné 2-3 dekády viacero klinických i neurofyziológických štúdií. Existujú detailnejšie dáta ale mechanizmus tvorby hlbokých dychov nie je ani po polstoročí popisov úplne detailne známy [21, 30]. Dlhý čas je známy antiatalektický účinok prehĺbených dychov súvisiaci s periférnou chemorecepciou (hypoxia) a mechanorecepciou z pľúc (rýchlo sa adaptujúce receptory). Predpokladalo sa tiež, že vzhľadom k typu výboja môže ísť o superponovaný gasp, avšak ablácia preBötzingrovej oblasti (preBötC) vyraduje gasp, ale nie prehĺbené dychy [19, 24]. Podľa súdobých konceptov sa eupnoické dychy ako aj prehĺbené dychy (S) vytvárajú v dychovom (inspiračnom) centre v preBötzingerovom komplexe v rostrálnej ventrolaterálnej časti predĺženej miechy (RVLM), a to zmenami synaptických vstupov a zmenami vnútorných membránových vlastností u rovnakých neuronov [14, 15, 16, 19, 20, 29] alebo interakciou medzi spriahnutými subpopuláciami osobitých neurónov pre eupnoe a prehĺbené dychy [4, 30]. Typický vzor prehĺbených dychov s augmentačnou I2 fázou možno vidieť aj na izolovaných *ex vivo* preparátoch, resp. rytmických rezoch zahŕňajúcich oblasť preBötC a ďalšie neuronálne skupiny v rostrálnej ventrolaterálnej časti predĺženej miechy (RVLM) [18, 20, 29, 30]. Je známe, že aktivita preBötC je modulovaná synapticky z periaqueduktálnej sivej hmoty a vyšších centier (hypofýza, hipokampus, limbické okruhy), čo vedie k zmenám respiračného vzoru, napr. pri rôznych behaviorálnych stavoch, pri afektívnych reakciách, strachu, panike, reakcii ohrozenia a pod. [18]. Súdiac podľa participujúcich neuronálnych štruktúr, môže ísť o obdobu, či súčasť komplexnejšieho protektívneho behaviorálneho mechanizmu (antistresového -antinociceptívneho systému), ktorý sa uplatňuje pri rôznych modalitách ohrozenia a vedie k zvýšenej vzrušivosti v neuraxis – arousal, na čo poukazovali už predošlé [25, 28] a aj posledné práce [1, 18, 23].

Summary

The work quantifies the occurrence, time distribution and

alterations in the breathing pattern of the respiratory dysrhythmia during so called augmented breaths (S, sighs) induced by an episode of anoxic hypoxia. These extra rhythmic manifestations are defined in flow changes and integrated inspiratory muscular activity by rapid and spasmodic inspiria caused by discharge in inspiratory units that is superimposed beyond the top of the preceding rhythmic inspiration phase expanding the entire breath). Frequency of sighs within monitored episodes of hypoxia increased with the duration of hypoxic exposure and culminates just before the onset of apnoea. The maximum amplitude of sighs was

achieved in the second half of the hypoxic episode (70%-interval), consistently with the maximum of phasic activity. Typical finding was the occurrence of gradual alterations in I2 stage and nearby inspiratory-expiratory transition part of breaths before normal forceful S was launched. During hypoxic exposure, both the intensity and the duration of the S phase I2- augmenting activity, respectively changed significantly. The current findings are discussed in the context of a contemporary data past and contemporary data about the formation of S as an alternative respiratory pattern generated within the respiratory rhythmogenic center.

Literatúra

- Ajayi, I.E., Mills, P.C.: Effects of the hippocampus on the motor expression of augmented breaths. *PLoS One*, 12(8):e0183619, 2017.
- Bartlett, D., Jr.: Origin and regulation of spontaneous deep breaths. *Respir. Physiol.*, 12: 230-243, 1971.
- Bastianini S, Alvente S, Berteotti C, Bosi M, Lo Martire, V., Silvani, A., Valli, A., Zoccoli, G.: Post-sigh sleep apneas in mice: Systematic review and data-driven definition. *J. Sleep Res.* 28(6):e12845, 2019.
- Borru, D.S., Stettler, M.K., Grover, C.J., Kalajian, E.J., Gu, J., Conradi Smith, G.D., Del Negro, C.A.: Inspiratory and sigh breathing rhythms depend on distinct cellular signalling mechanisms in the preBotzinger complex. *J. Physiol.*, 10.1113/JP285582, 2024.
- Chapuis, C., Autran, S., Fortin, G., Simmers, J., Thoby-Brisson, M.: Emergence of sigh rhythmogenesis in the embryonic mouse. *J. Physiol.*, 592(10):2169-2181, 2014.
- Cherniack, N.S., von Euler C., Glogowska, M., Homma I.: Characteristics and rate of occurrence of spontaneous and provoked augmented breaths in cats and rabbits. *Acta Physiol. Scand.*, 16: 349-360, 1981.
- Cohen, G., Henderson-Smart, D.J.: The characteristics and frequency of augmented breaths during CO₂-induced hyperpnoea of newborn infants. *J. Physiol.*, 490(Pt 2):551-557, 1996.
- da Silva, A.C.L., de Matos, N.A., de Souza, A.B.F., Castro, T.F., Cândido, L.D.S., Oliveira MADGS et al.: Sigh maneuver protects healthy lungs during mechanical ventilation in adult Wistar rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245(15):1404-1413, 2020.
- Davies, A., Roumy, M.: The inspiratory augmenting effect of lung irritant receptor activity. *J. Physiol.*, 275, 14-16, 1978.
- Glogowska, M., Richardson P.S., Widdicombe J.G., Winning, A.J.: The role of the vagus nerves, peripheral chemoreceptors and other afferent pathways in the genesis of augmented breaths in cats and rabbits. *Respir. Physiol.*, 16, 179-196, 1972.
- Golder, F.J., Davenport, P.W., Johnson RD, Reier PJ, Bolser D.C.: Augmented breath phase volume and timing relationships in the anesthetized rat. *Neurosci Lett*, 373(2):89-93, 2005.
- Jost, K., Latzin, P., Fouzas, S., Proietti, E., Delgado-Eckert, E.W., Frey, U., Schulzke, S.M.: Sigh-induced changes of breathing pattern in preterm infants. *Physiol. Rep.*, (11):e12613, 2015.
- Katagiri, H., Katagiri, M., Kieser, T.M., Easton, PA.: Diaphragm function during sighs in awake dogs after laparotomy. *Appl Physiol*. 83(5):1588-1594, 1997.
- Li, P., Janczewski, W.A., Yackle, K., Kam, K., Pagliardini, S., Krasnow, M.A., Feldman, J.L.: The peptidergic control circuit for sighing. *Nature*. 530(7590):293-297, 2016.
- Lieske, S.P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., Ramirez, J.M.: Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [seecomment]. *Nature neuroscience*, 3(6):600-607, 2000.
- Perez-Padilla, R., West, P., Kryger, M.H.: Sighs during sleep in adult humans. *Sleep*, 6(3):234-43, 1983.
- Qureshi, M., Khalil, M., Kwiatkowski, K., Alvaro, R.E.: Morphology of sighs and their role in the control of breathing in pre-term infants, term infants and adults. *Neonatology*. 96(1):43-49, 2009.
- Ramirez, J.M.: The integrative role of the sigh in psychology, physiology, pathology, and neurobiology. *Prog. Brain Res.*, 209: 91-129, 2014.
- Ramirez, J.M., Schwarzacher, S. W., Pierrefiche, O., Olivera, B. M., Richter, D. W.: Selective lesioning of the cat pre-Botzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *J. Physiol.*, 507, 895-907, 1998.
- Ramirez, J.M., Vlemmincx, E., Baertsch, N.A., Severs, L.J.: The sigh and related behaviors. *Handb. Clin Neurol.*, 188:357-372, 2022.
- Reynolds, L.B.: Characteristic of an inspiration augmenting reflex in anaesthetized cats. *J. Appl. Physiol.*, 17, 638-688, 1962.
- Romaniuk, J.R., Be, W.K.M., Karczewski, W.A., Malinowska, M.: Augmented breath provoked by lung inflation in cat. *Acta Neurol. Exp.*, 49, 2-3, 1989.
- Severs, L.J., Vlemmincx, E., Ramirez, J.M.: The psychophysiology of the sigh: I: The sigh from the physiological perspective. *Biol. Psychol.*, 170: 108313, 2022.
- St. John, W.M., Bledsoe, T.A., Sokol, H.W.: Identification of medullary loci critical for neurogenesis of gasping. *J. Appl. Physiol.*, 56(4), s. 1008-1019, 1984.
- Szereda-Przestaszewska M., Bartlett D. Jr., Wise J.C.H.: Changes in respiratory frequency and end-expiratory volume accompanying augmented breaths in cats. *Pflugers Arch.*, 346: 29-33, 1976.
- Takeda, M., Matsumoto, S.: Discharge patterns of dorsal and ventral respiratory group neurons during spontaneous augmented breaths observed in pentobarbital anaesthetized rats. *Brain Res.*, 749(1):95-100, 1997.
- Takeda, M., Matsumoto, S.: Medullary post-inspiratory neuronal and diaphragm post-inspiratory activities during spontaneous augmented breaths in anaesthetized rats. *Brain Res.*, 758(1-2): 218-222, 1997.
- Thach, B.T., Lijowska, A.: Arousals in infants. *Neuroscience* 80(3):811-819, 1997.
- Thoby-Brisson, M.: Neural mechanisms for sigh generation during prenatal development. *J. Neurophysiol.*, 120(3):1162-1172, 2018.
- Toporikova, N., Chevalier, M., Thoby-Brisson, M.: Sigh and Eupnea Rhythmogenesis Involve Distinct Interconnected Subpopulations: A Combined Computational and Experimental Study. *eNeuro*. 2(2):ENEURO.0074-14, 2015.
- Van Lunteren, E., Haxiu, M.A., Goldman, D., Cherniack, N.S.: Costal and crural diaphragm and intercostal muscle activity during augmented breaths in cats. *Neurosci. Lett.*, 56, s. 283-288, 1985.
- Van Lunteren, E., Prabhakar, N.R., Cherniack, N.S., Haxiu, M.S., Dick, T.E.: Inhibition of expiratory muscle EMG and motor unit activity during augmented breaths in cats. *Respir. Physiol.*, 72, s. 303-314, 1988.
- Yamashiro, S.M., Iyer, N.P.: Infant periodic breathing and apneic threshold. *Physiol Rep*. Jan;12(2):e15915, 2024.

Pilotná štúdia proteómu CD4+ T-lymfocytov u pacientov s triple negatívnym karcinómom prsníka s využitím hmotnostnej spektrometrie

Michal Marcin¹, Miroslav Marcin², Mária Kacírová¹, Martin Menkyna², Michaela Šulíková¹, Soňa Tkáčiková¹, Peter Bober¹, Michal Alexovič², Dávid Tóth³, Marek Lenárt⁴, Dominik Šafčák⁵, Ján Sabo^{2*}

¹Medipark, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ²Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice,

³Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, ⁴I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice,

⁵Klinika rádioterapie a onkológie UPJŠ LF a VOÚ a. s., Košice, *korešp. autor

V tejto práci bolo u pacientov s triple negatívnym karcinómom prsníka (TNBC) a kontrolnej skupiny identifikovaných 778 proteínov, pričom 23 z nich vykazovalo signifikantné rozdiely medzi porovnávanými skupinami. Niektoré z týchto proteínov, ako napríklad DJ-1, APE1 a Septín-9, boli významne down-regulované u pacientok s TNBC. Tieto zistenia poskytujú nové informácie o imunitnej odpovedi CD4 T-lymfocytov na prítomnosť TNBC v tele pacientok a naznačujú ich potenciál slúžiť ako biomarkery pri diagnostike a prognóze tohto ochorenia. Na detailnejšie určenie proteómu CD4 lymfocytov a validáciu týchto výsledkov je potrebný ďalší výskum a taktiež porovnanie s ďalšími analytickými metódami.

Kľúčové slová: TNBC, CD4 T-lymfocyty, proteomika, signálne dráhy

Keywords: TNBC, CD4 T-lymphocytes, proteomics, signal pathways

Úvod

Triple negatívny karcinóm prsníka (Triple-negative breast cancer (TNBC)) je agresívny podtyp rakoviny prsníka, ktorému chýba expresia estrogénového receptora (ER), progesterónového receptora (PR) a receptora ľudského epidermálneho rastového faktora 2 (HER2), a preto nereaguje na hormonálnu a na anti HER-2 liečbu. Zhruba 70 % karcinómov prsníka vyvíjajúcich sa u nosičov mutácie BRCA1 a 23 % karcinómov prsníka u nosičov BRCA2 vykazuje trojitý negatívny fenotyp. TNBC predstavuje 10–20 % invazívnych karcinómov prsníka [32] a zahŕňa 4 tumor špecifické podtypy (basal-like1 (BL1), basal-like2 (BL2), mesenchymal stem-like (MSL) a luminal androgen receptor (LAR)) [22]. Nádory TNBC sú charakteristické agresívnym správaním s tendenciou k skorému relapsu a metastatickému šíreniu do pľúc, pečene a centrálného nervového systému, ako aj k horšiemu prežívaniu. Pri diagnóze sa u pacientok zvyčajne vyskytujú klinicky pozitívne axilárne lymfatické uzliny, väčšia veľkosť primárneho nádoru, nižší Nottinghamský prognostický index, vypočítaný pomocou patologických kritérií a použitý na určenie prognózy po operácii rakoviny prsníka [10]. Nádorová heterogenita TNBC bola široko označená za dôvod rôznych klinických výsledkov s rôznymi mierami odozvy buď na tradičnú liečbu alebo na nové ciele terapie, čo často viedlo k rozdielnym časom prežívania [3,34].

Mononukleárne bunky periférnej krvi (peripheral blood mononuclear cells (PBMC)) pozostávajú prevažne z lymfocytov (70–90 %), ako sú T-lymfocyty CD4 (helper T-lymfocyty) a CD8 (cytotoxické T-lymfocyty) [20]. Lymfocyty predstavujú hlavné typy leukocytov v bunkami

sprostredkovanej imunity a hrajú ústrednú úlohu v imunitných odpovediach súvisiacich s nádormi [5, 33]. Niekoľko štúdií uvádza zmeny v expresii CD4 a CD8 T-lymfocytov a pomeru CD4/CD8 v periférnej krvi pacientov s rôznymi typmi karcinómov, poukazujúc na to, že napr. počty CD4 T-lymfocytov môžu predpovedať prognózu rastu karcinómu a mieru prežitia pacientov [36,43]. Periférne CD4 T-lymfocyty zohrávajú kľúčovú úlohu v bunkovej imunitnej odpovedi [40]. V kontexte TNBC môžu zmeny v proteóme CD4 T-lymfocytov odrážať imunitnú odpoveď voči nádoru a mohli by potenciálne byť využívané ako biomarkery na diagnostiku, prognózu alebo reakciu na liečbu [5].

V posledných rokoch sa v štúdiu karcinómov stala populárnou proteomika, štúdium celého súboru proteínov exprimovaných v bunke, tkanive alebo pacientovi [1,15]. Technológie využívané v proteomike umožnili identifikáciu potenciálnych biomarkerov a vzorcov expresie proteínov. Výsledky získané z takýchto štúdií je možné použiť na odhalenie molekulovej podstaty chorobných procesov, poskytovanie diagnostiky a prognózy chorôb [14,24,35,44]. Výsledky proteomických analýz pomohli odhaliť zmeny v signálnych dráhach a súčasne molekulové ciele pre vývoj liekov na liečbu karcinómov [6,28,31,38]. Spríchodom technológie analýzy proteínov založenej na hmotnostnej spektrometrii (MS) sa rozšírila analýza proteínov stala široko používanou [4,8,27]. Kvapalinová chromatografia/hmotnostná spektrometria (LC/MS) sú kľúčovými technológiami, ktorými sa získavajú spektrá peptidov s vysokým rozlíšením, čo umožňuje objavenie citlivých a špecifických biomarkerov spojených s karcinómami [2].

V tejto štúdii sme pomocou LC/MS spektrometrie kvantifikovali proteíny vo vzorkách TNBC pacientok a kontrolných vzorkách zdravých subjektov s cieľom porovnať a analyzovať kvalitatívne a kvantitatívne rozdiely v proteóme CD4 T-lymfocytov medzi týmito skupinami, čo môže prispieť k poznaniu priebehu imunologickej odpovede CD4 T-lymfocytov na TNBC a viesť k zlepšeniu skorej diagnózy a prognózy tohto ochorenia.

Metódy

Použité boli vzorky periférnej krvi od novo diagnostikovaných pacientok s rakovinou prsníka (TNBC) pred akoukoľvek terapiou kvôli minimalizácii terapiou vyvolaných proteomických zmien u pacientov. Štúdia bola vedená v zhode s Helsinskou deklaráciou a bola schválená Etickou komisiou LF UPJŠ v Košiciach, protokol kód 9N/2021, dátum schválenia 17. 6. 2021, Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura 2020/EK/06047, dátum schválenia 25. 6. 2020, a Etickou komisiou Východoslovenského onkologického ústavu a.s., protokol kód EK/1/06/2020, dátum schválenia 1. 6. 2020. Od subjektov v kontrolnej skupine, ako aj v skupine s rakovinou prsníka bol získaný informovaný súhlas (2020/EK/06407) v písomnej forme. Randomizované vzorky periférnej krvi z kontrolnej skupiny (N = 10) boli získané z Gynekologicko-pôrodníckej kliniky LF UPJŠ a UNLP v Košiciach, vzorky s TNBC (N=3) boli odobraté na I. chirurgickej klinike LF UPJŠ a UNLP v Košiciach.

Experimentálny protokol. Pacientom bolo odobraných 10 ml krvi. Následne bola krv zriedená 20 ml izolačného roztoku (2 mmol EDTA+PBS+BSA) a centrifugovaná pri 600 x g počas 10 min pri 4 °C. Po centrifugácii sme odstránili vrchnú časť plazmy, tak aby vrstva buniek PBMC a erytrocytov ostala neporušená. Do tejto dvojvrstvy sa postupne pridávali magnetické guľičky s CD4 znakom (Invitrogen Dynabeads, Thermo Fisher Scientific) za účelom separácie leukocytov. Po pridaní CD4 guľičiek do skúmavky so zriedenou krvou došlo k inkubácii po dobu 20 min pri 4 °C v Hulamixéri. Po inkubácii boli magnetické guľičky spolu s bunkami s CD znakom odseparované magnetom v magnetickom stojane. Supernatant bol odstránený pipetou. Magnetické guľičky s naviazaným CD znakom boli 3 krát premývané izolačným roztokom. Po ukončení premývania buniek bolo k magnetickým guľičkám pridaných 400 µl 50 mM NH₄HCO₃. Vzorky boli následne sonifikované a vortexované v striedavom cykle. Sonifikovalo sa v ultrazvukovej vani (f= 37 kHz, t = 15 min) a ultrazvukovom bloku (y= 85 %, t= 15 min), vzorky boli vortexované 5 min v chladničke. Následne boli magnetické guľičky odseparované. K 200µl vzorky bolo pridaných 1800 µl etanolu, vzorky sa následne nechali vyžrážať počas noci pri -20 °C. Počas druhého dňa spracovania boli vzorky centrifugované počas 20 min pri 18 000 g a 4 °C, po centrifugácii bol odstránený supernatant a vzniknutý pelet bol vysušený. Do vysušeného peletu bolo pridaných 150 µl 50 mM NH₄HCO₃. V ďalšom kroku boli stanovené

koncentrácie vo vzorkách s jednotlivými CD znakmi pomocou BCA metódy. Pri in-solution digestii boli k vzorkám pridané požadované objemy 0,025 M roztoku DTT a boli inkubované v termomixéri pri 60 °C po dobu 30 minút. K vzorkám boli pridané výpočtom stanovené objemy 0,25 M roztoku IAA a boli inkubované v termomixéri v tme, pri 21 °C po dobu 30 minút. Napokon boli pridané vypočítané objemy 5mM roztoku CaCl₂ a bol trypsinu v pomere – trypsin : vzorka = 1 : 40 (w/w). Vzorky boli inkubované počas noci pri 21 °C. Nasledujúci deň boli vzorky okyslené na pH = 2 až 3 pridaním 20 % kyseliny mravčej. Vzorky boli upravené na požadované objemy buď odparovaním v SpeedVacu alebo pridaním loading roztoku, následne boli centrifugované (20 min., 18 000 xg, 4 °C) a merané pomocou metódy LC-MS na hmotnostnom spektrometri - iónová pasca (Amazon speed ETD, Bruker Daltonics). Pre LC/MS analýzu sme použili UHPLC systém (Ultimate 3000 RSLC Nano, Thermo Fisher Scientific) a hmotnostnú spektrometrickú iónovú pascu (amazon speed ETD s iónovým zdrojom CaptiveSpray, Bruker Daltonik). Pri príprave vzorky pre analýzu kvapalinovej chromatografie sa použila metóda zachytávania a eluovania. 1 µg peptidov z izolovaných lymfocytov (5 µl vzorky s koncentráciou 0,2 µg/µl) bol nanesený a zachytený na zachytávacej kolóne Acclaim® PepMap C18 (100 µm x 2 cm, veľkosť častíc 5 µm, veľkosť pórov 100 Å) pred elúciou a separáciou v analytickej kolóne PepMap RSLC C18 pre ďalšiu analýzu (75 µm x 30 cm, veľkosť častíc 3 µm, veľkosť pórov 100 Å). Ako nánášací roztok sa použila 98 % voda a 2 % acetonitril s 0,1 % kyselinou mravčou. Prietok pri nánášaní vzorky bol 8 µl/min. Elučný proces zahŕňal použitie dvoch mobilných fáz s rôznym zložením: mobilná fáza A pozostávala z 90 % vody a 10 % acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravčou, zatiaľ čo mobilná fáza B pozostávala z 95 % acetonitrilu a 5 % vody s 0,1 % kyselinou mravčou. Elučný gradient začínal pomerom 96 % A a 4 % B počas prvých 5 minút. Počas nasledujúcich 90 minút sa pomer mobilnej fázy B postupne lineárnym spôsobom zvyšoval zo 4 % na 35 %. Následne sa uskutočnilo 10-minútové premývanie kolóny použitím 90 % B, nasledované 15-minútovou reekvilibráciou kolóny so 4 % B. Počas celého elučného gradientu sa prietok udržiaval na 0,3 µl/min. Analýza hmotnostnou spektrometriou s použitím elektrosprejovej ionizácie (ESI) sa uskutočnila na eluovaných peptidoch. Parametre MS skenovania použité v experimente boli nasledovné: bol zvolený kladný iónový mód so skenmi so zvýšeným rozlíšením a kontrolou iónového náboja (ICC) nastavenou na 400 000. Maximálny čas akumulácie bol 50 ms a analyzovaný rozsah m/z sa pohyboval od 300 do 1300. Okrem toho boli nastavenia parametrov skenovania MS/MS nastavené na nasledujúce hodnoty: režim s vysokým rozlíšením, cieľový ICC nastavený na 500 000, maximálny čas akumulácie 100 ms a šírkou izolácie 2,2 m/z. Identifikácia proteínov sa uskutočnila použitím vyhľadávacieho algoritmu Mascot (Matrix Science, verzia 2.4.0) spolu s databázou SwissProt (verzia 2020_02). Kritériá vyhľadávania boli nasledovné: taxonómia bola obmedzená na *Homo*

sapiens (človek), trypsin bol použitý ako enzým, karbamidometylácia cysteínu (C) bola nastavená ako fixná modifikácia a oxidácia metionínu (M) bola povolená ako premenná modifikácia. Boli povolené až dve chybné štiepenia a do úvahy sa brali len peptidy s nabitými stavmi +2 a +3 a s minimálnou dĺžkou 3.

Štatistické metódy. Technické triplikáty uložené ako dátové súbory Mascot boli spracované softvérom Proline (Proline Studio 2.0.1, <http://proline.profi-proteomics.fr/>). Pre zhody peptidového spektra sa vyžadovalo minimálne skóre 20 a p-hodnota 0,05. Na vyhodnotenie proteínov sme použili prah „false discovery rate“ (FDR) $\leq 1\%$ a vyžadovali sa aspoň dva jedinečné peptidy. Pre výpočet vážených spektrálnych počtov pre každý proteín bol použitý softvér Abacus.

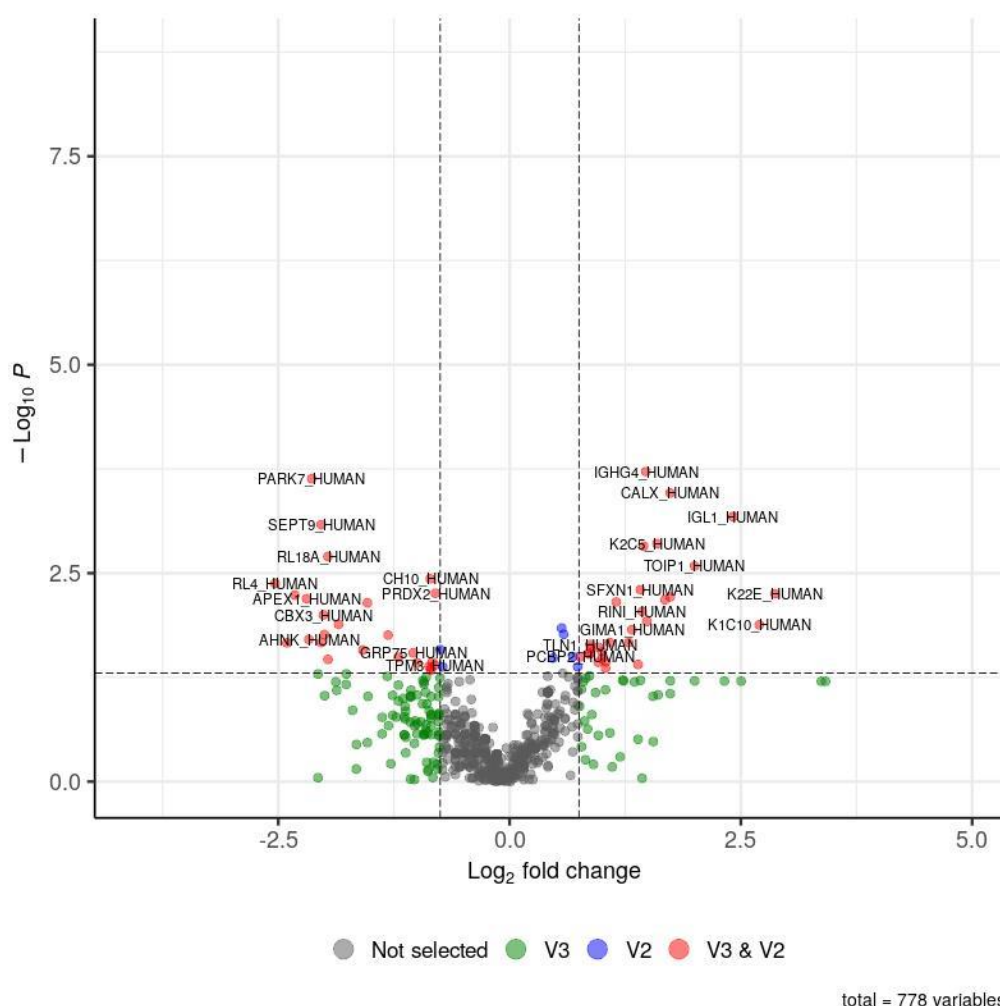
Enrichment analýza génovej sady (GSEA) sa uskutočnila pomocou GSEA v. 4.2.3 (Broad Institute, Cambridge, USA, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/>) v databáze génových

sád (http://broadinstitute.org://pub/gsea/gene_sets/c2.cp.kegg.v2023.1.Hs.symbols.gmt) pre počet permutácií - 1000 a typ permutácie „phenotype and gene set“.

Uskutočnená bola kvantifikačná analýza proteínov CD4+ T-lymfocytov v kontrolnej skupine a TNBC skupine. Na vyhodnotenie beta-binomického testu sa použili vážené spektrálne počty a na výpočet p-hodnoty pre každú sadu proteínov sa použil balík BetaBinomial 1.2 R softvéru Proline Studio. Na identifikáciu signifikantne ovplyvnených dráh sa pomocou GSEA určili kritériá FDR < 0,25 a nominálna hodnota $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

Na základe peptidového spektra skúmaných vzoriek krvi bolo identifikovaných 778 proteínov, z toho 23 proteínov bolo z hľadiska vážených spektrálnych počtov signifikantne odlišných medzi pacientmi TNBC a kontrolnou skupinou (Obr. 1, Tab. 1).



Obrázok 1 Kvantifikačná analýza proteómu CD4 T-lymfocytov. Volcano plot s kódmi signifikantne odlišných proteínov medzi porovnávanými skupinami (Pre popisy proteínov pozri Tab. 1)

Medzi kvantitatívne rozdielnymi proteínmi u porovnávaných skupín boli zaznamenané proteíny ako napríklad proteín 7 Parkinsonovej choroby alebo „DJ-1“ (proteín

deglykáza), ktorý je pozitívny regulátor androgénovej signálnej dráhy, ako aj bunkového rastu a transformácie, napríklad prostredníctvom modulácie signálnej dráhy NF-

κB (Nuclear Factor-κB) [9,18,26, 29,37,39], a hrá úlohu pri prežívaní buniek, proliferácii, diferenciácii, imunitných a zápalových reakciách. Podporuje prežitie buniek indukciou transkripcie antiapoptotických génov. Ochranná úloha NF-κB je ukázaná vo veľkom množstve typov buniek, vrátane ľudského karcinómu prsníka [23] a T buniek [21]. Podľa

našich experimentálnych výsledkov sme zaznamenali signifikantnú down-reguláciu DJ-1 u TNBC pacientov. Zhang a kol. [45] poukázali na to, že DJ-1 je negatívny regulátor migrácie a aktivácie CD4 T-lymfocytov. CD4 T-lymfocyty s deficitom DJ-1 majú väčší potenciál diferencovať sa na prozápalové fenotypy Th1 a Th17 [17].

Kód proteínu	Popis	Binomial p Hodnota	log Pomer
RL4_HUMAN	60S ribozomálny proteín	0.0042	-2.5361
PSA5_HUMAN	Proteazómová podjednotka alfa typ-5	0.0217	-2.406
TEBP_HUMAN	Prostaglandín E syntáza 3	0.0058	-2.3219
APEX1_HUMAN	DNA (apurín alebo apyrimidín) endonukleáza	0.0064	-2.1938
AHNAK_HUMAN	Proteín spojený s diferenciáciou neuroblastov AHNAK	0.0197	-2.1699
PARK7_HUMAN	Proteín Parkinsonovej choroby 7	2.32E-04	-2.1375
SEPT9_HUMAN	Septín 9	8.30E-04	-2.0356
EFHD2_HUMAN	Proteín D2 obsahujúci EF- doménu	0.0215	-2.0356
CBX3_HUMAN	Chromobox proteínový homológ 3	0.01	-2.012
RS25_HUMAN	40S ribozomálny proteín S25	0.0172	-2
RL18A_HUMAN	60S ribozomálny proteín L18a	0.002	-1.9635
RS5_HUMAN	40S ribozomálny proteín S5	0.0343	-1.9635
SYSC_HUMAN	Serín-tRNA ligáza, cytoplazmatická	0.013	-1.848
ODO2_HUMAN	Dihydrolipoyllyzín-zvyšok sukcinyltransferázy zložka komplexu 2-oxoglutarát-dehydrogenázy, mitochondriálna	0.0264	-1.585
FUBP1_HUMAN	Far upstream element-binding proteín 1	0.0072	-1.5361
K2C5_HUMAN	Keratín, cytoskeletálny typ II 5	0.0014	1.5938
TM109_HUMAN	Transmembránový proteín	0.0066	1.6804
CALX_HUMAN	Kalnexín	3.46E-04	1.737
LV743_HUMAN	Imunoglobulín lambda,variant 7-43	0.0061	1.737
TOIP1_HUMAN	Torsín-1A-interagujúci proteín	0.0026	2
IGL1_HUMAN	Imunoglobulínový ľahký reťazec lambda-1	6.63E-04	2.415
K1C10_HUMAN	Keratín, cytoskeletálny typ I 10	0.0132	2.6977
K22E_HUMAN	Keratín, cytoskeletálny typ II 2	0.0056	2.8686

Tabuľka 1 Kvantifikačná analýza proteómu CD4 T-lymfocytov. Kvantitatívne signifikantne odlišné proteíny medzi kontrolnou a TNBC skupinou.

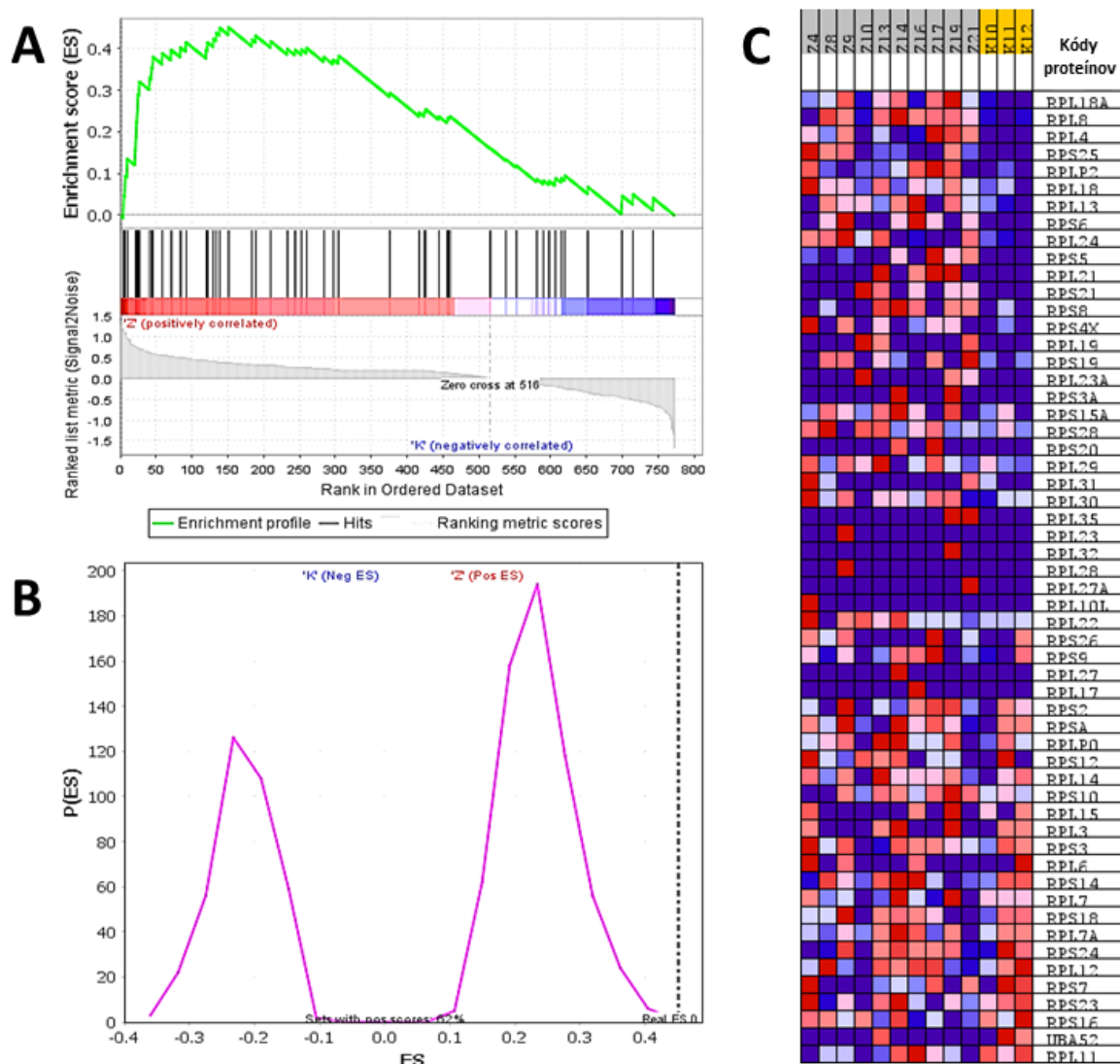
Signálna dráha	p hodnota	FDR q hodnota
down-regulované u pacientov TNBC		
REACTOME_RRNA_PROCESSING	<0,01	0.006
REACTOME_METABOLISM_OF_RNA	<0,01	0.023
REACTOME_SELENOAMINO_ACID_METABOLISM	<0,01	0.018
REACTOME_RESPONSE_OF_EIF2AK4_GCN2_TO_AMINO_ACID_DEFICIENCY	0.002	0.018
REACTOME_NONSENSE_MEDIATED_DECAY_NMD	<0,01	0.019
REACTOME_SRP_DEPENDENT_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	0.002	0.016
REACTOME_CELLULAR_RESPONSE_TO_STARVATION	0.002	0.018
REACTOME_CELLULAR_RESPONSES_TO_STIMULI	<0,01	0.018
REACTOME_EUKARYOTIC_TRANSLATION_ELONGATION	<0,01	0.02
up-regulované u pacientov TNBC		
REACTOME_CELL_CELL_COMMUNICATION	<0,01	0.089

Tabuľka 2 Enrichment analýza. Zoznam signifikantne ovplyvnených signálnych dráh u pacientov TNBC.

Ďalej, proteín DNA-(apurín/apyrimidín) endonukleáza (APE1), ktorý bol v tejto štúdií signifikantne down-regulovaný u pacientov TNBC, pôsobí ako redox-dependentný regulátor niekoľkých transkripčných faktorov, vrátane NF- κ B, AP-1, HIF-1 α a STAT3. Kvôli týmto funkciám je APE1 životne dôležitým proteínom pre reguláciu bunkovej signalizácie, starnutia a zápalových dráh. Taktiež reguluje expresiu cytokínov a chemokínov ako je napr. TNF α . Okrem toho sa zúčastňuje aj na aktívnej demetylácii chromatinu. Viacnásobné funkcie APE1 z neho robia nevyhnutný regulátor patogenézy niekoľkých chorôb, vrátane karcinómov a neurologických porúch [30].

Septín-9 bol primárne študovaný ako biomarker pre rôzne druhy rakoviny, vrátane karcinómu prsníka. Septíny sú rodinou proteínov viažucich GTP zapojených do rôznych bunkových procesov, vrátane cytokinézy a prestavby membrány. Z pohľadu zapojenia septínov do regulácie aktomyozínu a mikrotubulárnych systémov sa septíny podieľajú na obvodovom zúžení aktomyozínového

kontrakčného kruhu, čo sa považuje za možné mechanické prepojenie s améboidným spôsobom migrácie T lymfocytov [13,41]. Tieto údaje naznačujú, že septíny ladia aktomyozínové sily počas motility a pravdepodobne regulujú pohyb lymfocytov v uzavretých tkanivách [41]. V tejto štúdií bol septín-9 signifikantne down-regulovaný u pacientov TNBC. Akútna inhibícia septínov spôsobuje náhlu stratu améboidnej organizácie migrujúcich CD4 T-lymfocytov, t.j. stratu bunkovej segmentácie, stratu septín-a F-aktínových hustých kortikálnych/obvodových prstencov a reorganizáciu tvaru buniek s tvorbou viacerých radiálnych lineárnych predĺžených výbežkov [47]. Následkom je donedávna nepoznané obmedzenie migrácie cez malé póry. Bez dostatku septínu 9 sa však pohyby buniek stávajú dezorganizované a menej efektívne. To by mohlo mať dôsledky na schopnosť T-lymfocytov prechádzať tkanivami a interagovať s inými bunkami, ako sú antigén prezentujúce bunky, počas imunitných reakcií na TNBC [41].



Obrázok 2 Signifikantne ovplyvnená signálna dráha „Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency“. (A) Enrichment plot; (B) Distribúcia indexu náhodného skóre obohatenia (ES); (C) Heat mapa (Z- kontrolná skupina , K- TNBC skupina)

Kalnexín je chaperónový proteín endoplazmatického retikula, inhibuje proliferáciu CD4 a CD8 T-lymfocytov izolovaných z krvi pacientov s OSCC (orálny spinocelulárny karcinóm) a inhibuje sekréciu IFN γ , TNF α a IL2 z týchto buniek [7]. Chen a kol. [7] zaznamenali významne up-regulovaný Kalnexín pri OSCC. Up-regulácia jeho membránovej expzie v bunkách OSCC je spojená s inhibovanou infiltráciou T-buniek v nádorových tkanivách a koreluje so zlým prežitím pacientov s OSCC. Up-regulácia kalnexínu bola zaznamenaná aj v tejto štúdii. Avšak, celkovo úloha kalnexínu v CD4 T-lymfocytoch počas rakoviny nie je dostatočne preskúmaná. Tieto poznatky naznačujú, že kalnexín môže mať komplexnú úlohu v imunitnom systéme a vývoji karcinómu, čo otvára zaujímavé perspektívy pre ďalší výskum a potenciálne terapeutické zásahy.

Analýza obohatenia s využitím GSEA softvéru pri porovnaní TNBC pacientov a kontrolnej skupiny ukázala niekoľko signifikantne ovplyvnených signálnych dráh (Tab. 2). Napr. dráha „Response of EIF2AK4 to amino acid deficiency“ (Obr. 2), ktorá bola down-regulovaná u TNBC skupiny, zahŕňa aktiváciu EIF2AK4 (tiež známeho ako GCN2) v reakcii na nedostatok aminokyselín. EIF2AK4 je proteínkináza, ktorá fosforyluje alfa podjednotku eukaryotického iniciačného faktora 2 (eIF2 α) [46], čo vedie k inhibícii všeobecnej syntézy proteínov pri podpore translácie špecifických mRNA, vrátane aktivačného transkripčného faktora 4 (ATF4), ktorý je up-regulovaný počas nedostatku aminokyselín a indukuje expresiu génov zapojených do transportu aminokyselín, biosyntézy a metabolismu [16, 42]. To pomáha obnoviť homeostázu aminokyselín a podporuje prežitie buniek. T-lymfocyty sú vysoko citlivé na zmeny v dostupnosti aminokyselín, pretože pre svoju aktiváciu, proliferáciu a efektorové funkcie vyžadujú ich adekvátne hladiny. Aminokyseliny teda neslúžia len ako stavebné bloky pre proteíny, ale tiež hrajú rozhodujúcu úlohu ako signálne molekuly pri aktivácii a diferenciacii T buniek [19].

Výsledky tejto štúdie priniesli nové detaily pri pohľade do proteómu CD4 T-lymfocytov u pacientov TNBC, čo môže prispieť k lepšiemu poznaniu potenciálu využitia CD4 T-lymfocytov ako biomarkerov pri diagnóze TNBC. Na určenie špecifických proteomických zmien v CD4 T-lymfocytoch periférnej krvi, ktoré sú spojené s trojnásobne negatívnym karcinómom prsníka, a na vyhodnotenie ich klinickej užitočnosti je však potrebný ďalší výskum a kombinovanie s ďalšími diagnostickými metódami. S cieľom lepšieho pokrytia signálnych dráh a zaznamenania väčšieho počtu identifikácií, je v ďalších štúdiách potrebné realizovať spektrálnu analýzu pomocou citlivejších spektrometrov vybavených tzv. orbitrapom- hmotnostným analyzátorom iónovej pasce, ktoré sa vyznačujú výrazne lepšimi vlastnosťami z hľadiska napr. rozlíšenia, rýchlosti merania a dynamického rozsahu ako samotná iónová pasca [25].

Summary

In this paper, using LC/MS spectrometry, we quantified and compared CD4 T-lymphocyte proteoms in patients with triple negative breast cancer (TNBC) and control group. 778 proteins were identified, 23 of which showed significant differences between compared groups. Some of these proteins, such as DJ-1, APE1 and Septin-9, were significantly down-regulated in patients with TNBC. These findings provide new information about the CD4 T-lymphocyte immune response to TNBC and indicate their potential to serve as biomarkers in the diagnosis and prognosis of the disease. For a more detailed determination of the proteome of CD4 T-lymphocytes and validation of these results, further research is needed, as well as combining with other analytical methods.

Tento výskum bol financovaný Agentúrou na podporu výskumu a vývoja APVV-19-0476.

Literatúra

- Altelaar, A.F., Munoz, J., Heck, A.J.: Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat. Rev. Genet.*, 14, 2013, s. 35-48.
- Angel, T.E., Aryal, U.K., Hengel, S.M., Baker, E.S., Kelly, R.T., Robinson, E.W., et al.: Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2012, s. 3912-28.
- Burstein, M.D., Tsimelzon, A., Poage, G.M., Covington, K.R., Contreras, A., Fuqua, S.A., et al.: Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer. Res.*, 21 (7), 2015, s. 1688-98.
- Callesen, A.K., Vach, W., Jorgensen, P.E., Cold, S., Tan, Q., Depont Christensen, R., et al.: Combined experimental and statistical strategy for mass spectrometry based serum protein profiling for diagnosis of breast cancer: a case-control study. *J. Proteome Res.*, 7, 2008, s. 1419-26.
- Chang, C.M., Wu, C.L., Lu, Y.T.: Cancer-associated immune deficiency: a form of accelerated immunosenescence? *Topics in cancer survivorship*, 2012, s. 95-108.
- Chang, L., Ni, J., Beretov, J., Wasinger, V.C., Hao, J., Bucci, J., et al.: Identification of protein biomarkers and signaling pathways associated with prostate cancer radioresistance using label-free LC-MS/MS proteomic approach. *Sci. Rep.*, 7, 2017, s. 41834.
- Chen, Y., Ma, D., Wang, X., Fang, J., Liu, X., Song, J., et al.: Calnexin impairs the antitumor immunity of CD4+ and CD8+ T cells. *Cancer Immunology Research*, 7(1), 2019, s. 123-135.
- Chu, C.S., Miller, C.A., Gieschen, A., Fischer, S.M.: Pathway-informed discovery and targeted proteomic workflows using mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.*, 1550, 2017, s. 199-221.
- Clements, C.M., McNally, R.S., Conti, B.J., Mak, T.W., Ting, J.P.: DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 10, 103 (41), 2006, s. 15091-6.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., et al.: Triple-negative breast cancer: clinical

- features and patterns of recurrence. Clin. Cancer Res., 13 (15), 2007, s. 4429-4434.
11. Ellis, M.J., Gillette, M., Carr, S.A., Paulovich, A.G., Smith, R.D., Rodland, K.K., et al.: Connecting genomic alterations to cancer biology with proteomics: the NCI Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium. Cancer discovery, 3 (10), 2013, s. 1108-1112.
12. Faria, S.S., Morris, C.F., Silva, A.R., Fonseca, M.P., Forget, P., Castro, M.S., et al.: A timely shift from shotgun to targeted proteomics and how it can be groundbreaking for cancer research. Front. Oncol., 7, 2017, s. 13.
13. Gilden, J.K., Peck, S., Chen, Y.C., Krummel, M.F.: The septin cytoskeleton facilitates membrane retraction during motility and blebbing. J. Cell. Biol., 9, 196 (1), 2012, s. 103-14.
14. Goeminne, L.J.E., Gevaert, K., Clement, L.: Experimental design and data-analysis in label-free quantitative LC/MS proteomics: a tutorial with MSqRob. J. Proteomics., 171, 2018, s. 23-36.
15. Graves, P.R., Haystead, T.A.: Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66, 2002, s. 39- 63.
16. Hinnebusch, A.G., Ivanov, I.P., Sonenberg, N.: Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Science, 352 (6292), 2016, s. 1413-1416.
17. Jung, S.H., Won, K.J., Lee, K.P., Lee, D.H., Yu, S., Lee, D.Y., et al.: DJ-1 protein regulates CD3+ T cell migration via overexpression of CXCR4 receptor. Atherosclerosis. 235, 2014, s. 503-9.
18. Junn, E., Jang, W.H., Zhao, X., Jeong, B.S., Mouradian, M.M.: Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. J. Neurosci. Res., 87 (1), 2009, s. 123-9.
19. Kelly, B., Pearce, E.L.: Amino assets: how amino acids support immunity. Cell metab., 32 (2), 2020, 154-175.
20. Kleiveland, C.R.: Peripheral Blood Mononuclear Cells. The Impact of Food Bioactives on Health- Springer International Publishing, 2015, s. 161-167.
21. Khoshnan, A., Tindell, C., Laux, I., Bae, D., Bennett, B., Nel, A.E.: The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. J. Immunol., 165, 2000, s. 1743-1754.
22. Lehmann, B.D., Jovanović, B., Chen, X.I., Estrada, M.V., Johnson, K.N., Shyr, Y., Moses, H.L., Sanders, M.E., Pietenpol, J.A.: Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. PloS one, 11 (6), 2016, s. e0157368.
23. Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., Karin, M.: Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell, 87, 1996, s. 565-576.
24. Lv, L.X., Yan, R., Shi, H.Y., Shi, D., Fang, D.Q., Jiang, H.Y., et al.: Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the bile stress response in probiotic *Lactobacillus salivarius* LI01. J. Proteomics., 150, 2017, s. 216-29.
25. Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., et al.: Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. Analytical chemistry, 78 (7), 2006, s. 2113-2120.
26. McNally, R.S., Davis, B.K., Clements, C.M., Accavitti-Loper, M.A., Mak, T.W., Ting, J.P.: DJ-1 enhances cell survival through the binding of Cezanne, a negative regulator of NF-kappaB. J. Biol. Chem., 11, 286 (6), 2011, s. 4098-106.
27. Mezger, S.T.P., Mingels, A.M.A., Bekers, O., Cillero-Pastor, B., Heeren, R.M.A.: Trends in mass spectrometry imaging for cardiovascular diseases. Anal. Bioanal. Chem., 411, 2019, s. 3709-20.
28. Nanjundan, M., Byers, L.A., Carey, M.S., Siwak, D.R., Raso, M.G., Diao, L., et al.: Proteomic profiling identifies pathways dysregulated in nonsmall cell lung cancer and an inverse association of AMPK and adhesion pathways with recurrence. J. Thorac. Oncol., 5, 2010, s. 1894-904.
29. Niki, T., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M., Ariga, H.: DJBP: a novel DJ-1-binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ-1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex. Mol. Cancer Res., 1 (4), 2003, s. 247-61.
30. Oliveira, T.T., Coutinho, L.G., de Oliveira, L.O.A., Timoteo, A.R.D.S., Farias, G.C., Agnez-Lima, L.F.: APE1/Ref-1 role in inflammation and immune response. Front. Immunol., 13, 2022, s. 793096.
31. Posadas, E.M., Simpkins, F., Liotta, L.A., MacDonald, C., Kohn, E.C.: Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer-realistic hope? Ann. Oncol., 16, 2005, s. 16-22.
32. Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., et al.: Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 406, 2000, s. 747-752.
33. Perez-Diez, A., Joncker, N.T., Choi, K., Chan, W.F., Anderson, C.C., Lantz, O., et al.: CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 109 (12), 2007, s. 5346-5354.
34. Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., et al.: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. BCR, 12 (5), 2010, s. 1-18.
35. Prieto, P., Jaen, R.I., Calle, D., Gomez-Serrano, M., Nunez, E., Fernandez-Velasco, M., et al.: Interplay between post-translational cyclooxygenase-2 modifications and the metabolic and proteomic profile in a colorectal cancer cohort. World J. Gastroenterol., 25, 2019, s. 433-46.
36. Riemann, D., Cwikowski, M., Turzer, S., Giese, T., Grallert, M., Schütte, W., et al.: Blood immune cell biomarkers in lung cancer. Clin. Exp. Immunol., 195 (2), 2019, s. 179-189.
37. Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., Abeliovich, A.: DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. PLoS Biol., 2 (11), 2004, s. e362.
38. Shruthi, B.S., Vinodhkumar, P.: Proteomics: A new perspective for cancer. Adv. Biomed. Res., 5 (67), 2016.
39. Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M., Takahashi, K., Ariga, H.: DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. EMBO Rep., 5 (2), 2004, s. 213-8.
40. Tay, R.E., Richardson, E.K., Toh, H.C.: Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. Cancer Gene Ther., 28 (1-2), 2021, s. 5-17.
41. Tooley, A.J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W.S., Kinoshita, M., et al.: Amoeboid T-lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. Nat. Cell Biol., 11 (1), 2009, s. 17-26.
42. Vattam, K.M., Wek, R.C.: Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. PNAS, 101 (31), 2004, s. 11269-11274.
43. Wang, Y.Y., Zhou, N., Liu, H.S., Gong, X.L., Zhu, R., Li, X.Y., et al.: Circulating activated lymphocyte subsets as potential blood biomarkers of cancer progression. Cancer Medicine, 9 (14), 2020, s. 5086-5094.
44. Zaslavsky, B.Y., Uversky, V.N., Chait, A.: Solvent interaction analysis as a proteomic approach to structure-based biomarker discovery and clinical diagnostics. Expert. Rev. Proteomics., 13, 2016, s. 9-17.

45. Zhang, L., Wang, J., Wang, J., Yang, B., He, Q., Weng, Q.: Role of DJ-1 in immune and inflammatory diseases. *Front. Immunol.*, 11, 2020, s. 994.
46. Zhang, P., McGrath, B.C., Reinert, J., Olsen, D.S., Lei, L., Gill, S., et al.: The GCN2 eIF2 α kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *MCB*, 22 (19), 2002, s. 6681-6688.
47. Zhovmer, A.S., Manning, A., Smith, C., Vishweshwaraiah, Y.L., Wang, J., Sáez, P.J., et al.: Septin-Mediated Mechanobiological Reprogramming of T Cell Transmigration and 3D Motility. *bioRxiv*, 2022.

Niektoré aspekty molekulárnych mechanizmov Luminál A karcinómu prsníka: Proteomické zmeny CD8+ T-lymfocytov

Galina Laputková¹, Mária Kacírová², Martin Menkyna¹, Soňa Tkáčiková¹, Peter Bober¹, Ivan Talian¹,
Dávid Tóth³, Marek Lenárt⁴, Dominik Šafčák⁵, Ján Sabo^{1*}

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ²Medipark, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

³Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, ⁴I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice,

⁵Klinika rádioterapie a onkológie UPJŠ LF a VOÚ a. s., Košice, * korešp. autor

Cieľom štúdie bolo preskúmať niektoré pohľady na molekulárne mechanizmy a patogenézu luminálneho-A karcinómu prsníka (KP). Pre pochopenie úlohy CD8+ T-lymfocytov izolovaných z periférnej krvi pacientok s luminálnym-A KP bola vykonaná analýza proteómu pomocou LC-MS/MS v spojení s bioinformatickou analýzou exprese proteínov/génov s úmyslom nájsť centrálné proteíny, ktoré by mohli osvetliť prejavy a mechanizmus vzniku tohto ochorenia. Diferenciálne exprimované proteíny/gény (DEG) medzi skupinou pacientok s KP a kontrolnými vzorkami boli analyzované v sieti proteín-proteínových interakcií s pomocou modulov MCODE a ReactomeFI v Cytoscape.

Boli identifikované štyri klastre DEG: 1. RPL4, RPL13, RPL31, HMGN4, RPL5, RPS16, RACK1, RPL29; 2. APOA1, FGA, FGB, F2, SERPIND1; 3. DDX17, SFPQ, DHX15, EWSR1, FBLN1 a 4. H4C6, H3-4, H1-4. Signálne dráhy asociované s uvedenými skupinami DEG zahŕňajú predovšetkým dráhy: Signalizácia receptormi ROBO, Posttranslačná modifikácia proteínov, SUMOylácia a Bunkové reakcie na stres.

Napriek sľubným výsledkom dosiahnutým v tejto štúdii je nevyhnutné v budúcnosti zväčšiť početnosť skupín skúmaných subjektov, aby bolo možné vysloviť konzistentné závery o zmenách pozorovaných v proteóme CD8+ T-buniek luminálneho-A KP.

KLúčové slová: luminálny-A karcinóm prsníka, CD8+ T lymfocyty, diferenciálne exprimované proteíny, signálne dráhy

Keywords: luminal-A breast cancer, CD8+ T lymphocytes, differentially expressed proteins, signaling pathways

Úvod

Karcinóm prsníka (KP) je heterogénne ochorenie s rôznorodým molekulárnym a histologickým pozadím s rôznymi klinickými prejavmi. Dobré známa klinická klasifikácia karcinómu prsníka je založená na niekoľkých markerových génoch a proteínoch, najmä estrogénových receptoroch (ER), progesterónových receptoroch (PR) a receptore 2 pre ľudský epidermálny rastový faktor (HER2). Napriek viacerým obmedzeniam zostala klinická klasifikácia roky nezmenená [17].

Štúdie na báze génových mikročipov umožnili hlbšie nahliadnuť do komplexných biologických procesov, ktoré sa podieľajú na vzniku nádorov prsníka, a na základe profilov génovej exprese identifikovať odlišné triedy nádorov [36]. Spomedzi nich je najčastejším podtypom karcinómu prsníka luminálny-A karcinóm, t. j. ER a PR pozitívny, HER2 negatívny, s nízkou proliferačnou aktivitou a dobrou prognózou [12].

V štúdiách profilovania génovej exprese najväčším identifikovaným klastrom KP bol klastor charakterizujúci expresiu ER a ďalších biomarkerov vlastných luminálnym epiteliálnym bunkám, ktoré sú prítomné v normálnom prsníku, vrátane luminálnych cytokeratínov (CK) CK7, CK8, CK18 a CK19. Následne bola táto fenotypová skupina nádorov pomenovaná luminálnou podtriedou [5].

Väčšina ďalších štúdií podporila koncept dvoch podtried KP: luminálny-A a luminálny-B karcinóm [34]. Podtypy luminálny-A a B predstavujú 65-70 % všetkých karcinómov prsníka. Okrem stavu exprese ER/PR/ERBB2 bolo v týchto dvoch podtypoch identifikovaných niekoľko ďalších biomarkerov, ktoré sú prejavom komplexnosti týchto nádorov. Nádory luminálneho typu A vykazujú nielen vysokú úroveň exprese luminálnych epitelových CK, ale aj ďalších markerov súvisiacich s luminálnym typom, vrátane estrogénového receptora 1 (ESR1) a génov súvisiacich s funkciou ER, ako sú LIV1, hepatocytový jadrový faktor 3 alfa (FOXA1), proteín viažuci X-box 1 (XBP1) a proteín viažuci GATA 3 (GATA3) [34]. V porovnaní s inými podtypmi karcinómu prsníka, ako je HER2-pozitívny alebo triple negatívny karcinóm prsníka, má luminálny-A karcinóm zvyčajne dobrú prognózu. Naopak, skupina luminálneho-B karcinómu sa vyznačuje nízkou úrovňou exprese vyššie uvedených génov luminálneho-A karcinómu, ale aj vysokou úrovňou exprese génov súvisiacich najmä s proliferáciou, ako sú v-MYB, GGH, LAPTM4, NSE1 a CCNE1 [33].

Prítomnosť lymfocytov infiltrujúcich nádor (TIL) je priaznivým prognostickým faktorom pri karcinóme prsníka. TIL môžu synergicky pôsobiť na chemoterapiu a liečbu inhibítormi kontrolných bodov imunitného systému, čím sa zlepší klinická odpoveď. Veľkosť lymfocytárnej infiltrácie nie je jediným faktorom, ktorý moduluje

progresiu ochorenia; fenotyp lymfocytov môže tiež diktovať klinický výsledok. Imunita typu I podporuje šírenie CD8+ T-buniek potrebných na deštrukciu nádoru [35]. Lymfocyty CD8+ T, známe aj ako cytotoxické T-lymfocyty, sú heterogénnou skupinou buniek, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v adaptívnej imunitnej odpovedi proti patogénom a rakovine. Počas svojho života získavajú cytotoxické funkcie na zabezpečenie odstránenia infikovaných alebo transformovaných buniek. Pri rakovine prsníka sa prítomnosť CD8+ T lymfocytov v mikroprostredí nádoru spája s lepšou prognózou a celkovým prežitím. Tieto bunky sa podieľajú na imunitnom dohľade nad rakovinovými bunkami a ich prítomnosť naznačuje aktívnejšiu imunitnú odpoveď proti nádoru.

Pri luminálnom karcinóme prsníka A môže byť infiltrácia CD8+ T lymfocytov do nádoru prospešná, pretože naznačuje prebiehajúcu imunitnú odpoveď na prítomnosť rakovinových buniek. Táto imunitná odpoveď môže potenciálne pomôcť kontrolovať rast nádoru a zabrániť tvorbe metastáz. Presná úloha a význam CD8+ T lymfocytov pri luminálnom-A karcinóme prsníka sa však stále skúma a na úplné pochopenie ich funkcie a potenciálnych terapeutických kladov je potrebný ďalší výskum. Podrobnejšie pochopenie rozdielov v lymfocytárnej infiltrácii pri karcinóme prsníka môže tiež pomôcť pri identifikácii podtypov, ktoré sa dajú lepšie ovplyvniť imunomoduláciou.

Cieľom tejto štúdie bolo preto preskúmať niektoré aspekty molekulárnych mechanizmov a patogenézy luminálneho-A karcinómu prsníka. Pre pochopenie úlohy CD8+ T-lymfocytov izolovaných z periférnej krvi pacientok s luminálnym A KP bolo plánom vykonať analýzu proteómu pomocou LC-MS/MS v spojení s bioinformatickou analýzou expresie proteínov/génov s úmyslom nájsť centrálné proteíny, ktoré by mohli osvetliť prejavy a mechanizmus vzniku tohto ochorenia. Pre analýzu zistených diferenciálne exprimovaných proteínov/génov (DEG) medzi skupinou pacientok s KP a kontrolnými vzorkami bolo zámerom vykonať modulárnu analýzu v sieti proteín-proteínových interakcií (PPI) a identifikáciu signálnych dráh pomocou zásuvných modulov Cytoscape.

Materiál a metódy

Účastníci výskumu. Vzorky periférnej krvi boli odobrané od novo diagnostikovaných pacientok s karcinómom prsníka (KP) pred začatím akejkoľvek terapie kvôli minimalizácii potencionálnych proteomických zmien vyvolaných terapiou. Štúdia bola vedená v zhode s Helsinskou deklaráciou a bola schválená Etickou komisiou LF UPJŠ v Košiciach, protokol kód 9N/2021, dátum schválenia 17. 6. 2021, Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura 2020/EK/06047, dátum schválenia 25. 6. 2020, a Etickou komisiou Východoslovenského onkologického ústavu a. s., protokol kód EK/1/06/2020, dátum schválenia 1. 6. 2020. Randomizované vzorky periférnej krvi z kontrolnej skupiny zdravých subjektov boli získané z Gynekologicko-pôrodnice LF UPJŠ a UN LP v Košiciach,

vzorky s TNBC boli odobraté na I. chirurgickej klinike LF UPJŠ a UN LP v Košiciach. Informovaný súhlas (2020/EK/06407) bol získaný písomne od žien v oboch skupinách, kontrolnej skupine a skupine s rakovinou prsníka (podtyp Luminal A). Všetky vzorky boli získané v období od júna 2022 do marca 2023. Bolo použitých 10 vzoriek kontrolných vzoriek zdravých subjektov (bez nádorového ochorenia) s priemerným vekom 69 rokov (v rozmedzí 38-84 rokov), 5 vzoriek od pacientok s rakovinou prsníka podtypom Luminal A s priemerným vekom 64 rokov (v rozmedzí 56-76 rokov).

Príprava vzorky. Odobratá periférna krv (10 ml) bola zriedená v pomere 1:2 izolačným roztokom (2 mmol/l kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA)/0,2 % boviný sérový albumín (BSA)/fosfátový tlmivý roztok (PBS)) a centrifugovaná pri 600×g počas 10 min pri 4 °C. Po centrifugácii bola vrchná časť plazmy odstránená tak, aby vrstva mononukleárných buniek periférnej krvi (PBMC) a erytrocytov zostala neporušená. Do tejto dvojvrstvy boli postupne pridávané magnetické guľôčky s CD znakmi (Invitrogen Dynabeads, ThermoFisher Scientific, USA) v poradí CD19, CD14, CD8, CD4 s cieľom separovať jednotlivé subpopulácie leukocytov. Zriedená krv s pridanými magnetickými guľôčkami bola inkubovaná 20 min pri 4 °C s miešaním v rotátore (HulaMixer™ Sample Mixer, ThermoFisher Scientific, USA). Po inkubácii boli magnetické guľôčky spolu s bunkami s príslušným CD znakom odseparované magnetom. Supernatant bol použitý pre izoláciu buniek s nasledujúcim CD znakom. Pre ďalšie skúmanie boli použité guľôčky s CD8 znakom s príslušnou subpopuláciou leukocytov. Tie boli 3 krát premyté izolačným roztokom. Následne bolo k magnetickým guľôčkam pridaných 400 µl 50 mmol/l NH₄HCO₃. Subpopulácia leukocytov bola opakovane sonifikovaná v ultrazvukovej vani (37 kHz, 15 min) a ultrazvukovom bloku (y = 85 %, 15 min) a vortexovaná (5 min) pri teplote 4 °C. Samotné guľôčky boli potom odstránené magnetom.

Koncentrácia proteínov bola stanovená spektrofotometricky BCA skúškou.

Pred enzymatickým štiepením proteínov trypsínom v roztoku bol použitý ditiotritol (DTT) a jodoacetamid (IAA) na redukciu a alkyláciu cystínových zvyškov. Trypsinizácia prebehla v prítomnosti 5 mmol/l CaCl₂ a trypsínu v pomere - trypsín:vzorka = 1:40 (w/w) počas noci pri 21 °C. Nasledujúci deň boli vzorky okyslené na pH 2 až 3 pridaním 20 % kyseliny mravčej (FA). Všetky vzorky boli upravené na požadované objemy buď odparovaním vo vákuovom koncentrátore (SpeedVac, Thermo Scientific, USA) alebo pridaným roztokom 2 % (v/v) acetonitrilu (ACN) obsahujúceho 0,1 % (v/v) FA. Vzorky boli centrifugované (20 min, 18000×g, 4 °C).

LC-MS/MS analýza a identifikácia proteínov. Na LC-MS analýzu bol použitý hmotnostný spektrometer s iónovou pascou AmaZon Speed ETD (Bruker Daltonik, Nemecko) spojený so systémom Ultimate 3000 RSLC NCP (Thermo Scientific, USA); 2 µl vzorky bolo vstreknutých do záchytnej

kolóny Acclaim PepMap 100 (Dionex, Thermo Scientific, USA), 100 $\mu\text{m} \times 2\text{ cm}$, C18, 5 μm častice s náplňou rozpúšťadla voda-ACN v pomere 2:98 (v/v) s obsahom 0,1 % FA pri prietoku 8 $\mu\text{l min}^{-1}$. Peptidy boli eluované a separované na kapilárnej kolóne 75 $\mu\text{m} \times 30\text{ cm}$, plnenej časticami C18 s reverznou fázou, 3 μm (Magic C18 AQ, Michrom Bioresources, USA). Mobilné fázy pozostávali z 0,1 % FA vo vode-ACN 98:2 (v/v) (A) a 0,1 % FA vo vode-ACN 5:95 (v/v) (B), ktoré sa používali pri konštantnom prietoku 0,4 $\mu\text{l min}^{-1}$. Vzorky boli merané v automatickom režime MS/MS, 10 prekursorov na 1 MS sken a na fragmentáciu boli použité len 2+ a 3+ prekursor s aktívnym vylúčením nastaveným na 0,5 min. Cieľová hodnota ICC bola nastavená na 400 000 pre MS a MS/MS skenovanie; maximálny čas akumulácie bol 0,050 s pre MS a 0,1 s pre MS/MS. Izolačné okno bolo nastavené na 2,2 Da. Rozsah skenovania bol nastavený na 300 - 1300 Da. Na identifikáciu proteínov bol použitý vyhľadávač Mascot 2.4 (Matrix Science, UK) v databáze Swiss-Prot. Parametre boli stanovené takto: taxonómia - Homo sapiens (človek), variabilná modifikácia - oxidácia metionínu, fixná modifikácia - karbamido-metilácia cysteínu, tolerancia MS -0,6 Da a prahová hodnota miery falošných detekcií (FDR) bola stanovená na 1 %. Všetky vzorky boli analyzované v troch opakovaniach.

Predbežné spracovanie údajov a identifikačný skrining DEG. MS údaje boli predspracované v programe Proline-Studio 2.1.2 (Profi Proteomics, Francúzsko) na určenie vážených spektrálnych počtov identifikovaných proteínov. Tieto údaje boli následne analyzované pomocou nástrojov na analýzu Reactome s použitím algoritmu Camera [22] na identifikáciu DEG porovnaním úrovne expresie proteínov medzi pacientmi a zdravými kontrolami. Kritériá na skrining DEG boli definované s hraničnou hodnotou $P < 0,05$ na identifikáciu skupiny proteínov s vyššou, resp. nižšou reguláciou.

Na prevod identifikátorov proteínov na identifikátory génov bola použitá funkcia mapovania v UniProt (<https://www.uniprot.org>). Na ďalšiu analýzu boli použité zodpovedajúce gény.

Sieť interakcií proteín-proteín a analýza modulov. Na vytvorenie siete DEG bola použitá databáza STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) známych a predpokladaných PPI implementovaná v programe Cytoscape 3.10.1 [30]. Pre konštrukciu PPI siete boli vybrané DEG s binomickou hraničnou hodnotou $P < 0,05$. Následne bola sieť vygenerovaná aplikáciou StringApp 1.7.0 [8] analyzovaná pomocou doplnku MCODE 2.0.0 (Molecular Complex Detection) [2], ktorý umožňuje detegovať klastre a seed-gény. Pre výber klastrov boli

zvolené nasledovné kritériá: hraničný stupeň = 2, hraničné skóre uzlov = 0,2, maximálna hĺbka = 100 a k-skóre = 2.

Analýza signálnych dráh. Na analýzu signálnych dráh bol použitý plug-in ReactomeFI (verzia 8.0.6) - databáza signálnych dráh v prostredí Cytoscape [38].

Výsledky

Na preskúmanie interakcií proteínov, ktoré sa podieľajú na patogenéze luminálneho-A karcinómu prsníka, sme zo 705 identifikovaných diferenciálne exprimovaných génov/proteínov použili 80 génov s $P < 0,05$. Pomocou STRING aplikácie implementovanej v Cytoscape sme vytvorili sieť proteín-proteínových interakcií (Obr. 1). Topologické parametre, ktoré charakterizujú vytvorenú sieť sú zhrnuté v Tab. 1.

Na analýzu siete bol použitý MCODE zásuvný model v Cytoscape, ktorý dovoľuje identifikovať v komplexnej sieti zhľuky génov so vzájomne prepojenými uzlami a uzlové gény s vysokým stupňom prepojenia tzv. seeds. V komplexnej PPI sieti MCODE rozlíšil štyri klastre a štyri uzlové gény/seeds s vysokým stupňom konektivity (Obr. 2, Tab. 2).

Na identifikáciu signálnych dráh pri luminálnom-A KP sme analyzovali súvisiace DEG gény/proteíny každého klastru oddelene pomocou nástroja ReactomeFI implementovaného do Cytoscape.

V klastri 1 sa spomedzi 35 signálnych dráh javí ako významná dráha R-HSA-376176.7 (Signaling by ROBO receptors - Signalizácia receptormi ROBO) a R-HSA-9010553.2 (Regulation of expression of SLITs and ROBOs - Regulácia expresie SLIT a ROBO) (Obr. 3). V oboch sú obsiahnuté DEG RPL4, RPL5, RPS16, RPL31, RPL13 a RPL29.

V klastri 2 sa spomedzi 70 signálnych dráh javí ako významná dráha R-HSA-597592 (Post-translational protein modification - Posttranslačná modifikácia proteínov).

Post-translačná modifikácia proteínov, tzv. SUMOylácia (R-HSA-2990846, R-HSA-3108232, R-HSA-3899300) a signálne dráhy spojené s PTK6-onkogénnou nerekceptorovou tyrozínkinázou prevládajú v klastri 3.

V klastri 4 sú medzi 39 signálnymi dráhami signifikantné tie, ktoré sú spojené so skupinou signálnych dráh R-HSA-2262752 (Cellular responses to stress - Bunkové reakcie na stres), R-HSA-2559583 (Cellular senescence - Senescencia buniek) a R-HSA-2559586 (DNA damage/telomere stress induced senescence - Poškodenie DNA/telomérový stres vyvolaný senescenciou). Signálne dráhy spojené s DEG klastra 4 sú uvedené v Tab. 3.

Folia Medica Cassoviensia, 78 (1), 2024
35

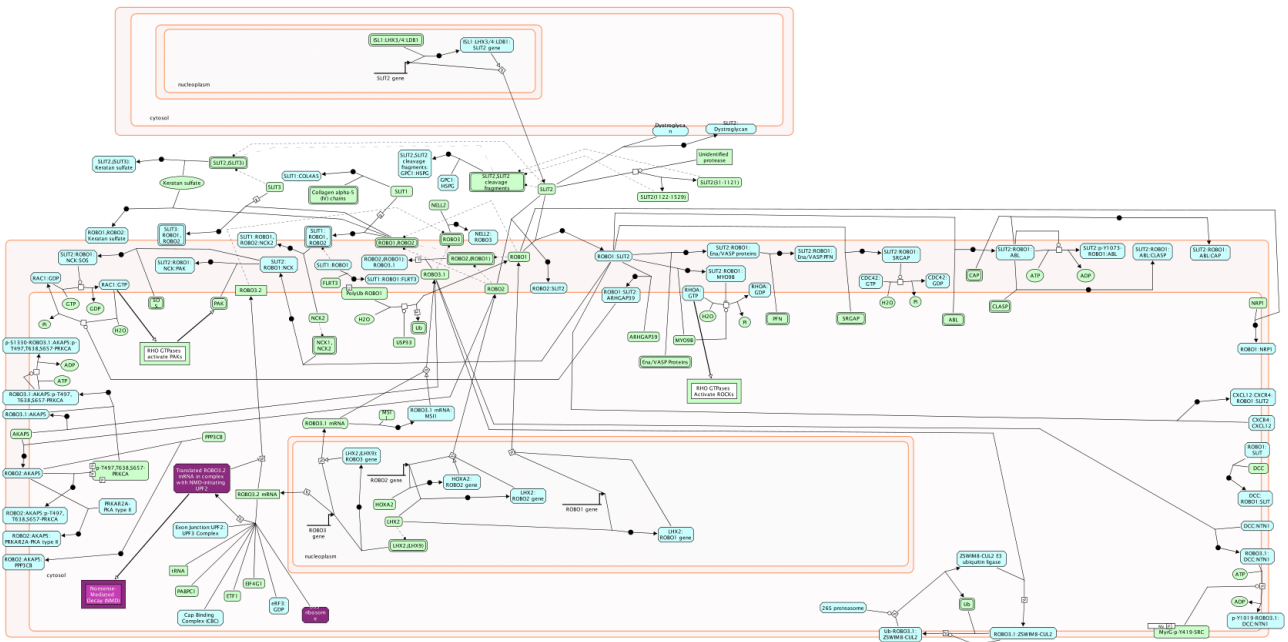
Seed: 100. Gény (uzly) sú znázornené: klaster 1 – modrá; klaster 2 – fialová; klaster 3 – ružová; klaster 4 – zelená farba. Uzlové gény/seeds s vysokým stupňom konektivity sú v rámci klastra zobrazené štvorčkami.

Počet uzlov	70
Počet hrán	211
Priemerný počet susedov	6,299
Priemer siete	7
Polomer siete	4
Koeficient zhľukovania	0,482
Hustota siete	0,095
Heterogenita siete	0,751

Tabuľka 1 Najdôležitejšie topologické parametre siete STRING.

Klaster	Skóre	Uzly	Hrany	ID uzlov
1	8	8	28	RPL4, RPL13, RPL31, HMG4, RPL5, RPS16, RACK1, RPL29
2	5	5	10	APOA1, FGA, FGB, F2, SERPIND1
3	4	5	8	DDX17, SFPQ, DHX15, EWSR1, FBLL1
4	3	3	3	H4C6, H3-4, H1-4

Tabuľka 2 Parametre klastrov identifikovaných pomocou MCODE v STRING sieti.



Obrázok 3 Diagram signálných dráh R-HSA-376176.7 (Signaling by ROBO receptors - Signalizácia receptormi ROBO).

Signálna dráha	Počet génov/proteínov v dráhe	Počet identifikovaných génov/proteínov v dráhe	P-hodnota	FDR	Gény/proteíny
DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence/ Poškodenie DNA/Telomérový stres vyvolaný senescenciou	61	2	2,99E-05	1,17E-03	H1-4, H3-4
Cellular Senescence/ Bunková senescencia	168	2	2,27E-04	4,31E-03	H1-4, H3-4
Apoptosis induced DNA fragmentation/ Fragmentácia DNA vyvolaná apoptózou	13	1	2,33E-03	0,011	H1-4
Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF)/ Tvorba heterochromatínových ložísk spojených so senescenciou (SAHF)	17	1	3,05E-03	0,011	H1-4
Cellular responses to stress/ Bunková odpoveď na stres	766	2	4,72E-03	0,011	H1-4, H3-4

Tabuľka 3 Signálne dráhy spojené s DEG klastra 4.

Diskusia

Naša štúdia ukázala, že v klasteri 1 sa nachádzajú up-regulované (RPL13, RPL31, RPL5 a RACK1) a down-regulované (RPL4, RPL29, HMGN4 a RPS16) DEG, ktoré sú súčasťou signálnych dráh Signalizácia receptormi ROBO a Regulácia expresie SLIT a ROBO. Z týchto DEG sú up-regulované RPL4 [16], RPL5 [10] a RPL13 [20] pri rakovine prsníka spojené so zlou prognózou. Doména 4 viažuca nukleozómy s vysokou pohyblivosťou (HMGN4) vykonáva biologické funkcie reguláciou transkripcie génov prostredníctvom väzby s nukleozómom. Ako nový epigenetický regulátor objavený v roku 2001 nie sú jeho biologické funkcie objasnené. Uvádza sa však, že HMGN4 je vysoko exprimovaný v ľudskom triple-negatívnom karcinóme prsníka [24]. Pri našom skúmaní v prípade luminárneho A karcinómu prsníka sme však zaznamenali jeho zníženie exprimáciu v CD8+ T lymfocytoch.

Signalizácia receptormi ROBO a Regulácia expresie SLIT a ROBO sú signálne dráhy, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri raste a vývoji tkanív a počas nádorového bujnenia sú často dysregulované [9]. SLIT a ROBO sa rozhodujúcim spôsobom podieľa na procesoch vývoja rôznych životne dôležitých orgánov, ako sú prsník, pľúca, pečeň, obličky, oko a reprodukčné systémy. Funkcia signalizácie SLIT-ROBO je ovplyvnená väzbou vnútrobunkových faktorov na cytoplazmatické domény ROBO. Cytosolové domény ROBO sú katalyticky neaktívne [14]. Interakcia SLIT-ROBO nie je výnimkou a stále viac dôkazov naznačuje, že má zásadnú funkciu počas vývoja rakoviny [15]. Expresia ROBO1 alebo ROBO2 sa pritom často znižuje v mnohých prípadoch rakoviny vrátane rakoviny hlavy/krku, prsníka, pľúc, obličiek a krčka maternice a súvisí s metyláciou a stratou heterozygoty týchto génov [23]. Tieto údaje naznačujú, že ROBO1 aj ROBO2 sú potenciálne tumor supresorové gény [14].

Štúdia zameraná na úlohu signálnej dráhy SLIT-ROBO pri vývoji rakoviny prsníka odhalila, že exogénne bunky exprimujúce SLIT2 u myši znížili veľkosť karcinómu prsníka o 65 % [25]. SLIT2 však podľa [31] môže pôsobiť ako chemoatraktant a indukovať metastázovanie buniek karcinómu prsníka do mozgu. Zdá sa teda, že úloha interakcie SLIT-ROBO v rakovine je zásadne dôležitá, ale komplikovanejšia, ako sa predpokladalo.

Ďalšou úlohou dráhy SLIT-ROBO pri tumorogenéze, podobne ako pri organogenéze, môže byť ovplyvňovanie proliferácie a smrti buniek. Aktivita SLIT-ROBO by mohla indukovať programovanú bunkovú smrť prostredníctvom aktivácie kaspázy-3 [9]. V prípade fibrosarkómov a skvamocelulárnych karcinómov infikovaných SLIT2 bol zaznamenaný vyšší počet apoptotických buniek a znížená proliferácia [18]. Zdá sa, že dráha SLIT-ROBO potláča najmä tvorbu a progresiu nádorov reguláciou takých procesov ako je invázia, migrácia, proliferácia, adhézia a apoptóza [4].

Druhý klaster je tvorený up-regulovanými DEG APOA1, FGA, FGB, F2 a SERPIND1. Z nich APOA1, FGA, F2 a SERPIND1 sú asociované so signálnou dráhou Posttranslačná modifikácia proteínov.

Signálna dráha Posttranslačnej modifikácie proteínov je zodpovedná za N-viazanú glykozyláciu asparagínových zvyškov v molekulách HLA [28]. Zistilo sa, že táto cesta posttranslačnej modifikácie je nevyhnutná pre toleranciu imunitného systému voči autoantigénom [29]. Genetická variabilita v dráhe posttranslačných modifikácií proteínov by preto mohla narušiť glykozylačné procesy, ktoré sú kľúčové pre udržanie tolerancie imunitného systému.

Tretí klaster je tvorený RNA-viažucimi proteínmi, z ktorých sú v CD8+ T lymfocytoch down-regulované DDX17, EWSR1 a up-regulované SFPQ, DDX15 a FBLL1. Proteíny viažuce RNA (RBP) sú triedou proteínov známych pre svoje rozmanité úlohy v biogenéze RNA, od regulácie transkripčných procesov v jadre až po uľahčenie translácie

v cytoplazme [19]. RBP účinne a všadeprítomne regulujú transkripty počas ich životného cyklu. Interakcie RBP s RNA siahajú od interakcie jedného proteínu s prvkom RNA až po spojenie viacerých RBP a molekúl RNA [7]. Predchádzajúce štúdie preukázali, že proteíny viažuce RBP sú tiež zapojené do biologických procesov asociovaných s kancerogénou [37].

DDX17 a DDX15, tzv. DEAD box proteíny charakterizované motívom Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD), sú predpokladané RNA helikázy [1]. Z nich DDX17 je proteín viažuci Sox2 pri ER-pozitívnom KP. DDX17 zvyšuje nádorové vlastnosti Sox2 tým, že podporuje jeho väzbu na cieľové gény.

Faktor spájania bohatý na prolín a glutamín (SFPQ) je všadeprítomný a hojne sa vyskytujúci RBP, ktorý zohráva viaceré regulačné úlohy v jadre vrátane opravy poškodenia DNA a ovplyvňovania rôznych procesov regulácie transkripcie [19]. V prognostickej štúdii [39] boli identifikované potenciálne faktory vrátane SFPQ súvisiace s opravou DNA a zlepšením presnosti predpovede prežitia pacientov s KP. Medzi signálne dráhy súvisiace s SFPQ patrí Signalizácia prostredníctvom PTK6 a odpoveď Mtb na fagocytózu. Dôležitým paralogom tohto génu je PSPC1.

Signálna dráha SUMOylácia predstavuje enzymatickú kaskádu, v ktorej sa proteíny SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier - malý modifikátor podobný ubikvitínu) viažu na cieľový proteín. Hromadiace sa údaje naznačujú, že SUMOylácia zahŕňa širokú škálu proteínov vrátane transkripčných faktorov, membránových receptorov, G-proteínov, proteínov cytoskeletu, enzýmov a cytosolových proteínov [27]. Mnohé bunkové mechanizmy a dráhy, do ktorých je SUMOylácia zapojená, sú deregulované pri viacerých typoch rakoviny. Niektoré zložky SUMO mechanizmu sú nadmerne exprimované pri viacerých malignitách, čo naznačuje, že SUMOylácia sa uplatňuje počas tumorigenézy [26, 27].

Štvrtý klaster je tvorený histónmi H4C6, H3-4, H1-4, ktoré sú podľa nášho skúmania down-regulované. Históny sú základné jadrové proteíny zodpovedné za štruktúru nukleozómov chromozómového vlákna u eukaryotov. Nukleozómy pozostávajú z približne 146 bp DNA ovínutých okolo histónového oktaméru, ktorý pozostáva z párov každého zo štyroch základných histónov (H2A, H2B, H3 a H4). Chromatínové vlákno sa ďalej zhutňuje prostredníctvom interakcie spojovacieho histónu H1 s DNA medzi nukleozómami, čím sa vytvárajú chromatínové štruktúry vyššieho rádu.

Identifikované DEG sú súčasťou signálnych dráh asociovaných so skupinou signálnych dráh Bunkové reakcie na stres, ktorej súčasťou je i signálna dráha Senescencia buniek a Poškodenie DNA/telomérový stres vyvolaný senescenciou. Bunkové starnutie (senescencia) je komplexná molekulárna a biochemická signálna dráha, ktorá zohráva úlohu v regulácii vývoja a funkcie tkanív, ako aj ako dôležitý homeostatický mechanizmus, ktorý pôsobí na zachovanie integrity buniek a tkanív po viacerých stresogénnych

inzultoch [13]. Úloha bunkovej senescencie v normálnom vývoji mliečnej žľazy, ako aj v iniciácii a progresii karcinómu prsníka zostáva nejasná [32].

Štúdie poukázali na existenciu bariér nádorového bujnenia, ktoré spomaľujú alebo inhibujú progresiu preneoplastických lézií do neoplázie. Jedna z takýchto bariér je sprostredkovaná onkogénom indukovanou senescenciou [3]. Bunková senescencia vykazuje významné rozdiely medzi normálnymi ľudskými fibroblastami a mamárnopitelovými bunkami [11]. Nedávne štúdie naznačujú, že bunková senescencia je prítomná v premalígnom stave (napr. v pľúcnych adenómoch) a chýba v malígnych léziách [6]. Hoci bunky karcinómu prsníka nestarnú, za špecifických stresových podmienok, ako je deplécia dôležitého génového produktu alebo liečba protinádorovými látkami, sa dostávajú do stavu bunkovej senescencie, ktorý je charakterizovaný pozitívnym farbením SA-b-gal [32].

Bunkové starnutie je stresová reakcia, ktorá aktivuje bunky vrodenej imunity, ale o jeho interakcii s adaptívnym imunitným systémom sa vie len málo. Autori práce [21] ukázali, že senescentné bunky kombinujú niekoľko vlastností, ktoré ich robia vysoko účinnými pri aktivácii dendritických buniek (DC) a antigén-špecifických CD8 T buniek. Patrí sem uvoľňovanie alarmínov, aktivácia signalizácie IFN, rozšírené mechanizmy MHC triedy I a prezentácia sebaeptidov súvisiacich so senescenciou, ktoré môžu aktivovať bunky CD8 T. V súvislosti s rakovinou vyvoláva imunizácia senescentnými rakovinovými bunkami silnú protinádorovú ochranu sprostredkovanú DC a bunkami CD8 T. Táto ochrana je lepšia ako imunizácia rakovinovými bunkami, ktoré prechádzajú imunogénnou bunkovou smrťou. Napokon, indukcia senescencie v ľudských primárnych rakovinových bunkách zvyšuje aj ich schopnosť aktivovať autológne antigén-špecifické nádorové infiltrujúce CD8 lymfocyty. Štúdia teda naznačuje, že senescentné rakovinové bunky možno využiť na vytvorenie účinnej a ochrannej protinádorovej imunitnej odpovede závislej od CD8 [21].

Záver

Cytotoxické CD8+ T-bunky zohrávajú kľúčovú úlohu pri eliminácii malígnych buniek a môžu poskytovať dlhodobú ochrannú imunitu. Adaptujú sa na rozmanité a dynamické metabolické prostredie, s ktorým sa stretávajú v obehu a v tkanivách. Okrem toho môžu zmeny v metabolizme celého tela v dôsledku chorobou vyvolaných zmien ovplyvniť imunitu sprostredkovanú bunkami CD8+ T. Adaptácia CD8+ T buniek v špecifickom prostredí nám pomáha pochopiť, ako tieto bunky chránia pred nádormi. Výsledky nášho skúmania naznačujú, že v prípade luminálneho-A KP dochádza k zmenám expresie proteínov CD8+ T-buniek v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Napriek sľubným výsledkom dosiahnutým v tejto štúdii je nevyhnutné v budúcnosti zväčšiť početnosť skupín skúmaných subjektov, aby bolo možné vysloviť konzistentné

závery o pozorovaných zmenách v proteóme CD8+ T-buniek luminálneho-A KP.

Summary

The aim of this study was to investigate some aspects of the molecular mechanisms of luminal-A breast cancer (KP). To understand the role of CD8+ T-lymphocytes isolated from the peripheral blood of patients with luminal-A KP, proteome analysis by LC-MS/MS in conjunction with bioinformatics analysis of protein/gene expression was performed with the intention of finding central proteins that could shed light on the manifestations and mechanism of this disease. Differentially expressed proteins/genes (DEGs) between the KP patient group and controls were analyzed in a protein-protein interaction network using MCODE and ReactomeFI Cytoscape plug-ins.

Literatúra

- Alqahtani, H., Gopal, K., Gupta, N., Jung, K., Alshareef, A., Ye, X., et al.: DDX17 (P72), a Sox2 binding partner, promotes stem-like features conferred by Sox2 in a small cell population in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cell. Signal.*, 28 (2), 2016, s. 42–50.
- Bader, G. D., Hogue, C. W.: An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4 (1), 2003, s. 2.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., et al.: Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444 (7119), 2006, s. 633–637.
- Basha, S., Jin-Smith, B., Sun, C., Pi, L.: The SLIT/ROBO Pathway in liver fibrosis and cancer. *Biomolecules*, 13 (5), 2023, s. 785.
- Callagy, G., Pharoah, P., Chin, S., Sangan, T., Daigo, Y., Jackson, L., et al.: Identification and validation of prognostic markers in breast cancer with the complementary use of array-CGH and tissue microarrays. *J. Pathol.*, 205 (3), 2005, s. 388–396.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., et al.: Senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436 (7051), 2005, s. 642–642.
- Corley, M., Burns, M. C., Yeo, G. W.: How RNA-binding proteins interact with rna: molecules and mechanisms. *Mol. Cell*, 78 (1), 2020, s. 9–29.
- Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J., Jensen, L. J.: Cytoscape StringApp: Network analysis and visualization of proteomics data. *J. Proteome Res.*, 18 (2), 2019, s. 623–632.
- Dickinson, R. E., Duncan, W. C.: The SLIT-ROBO pathway: a regulator of cell function with implications for the reproductive system. *Reproduction*, 139 (4), 2010, s. 697–704.
- Fancello, L., Kampen, K. R., Hofman, I. J. F., Verbeeck, J., Keersmaecker, K. D.: The ribosomal protein gene RPL5 Is a haploinsufficient tumor suppressor in multiple cancer types. *Oncotarget*, 8 (9), 2017, s. 14462–14478.
- Georgakopoulou, E., Evangelou, K., Havaki, S., Townsend, P., Kanavaros, P., Gorgoulis, V. G.: Apoptosis or senescence? which exit route do epithelial cells and fibroblasts preferentially follow? *Mech. Ageing Dev.*, 156, 2016, s. 17–24.
- Glajcar, A., Łazarczyk, A., Tyrak, K. E., Hodorowicz-Zaniewska, D., Streb, J., Okoń, K., et al.: Nodal status in luminal a invasive breast cancer: relationships with cytotoxic CD8 + and regulatory
- FOXP3 + cells tumor-associated infiltrate and other prognostic factors. *Virchows Arch.*, 479 (5), 2021, s. 871–882.
- He, S., Sharpless, N. E.: Senescence in health and disease. *Cell*, 169 (6), 2017, s. 1000–1011.
- Huang, T., Kang, W., Cheng, A. S. L., Yu, J., To, K. F.: The emerging role of slit-robo pathway in gastric and other gastro intestinal cancers. *BMC Cancer*, 15 (1), 2015, s. 950
- Chédotal, A., Kerjan, G., Moreau-Fauvarque, C.: The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell Death Differ.*, 12 (8), 2005, s. 1044–1056
- Chen, J., Liu, C., Cen, J., Liang, T., Xue, J., Zeng, H., et al.: KEGG-expressed genes and pathways in triple negative breast cancer: protocol for a systematic review and data mining. *Medicine*, 99 (18), 2020, s. e19986.
- Jassem, J., Shan, A., Buczek, D.: Changing paradigms in breast cancer treatment. *Eur. J. Trans. Clin. Med.*, 3 (2), 2020, s. 53–63.
- Kim, H. K., Zhang, H., Li, H., Wu, T.-T., Swisher, S., He, D., et al.: Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma. *Neoplasia*, 10 (12), 2008, s. 1411–1420.
- Lim, Y. W., James, D., Huang, J., Lee, M.: The emerging role of the RNA-binding protein SFPQ in neuronal function and neurodegeneration. *IJMS*, 21 (19), 2020, s. 7151.
- Lin, X., Guo, L., Lin, X., Wang, Y., Zhang, G.: Expression and prognosis analysis of mitochondrial ribosomal protein family in breast cancer. *Sci. Rep.*, 12 (1), 2022, s. 10658.
- Marin, I., Boix, O., Garcia-Garijo, A., Sirois, I., Caballe, A., Zarzuela, E et al.: Cellular senescence is immunogenic and promotes antitumor immunity. *Cancer Discov.*, 13 (2), 2023, s. 410–431.
- Milacic, M., Beavers, D., Conley, P., Gong, C., Gillespie, M., Griss, J., et al.: The Reactome pathway knowledgebase 2024. *Nucleic Acids Res.*, 52 (D1), 2024, s. D672–D678
- Mitra, S., Mazumder-Indra, D., Mondal, R. K., Basu, P. S., Roy, A., Roychoudhury, S., et al.: Inactivation of SLIT2-ROBO1/2 pathway in premalignant lesions of uterine cervix: clinical and prognostic significances. *PLoS ONE*, 7 (6), 2012, s. e38342.
- Mou, J., Xu, X., Wang, F., Kong, W., Chen, J., Ren, J.: HMGN4 plays a key role in STAT3-mediated oncogenesis of triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis*, 43 (9), 2022, s. 874–884.
- Prasad, A., Fernandis, A. Z., Rao, Y., Ganju, R. K.: Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 279 (10), 2004, s. 9115–9124.

26. Rabellino, A., Andreani, C., Scaglioni, P. P.: The role of PIAS SUMO E3-ligases in cancer. *Cancer Res.*, 77 (7), 2017, s. 1542–1547.
27. Rabellino, A., Khanna, K. K.: The implication of the SUMOylation pathway in breast cancer pathogenesis and treatment. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 55 (1), 2020, s. 54–70.
28. Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A., Dwek, R. A.: Glycosylation and the immune system. *Science*, 291 (5512), 2001, s. 2370–2376.
29. Ryan, S. O., Cobb, B. A.: Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. *Semin. Immunopathol.*, 34 (3), 2012, s. 425–441.
30. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al.: Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13 (11), 2003, s. 2498–2504.
31. Schmid, B. C., Reznicek, G. A., Fabjani, G., Yoneda, T., Leodolter, S., Zeillinger, R.: The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 106 (3), 2007, s. 333–342.
32. Sirinian, C., Peroukidis, S., Kriegsmann, K., Chaniotis, D., Koutras, A., Kriegsmann, M., et al.: cellular senescence in normal mammary gland and breast cancer. Implications for Cancer Therapy. *Genes*, 13 (6), 2022, s. 994.
33. Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., et al.: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (14), 2003, s. 8418–8423.
34. Sotiriou, C., Neo, S.-Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., et al.: Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (18), 2003, s. 10393–10398.
35. Stanton, S. E., Adams, S., Disis, M. L.: Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. *JAMA Oncol.*, 2 (10), 2016, s. 1354.
36. Van 't Veer, L. J., Dai, H., Van De Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A. M., Mao, M., Peterse, H. L., et al.: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415 (6871), 2002, s. 530–536.
37. Wang, L., Zhou, N., Qu, J., Jiang, M., Zhang, X.: Identification of an RNA binding protein-related gene signature in hepatocellular carcinoma patients. *Mol. Med.*, 26 (1), 2020, s. 125.
38. Wu, G., Feng, X., Stein, L.: A Human functional protein interaction network and its application to cancer data analysis. *Genome Biol.*, 11 (5), 2010, s. R53.
39. Zhang, D., Yang, S., Li, Y., Yao, J., Ruan, J., Zheng, Y., et al.: Prediction of overall survival among female patients with breast cancer using a prognostic signature based on 8 DNA repair-related genes. *JAMA Netw. Open*, 3 (10), 2020, s. e2014622.

Analýza vplyvu Luminal A karcinómu prsníka na proteomický profil CD4+ T-lymfocytov

Ivan Talian¹, Mária Kacírová², Martin Menkyna¹, Soňa Tkáčiková¹, Peter Bober¹, Michaela Šulíková¹,
Michal Alexovič¹, Marek Lenárt³, Dávid Tóth⁴, Dominik Šafčák⁵, Ján Sabo^{1*}

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ²Medipark, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

³I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, ⁴Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice,

⁵Klinika rádioterapie a onkológie UPJŠ LF a VOÚ a. s., Košice, * korešp. autor

V súčasnom výskume karcinómov špeciálna pozornosť je zameraná na zložitú interakciu medzi imunitným systémom a nádorom. Prezentovaná práca je zameraná na proteomickú analýzu CD4+ T lymfocytov izolovaných z periférnej krvi pacientov s karcinómom prsníka, konkrétne podtypu Luminal A karcinómu prsníka. Porovnaním kvantitatívnych proteomických profilov CD4+ T lymfocytov a kontrolných vzoriek zdravých subjektov bolo identifikovaných 61 proteínov s rozdielnou expresiou v porovnávaných skupinách. V skupine vzoriek pochádzajúcich s Luminal A podtypu nádorového ochorenia prsníka boli potvrdené downregulácie proteínov zastúpených v signálnych dráhach cytokínov v imunitnom systéme, konkrétne signalizácia interleukínu 12 (IL12) ako aj signalizácia interferónov. Downregulácia signálnej dráhy IL - 12, ktorý sa podieľa na diferenciácii naivných T buniek na pomocné Th1 bunky (T helper cells), poukazuje na priame zapojenie CD4+ T lymfocytov pri interakcii imunitného systému s nádorovým ochorením.

Namerané výsledky naznačujú, že imunosupresívne prostredie nádoru tak okrem priameho útlu diferenciácie naivných CD4+ T buniek na Th1 bunky s potvrdenou protinádorovou aktivitou má za následok aj zníženie imunitnej odpovede pomocou cytotoxických CD8+ T buniek a natural killer cells (NK bunky, prirodzené zabijácke bunky), ako hlavných faktorov protinádorovej imunity v dôsledku downregulácie signálnych cytokínov.

Kľúčové slová: CD4 T lymfocyty, proteomika, rakovina prsníka, Luminal A

Keywords: CD4 T lymphocytes, proteomics, breast cancer, Luminal A

Úvod

Karcinóm prsníka predstavuje jednu z najčastejších malignít postihujúcich ženy po celom svete, a napriek pokrokom v diagnostike a liečbe zostáva výzvou v medicínskom výskume. V súčasnosti nám rastúce pochopenie imunobiológie a imunoterapie otvára nové možnosti v boji proti tomuto komplexnému ochoreniu. Jedným z kľúčových hráčov v imunitnej odpovedi by podľa najnovších informácií mohla byť aj skupina CD4+ T lymfocytov, ktorá zohráva kritickú úlohu v regulácii imunitného prostredia nádorových lézií a je súčasťou komplexnej siete interakcií v rámci nádorového mikroprostredia [1]. Výsledná interakcia CD4+ T lymfocytov s nádorovými bunkami však závisí od včasnej aktivácie naivných CD4+ T buniek. K samotnej aktivácii naivných CD4+ T lymfocytov dochádza po stimulácii T bunkového receptora (TCR) a iných povrchových receptorov naivných CD4+ T buniek. Tieto receptory rozpoznávajú set špecifických antigénových peptidov v komplexe s molekulami hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) a zároveň pod vplyvom okolia, konkrétne prítomných signálnych molekúl cytokínov, dochádza k aktivácii T buniek [5]. Po tejto aktivácii, CD4+ T bunky podliehajú klonálnej expanzii a diferenciácii na CD4+ efektorové T bunky. Počas tejto fázy cytokínové signály z prostredia ovplyvňujú transkripčné programy v aktivovaných CD4+ T bunkách a usmerňujú diferenciáciu smerom

k CD4+ T bunkovým líniam, ktoré produkujú špecifické súbory efektorových cytokínov. V súčasnosti je na základe charakteristickej sekrécie cytokínov definovaných viacero podskupín CD4+ T pomocných buniek. Patria tam Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, regulačné T bunky (Tregs) a folikulárne pomocné T bunky (TFH) [4,7] (Tab. 1).

Jednotlivé podtypy CD4+ T-lymfocytov vo všeobecnosti plnia dôležité imunoregulačné úlohy v adaptívnej imunite, vrátane aktivácie B lymfocytov, cytotoxických CD8+ T lymfocytov a NK buniek [11]. Je však dôležité poznamenať, že jednotlivé podtypy CD4+ T lymfocytov môžu v závislosti na podmienkach vykazovať svoj duálny charakter čo môže v závere ovplyvniť anti- vs protumorigénnu rovnováhu imunitnej odpovede pomocných T buniek pri interakcii s nádorom (Tab. 1) [2].

V dnešnej dobe je už tiež zrejmé, že nie všetky aktivované CD4+ T lymfocyty bunky sa terminálne diferencujú, ale ich podstatná časť zostáva plastická a môže byť schopná získať ďalšie vlastnosti a funkcie ako súčasť sekundárnej imunitnej odpovede [4]. Najnovšie poznatky zdôrazňujú dôležitú rolu CD4+ T lymfocytov v kontexte imunoterapie a cieľenej liečby rakoviny prsníka. Kombinované prístupy, ktoré zahŕňajú moduláciu CD4+ T buniek a ďalších imunitných efektorov, sa javia ako sľubné smerovanie v snahe maximalizovať terapeutický účinok a minimalizovať nežiaduce účinky [9].

Cytokíny potrebné pre diferenciáciu naivných CD4+ T buniek	Vzniknutý subtyp CD4+ T lymfocyту	Cytokíny produkované konkrétnym podtypom CD4+T bunky	Biologická funkcia vzniknutého podtypu CD4+T lymfocyту - protinádorový účinok	Biologická funkcia vzniknutého podtypu CD4+T lymfocyту - pro nádorový účinok
IFN- γ , IL-12,	Th1	IFN- γ , IL-2, TNF- α	inhibícia metastáz a angiogenézy, indukcia apoptózy rakovinových buniek, indukcia fragility Treg, polarizácia M1 makrofágov	podpora exprese imunosupresívnych molekúl
IL-4,	Th2	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17	nábor makrofágov eozinofilov, indukcia apoptózy rakovinových buniek	indukcia úniku tumoru imunitného systému, inhibícia procesingu antigénu a prezentácie, aktivácia Treg buniek, M2 polarizácia makrofágov
IL-4, TGF- β	Th9	IL-3, IL-9, IL-21	nábor dendritických buniek, indukcia tumor špecifických CD8+ T buniek	prežitie a migrácia rakovinových buniek, indukcia Treg buniek
IL-6, TGF- β	Th17	IL-17a, IL-17f	nábor CD8+T buniek, dendritických a NK buniek	indukcia angiogenézy, indukcia prežitia rakovinových buniek
IL-6, IL-21	Tfh	IL-6, IL-21	nábor imunitných buniek do TME, indukcia B buniek pre protinádorovú odpoveď	imunosupresia, pomocná funkcia pri B bunkovom lymfóme
IL-10, IL-35, TGF- β	Treg	IL-10, IL-35, TGF- β	protizápalová funkcia	imunosupresia, tolerogénny efekt

Tabuľka 1. Prehľad podtypov CD4+ T lymfocytov s popisom podmienok diferenciácie naivných CD4+ T buniek na ich podtypy. Popis biologickej funkcie jednotlivých vzniknutých podtypov CD4+ T lymfocytov.

V súčasnom výskume rakoviny prsníka preto stúpa záujem o hlbšiu analýzu CD4+ T lymfocytov na proteomickej úrovni.

Náš výskum sa zameria na identifikáciu špecifických proteínových markerov sprevádzajúcich aktiváciu CD4+ T lymfocytov u pacientov s Luminal A podtypom rakoviny prsníka s cieľom poskytnúť dôležité informácie o prebiehajúcej interakcii CD4+ T lymfocytov s nádorovým ochorením. Tento prístup k štúdiu správania sa CD4+ T lymfocytov in vivo pri vybranom podtype karcinómu prsníka môže poskytnúť inovatívne náhľady do biologických mechanizmov, ktoré riadia následnú imunitnú odpoveď.

Materiál a metódy

1. Výber pacienta

Vzorky periférnej krvi boli odobrané od novo diagnostikovaných pacientok s karcinómom prsníka (KP) pred začatím akejkoľvek terapie kvôli minimalizácii potencionálnych proteomických zmien vyvolaných terapiou. Štúdia bola vedená v zhode s Helsinskou deklaráciou a bola schválená Etickou komisiou LF UPJŠ v Košiciach, protokol kód 9N/2021, dátum schválenia 17. 6. 2021, Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura 2020/EK/06047, dátum schválenia 25. 6. 2020, a Etickou komisiou Východoslovenského onkologického ústavu a. s., protokol kód EK/1/06/2020, dátum schválenia 1. 6. 2020. Randomizované vzorky periférnej krvi z kontrolnej skupiny

zdravých subjektov boli získané z Gynekologicko-pôrodníckej kliniky LF UPJŠ a UN LP v Košiciach, vzorky s TNBC boli odobraté na I. chirurgickej klinike LF UPJŠ a UN LP v Košiciach. Informovaný súhlas (2020/EK/06407) bol získaný písomne od žien v oboch skupinách, kontrolnej skupine a skupine s rakovinou prsníka (podtyp Luminal A). Všetky vzorky boli získané v období od júna 2022 do marca 2023. Bolo použitých 10 vzoriek kontrolných vzoriek zdravých subjektov (bez nádorového ochorenia) s priemerným vekom 69 rokov (v rozmedzí 38-84 rokov), 5 vzoriek od pacientok s rakovinou prsníka podtypom Luminal A s priemerným vekom 64 rokov (v rozmedzí 56-76 rokov).

2. Odber krvi

Vzorky periférnej krvi o objeme 10 mL boli zbierané do skúmaviek BD Vacutainer K2EDTA, chladených na 4 °C, a spracované do 30 minút od získania. 10 mL periférnej krvi bolo zriedených 20 mL fyziologickým roztokom (PBS obsahujúcim BSA a EDTA, pH = 7,4) a následne boli centrifugované pri 600x g po dobu 10 minút pri 4 °C. Horná vrstva plazmy bola odstránená a doplnená izolačným roztokom tak, aby konečný objem bol 10 mL.

3. Izolácia CD4+ T-lymfocytov

K 250 μ L opláchnutých magnetických guličiek CD4+ (Dynabeads™ CD4+, Invitrogen od Thermo Fisher Scientific) sa pridala zriedená krv. Následne sa zmiešali v Multirotátore (Multi Bio RS-24, Biosan) pri 4 °C po dobu 20 minút. Skúmavka s vzorkou a magnetickými guličkami

bola vložená do stojana s magnetom (DynaMag™-50 Magnet, Invitrogen od Thermo Fisher Scientific). Supernatant bol opatrne odobraný do novej 50 mL skúmavky. Zachytené magnetické guľičky boli trikrát opláchnuté izolačným roztokom.

4. Digestia v roztoku

Koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou bicinchoninovej metódy (BCA metóda - využíva kyselinu bicinchoninovú (BCA) k spektrofotometrickému stanoveniu celkových proteínov pomocou alkalickej redukcie med'natého iónu na med'ný proteín a následnú chelatáciu med'ného iónu kyselinou bicinchoninovou) pomocou sady QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich). K požadovaným objemom roztoku 1,4-ditiotreitolu (DTT) 0,025 M (čistota $\geq 98\%$, Biorad) sa pridala vzorka a následne sa inkubovali v termostate pri 60 °C po dobu 30 minút. Následne sa pridali požadované objemy roztoku Indol 3 kyseliny octovej (IAA) 0,25 M (čistota $\geq 99\%$, Biorad), po čom sa vzorky inkubovali v termostate v tme pri 21 °C po dobu 30 minút. Pridaný bol aj roztok CaCl_2 5 mM (čistota $\geq 98\%$, Merck), nasledovaný trypsinom (Roche) v pomere trypsin/vzorka = 1 : 40 (h/h). Vzorky sa inkubovali pri 21 °C cez noc a potom sa okyslili na pH = 3 pridaním 20 % kyseliny mravenčej (Merck). Objem vzorky bol upravený pomocou SpeedVac (Labconco). Vzorky boli centrifugované pri 18 000 g, 4 °C.

5. Proteomická analýza (LC-MS/MS) a identifikácia proteínov v databáze

Na proteomickú analýzu sme použili nanokvapalinový chromatograf (HPLC systém Ultimate 3000 RSLC Nano, Thermo Fisher Scientific) spojený s hmotnostným spektrometrom (Amazon Speed ETD s iónovým zdrojom CaptiveSpray, Bruker Daltonik) zapojený v prekoncentračnom usporiadaní. Celkovo 1 μg peptidov z izolovaných lymfocytov (5 μL injikovanej vzorky s koncentráciou 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) bolo zachytených na kolóne Acclaim® PepMap C₁₈ trap (100 $\mu\text{m} \times 2\text{ cm}$, veľkosť častíc 5 μm , veľkosť pórov 100 Å). Zachytené peptidy boli následne separované na analytickej kolóne PepMap RSLC C₁₈ (75 $\mu\text{m} \times 30\text{ cm}$, veľkosť častíc 3 μm , veľkosť pórov 100 Å). Na nástrek vzorky sa použila 98 % voda a 2 % acetonitril s 0,1 % kyselinou mravenčou pri prietoku 8 $\mu\text{L}/\text{min}$. Proces elúcie zahŕňal použitie dvoch mobilných fáz s rôznymi zloženiami: mobilná fáza A pozostávala z 98 % vody a 2 % acetonitrilu s 0,1 % kyselinou mravenčou, zatiaľ čo mobilná fáza B bola zložená z 95 % acetonitrilu a 5 % vody s 0,1 % kyselinou mravenčou. Elučný gradient začínal pomerom 96 % A a 4 % B počas prvých 5 minút. Ďalších 90 minút sa pomer mobilnej fázy B lineárne zvyšoval od 4 % do 35 %. Po tomto nasledovala 10-minútová oplachovacia fáza kolóny pomocou 98 % fázy B, nasledovaná 15-minútovou reekvilibráciou kolóny pomocou 4 % B mobilnej fázy. Počas celého gradientu elúcie bola udržiavaná rýchlosť prietoku na úrovni 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Analýza eluovaných peptidov bola vykonaná pomocou hmotnostného spektrometra s ionizáciou elektropray (ESI). Parametre skenovania MS

používané v experimente boli nasledujúce: pozitívny merač mód, so zvýšeným rozlíšením skenov a kontrolou iónového náboja (ICC) nastavenou na hodnotu 400 000. Maximálny čas akumulácie bol 50 ms a analyzovaný hmotnostný rozsah bol od 300 do 1300 m/z. Parametre skenovania MS/MS boli nasledujúce: cieľový ICC bol nastavený na 500 000, maximálny čas akumulácie 100 ms a šírka izolačného okna bola 2,2 m/z. Identifikácia proteínov sa vykonávala pomocou vyhľadávacieho algoritmu Mascot (Matrix Science, verzia 2.8.0) spolu s databázou SwissProt (verzia 2023.02). Kritéria vyhľadávania boli nasledujúce: taxonómia bola obmedzená na Homo sapiens (človek), ako enzým bol použitý trypsin, karbamidometylácia cysteínu (C) bola nastavená ako fixná modifikácia a oxidácia metionínu (M) bola povolená ako premenná modifikácia. Povolené boli až dva vynechané trypsinové štepy a zohľadňované boli len peptidy so stavmi náboja +2 a +3 o minimálnej dĺžke 3 aminokyselín.

6. Kvantifikácia proteínov bez označenia, identifikácia proteín-proteínových interakcií a génová obohacovacia analýza

Technické triplikáty boli spracované pomocou softvéru Proline (Proline Studio 2.0.1, <http://proline.profipteomics.fr/>). Na zhodu peptidov bolo požadované minimálne skóre 20 a hodnota významnosti $p \leq 0,05$. Na vyhodnotenie kvantity proteínov sme použili mieru falošného výskytu (FDR) $\leq 1\%$ a požadovali sme aspoň dva jedinečné peptidy. Proteín-proteínové interakcie boli analyzované pomocou online nástroja <https://string-db.org/>. Na výpočet génového obohatenia signálnych dráh bol použitý Reactome analysis tool <https://reactome.org/gsa/home> s algoritmom Camera podobným algoritmu GSEA implementovanom v limma balíku.

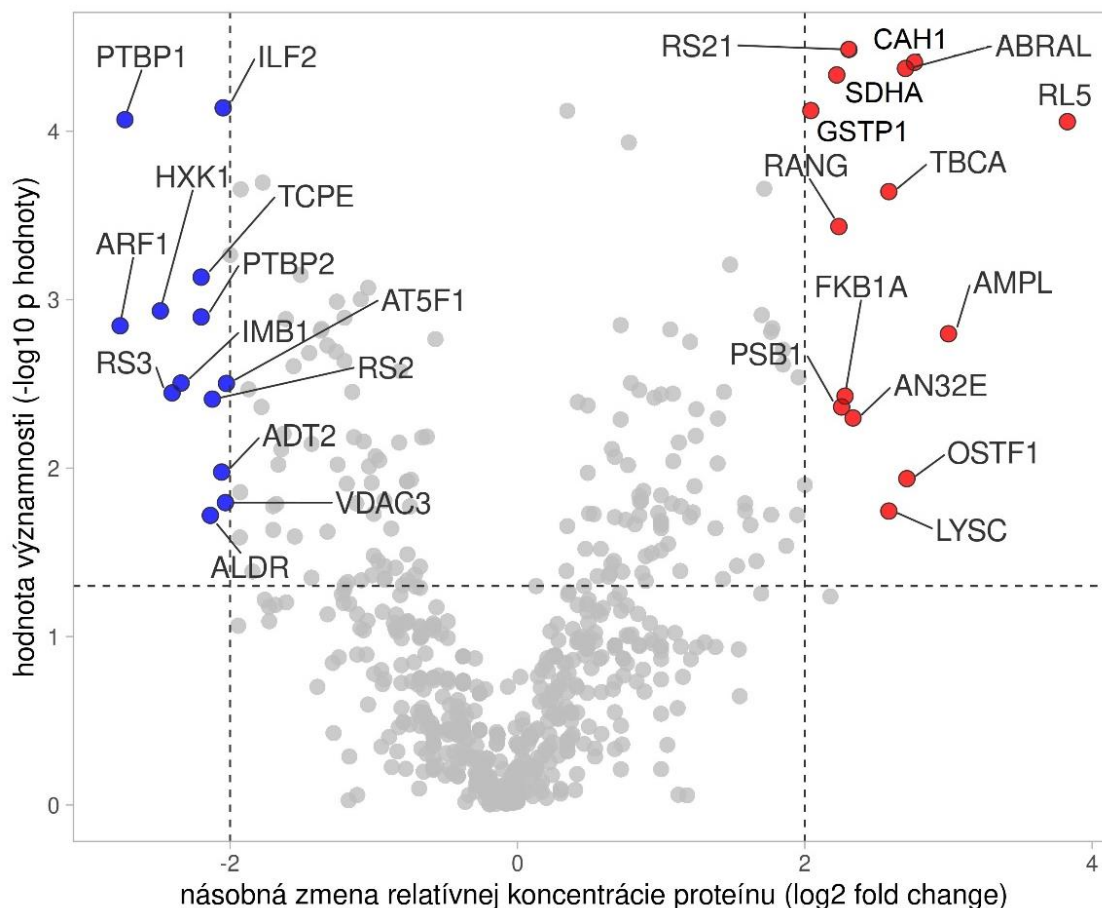
Výsledky

Neznačená proteomická analýza CD4⁺ T lymfocytov.

Proteomickou analýzou CD4⁺ T lymfocytov bolo vo vzorkách Luminal A podtypu karcinómu prsníka u zdravých jedincov celkovo identifikovaných 830 proteínov. Z celkového počtu identifikovaných proteínov bola na základe kvantitatívneho profilovania proteínov bez značenia potvrdená diferenciálna expresia proteínov v CD4⁺ T lymfocytoch Luminal A podtypu karcinómu prsníka a zdravých jedincov u 61 proteínov. V týchto 61 štatisticky významne zmenených proteínoch v subpopulácii CD4⁺ T lymfocytov (násobná zmena relatívnej koncentrácie proteínu vyjadrená ako $\log_2\text{fold change} \geq 2$ alebo ≤ -2 , hodnota významnosti t. j. p-hodnota $< 0,05$ vyjadrená ako $-\log_{10} p$ hodnoty) bolo identifikovaných 30 proteínov, ktorých expresia bola regulovaná smerom nahor vo vzorkách pacientok s karcinómom (upregulácia) pri porovnaní s kontrolnými vzorkami zdravých subjektov. Ďalších 31 proteínov bolo regulovaných smerom nadol

(downregulácia) v CD4+ T lymfocytoch v pacientoch s Luminal A podtypom karcinómu prsníka a u zvyšných identifikovaných proteínoch nebola táto zmena buď štatisticky významná alebo nespĺňala stanovenú hranicu zmeny expresie (tzv. fold change). Celkovú analýzu zahrňujúcu identifikované proteíny a ich zmenu v expresii

zobrazuje volcano plot na obrázku 1. Proteíny ktoré spĺňali stanovené kritériá sú zobrazené červenou (upregulácia) resp modrou farbou (downregulácia) identifikovaných proteínov v CD4+ T lymfocytoch pacientov s Luminal A karcinómom prsníka voči zdravej kontrole.

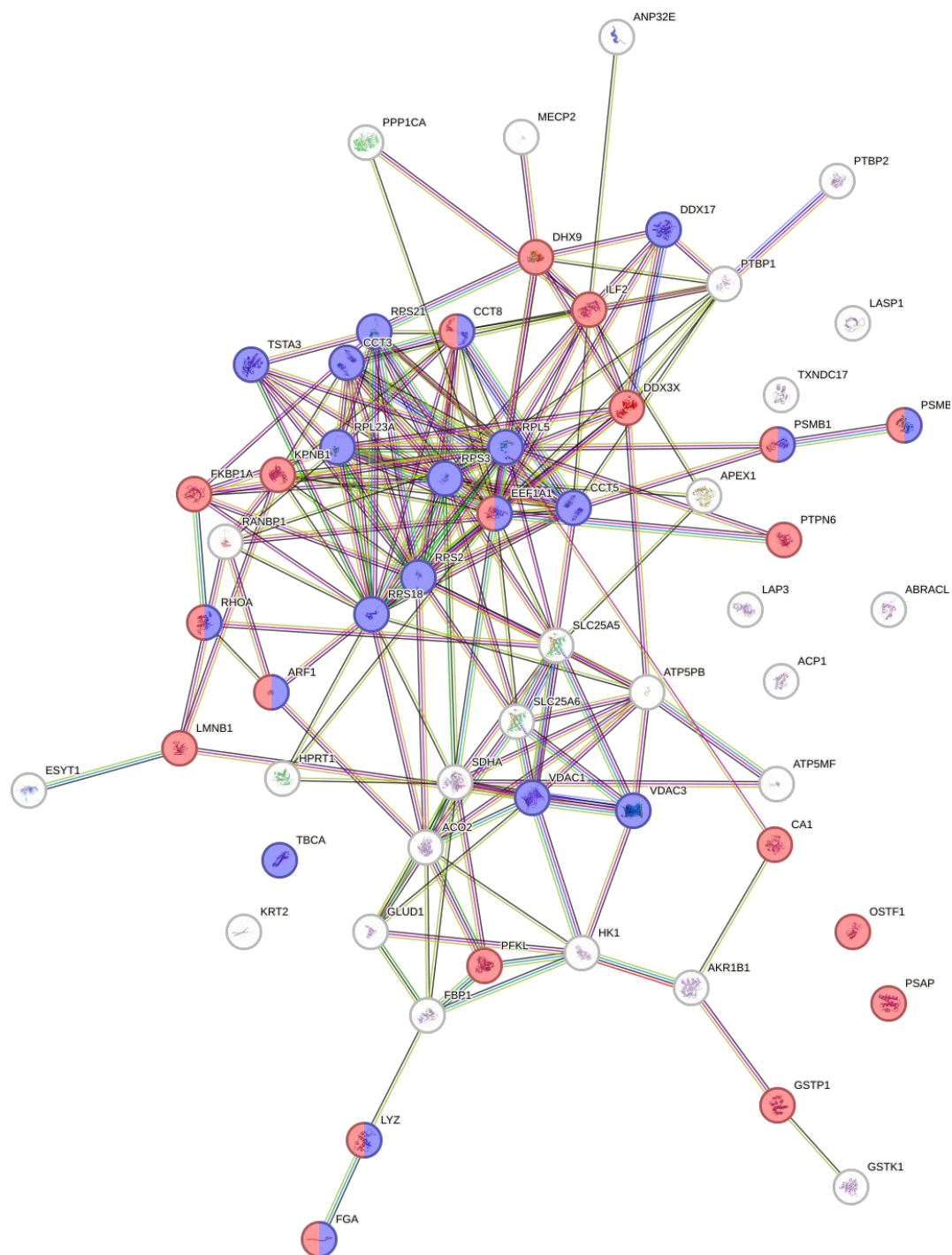


Obrázok 1 Volcano plot zobrazujúci štatisticky významné zmeny v expresii proteínov (násobná zmena relatívnej koncentrácie proteínu vyjadrená ako $\log_2 \text{fold change} \geq 2$ alebo ≤ -2 , hodnota významnosti t.j p-hodnota $< 0,05$ vyjadrená ako $-\log_{10} p$ hodnoty) vo vzorke CD4+T lymfocytov izolovaných z periférnej krvi pacientov s diagnostikovaným Luminal A podtypom karcinómu prsníka. Downregulovaná expresia proteínov je znázorná modrou farbou a upregulácia červenou farbou.

Všetkých 61 štatisticky významne zmenených proteínov bolo podrobených analýze proteín-proteínových interakcií. Analýza vykonaná pomocou string-db.org poukázala na zvýšený počet vzájomných interakcií medzi proteínmi v ktorých boli identifikované zmeny v expresii. Takáto zvýšená miera vzájomných proteín-proteínových interakcií naznačuje, že vybrané proteíny sú aspoň čiastočne biologicky prepojené ako skupina. Zobrazenie

týchto proteín-proteínových interakcií spolu so zobrazením ich funkčného zastúpenia v jednotlivých signálnych dráhach je znázornené na obrázku 2.

Z celkového počtu 61 proteínov bolo 21 proteínov zahrnutých v signálnej dráhe metabolizmu proteínov ($\text{FDR}=1,5^{-5}$) ktoré sú znázornené modrou farbou. Dvadsať proteínov znázornených červenou farbou pochádzalo zo signálnej dráhy imunitného systému ($\text{FDR}= 7,51^{-5}$).



Obrázok 2 Zobrazenie proteínových interakcií vybranej skupiny 61 identifikovaných štatisticky významne zmenených proteínov spolu so zobrazením ich funkčného zastúpenia v jednotlivých signálnych dráhach. Modrou farbou sú znázornené proteíny zahrnuté v signálnej dráhe metabolismu proteínov (Reactome pathway HSA – 392499) a červenou farbou sú znázornené proteíny súvisiace s imunitným systémom (Reactome pathway HSA – 168256).

Génová obohacovacia analýza

Génová obohacovacia analýza (GSE) spracovaná so štatisticky významne zmenených identifikovaných proteínov v stanovenej hladine významnosti ($p < 0,05$) poukázala na ovplyvnenie troch signálnych dráh u CD4+ T lymfocytov izolovaných z periférnej krvi pacientov s Luminal A podtypom karcinómu prsníka voči kontrolným

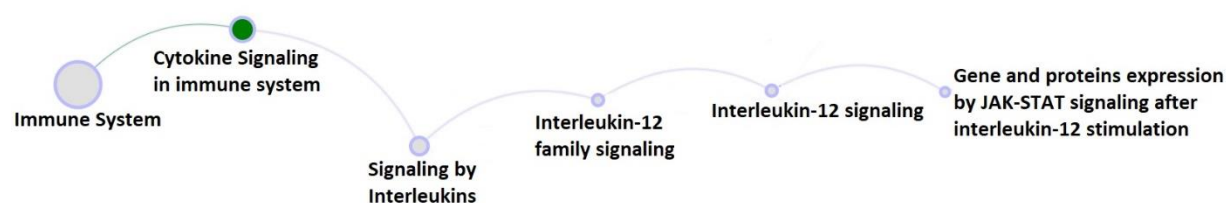
vzorkám. Konkrétne sa jedná o downreguláciu signálnych dráh imunitného systému spojených so signalizáciou interleukínmi, signálnej dráhy súvisiacej s prenosom signálu a signálnej dráhy posttranslačných proteínových modifikácií v CD4+ T lymfocytoch pri Luminal A podtype karcinómu prsníka (Tab. 2).

Názov signálnej dráhy	regulácia	p hodnota	počet identifikovaných génov	priemerný fold change
Cytokine Signaling in Immune system	Down	0,038	4	-2,295
Signal Transduction	Down	0,04	4	-2,292
Post-translational protein modification	Down	0,045	5	-2,029

Tabuľka 2 Signálne dráhy identifikované pomocou GSE analýzy v ktorých došlo k zmenám v expresii proteínov spĺňajúce interval spoľahlivosti $p < 0,05$. GSE analýza bola vykonaná pomocou online analytického nástroja dostupného na [Reactome / Pathway Browser](#)

Z týchto troch identifikovaných signálnych ciest bola na hladine štatistickej významnosti s hodnotou $p = 0,0388$ najlepšie popísaná signálna dráha imunitného systému spojená so signalizáciou interleukínmi. Celkovo v nej bolo

identifikovaných 6 entít a konkrétne 2 proteíny ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) a Lamin-B1 (LMNB1) ktoré sú zapojené priamo v signálnej dráhe interleukínu 12 (IL-12). Táto signálna dráha je znázornená na obrázku 3.



Obrázok 3 Zobrazenie signálnej dráhy interleukínu 12 v imunitnom systéme

Signálna dráha spojená s reverzibilnou hydrataciou oxidu uhličitého bola jedinou upregulovanou signálnou dráhou v CD4+T lymfocytoch izolovaných z periférnej krvi pacientov s Luminal A podtypom karcinómu prsníka voči kontrolným vzorkám ktorá však nespĺňala stanovenú hodnotu významnosti $p < 0,05$. Z tejto signálnej dráhy, ktorá sa skladá zo 17 entít bola upregulácia potvrdená len u karbonickej anhydrázy.

Diskusia

Z proteomickej analýzy CD4+ T lymfocytov izolovaných z periférnej krvi pacientov s Luminal A karcinómom prsníka a následnej analýze génového obohatenia bola identifikovaná downregulácia cytokínovej signalizácie v rámci imunitného systému. Signalizácia pomocou cytokínov je nevyhnutnou súčasťou pri diferenciácii naivných CD4+ T buniek na podtypy CD4+ T lymfocytov. Konkrétne pri downregulácii signálnej dráhy interleukínu 12 dochádza k obmedzeniu možnosti diferenciácie naivných CD4+ T buniek na podtyp Th1 CD4+ T lymfocytov. Th1 pomocné bunky sú pritom známe svojím proti nádorovým účinkom, konkrétne sú zodpovedné za inhibíciu angiogenézy a metastáz, indukciu starnutia a apoptózy rakovinových buniek ako aj indukcie krehkosti regulačných T buniek (Treg), subpopulácie CD4+ T lymfocytov. Vytvorené Th1 pomocné bunky zároveň produkujú efektorové cytokíny ako interleukín 2 (IL-2) a spätnou slučkou aj interferón

gamma (IFN- γ) ktorý je kľúčovým cytokínom v ďalšej polarizácii naivných CD4+ T buniek na Th1 bunky [10]. Interferón gama taktiež patrí medzi multifunkčné cytokíny a zohráva nezastúpiteľnú úlohu v systémovej a lokálnej imunite a podieľa sa pri takmer všetkých zápalových reakciách [6].

Pomocnými bunkami sekrétovaný IL-2 je pleiotropný cytokín zapojený do rôznych signálnych dráh. To umožňuje IL-2 kontrolovať diferenciáciu a homeostázu prozápalových aj protizápalových T buniek a je základom pre určenie molekulárnych detailov imunitnej regulácie. IL-2 receptor sa spája s tyrozínkinázami JAK a aktivuje transkripčné faktory STAT5. IL-2 je kľúčovým regulátorom metabolizmu T buniek avšak je aj čoraz jasnejšie, že v každej podskupine T buniek bude IL-2 signalizovať v rámci iných sietí prenosu signálu, ktoré budú spoločne formovať transkripčné a metabolické programy, ktoré určujú osud T buniek [8]. Mechanizmus, ktorý riadi rozhodovanie o osude buniek, závisí od integrácie viacerých spúšťaných signálov antigénovým receptorom T buniek (TCR), ktorý rozpoznáva vlastný alebo cudzí peptid spojený s molekulami hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) a radom cytokínových receptorov ktoré sú stimulované podľa cytokínov prítomných v extracelulárnom prostredí [3]. Zníženie citlivosti buniek na cytokínovú signalizáciu pochádzajúcu z extracelulárneho priestoru môže spôsobiť supresiu diferenciácie naivných CD4+ T buniek ktoré sa môžu diferencovať do viacerých efektorových podskupín

s odlišnými líniami a špecifickými imunitnými funkciami. Tieto pomocné Th bunky hrajú kľúčovú úlohu pri spúšťaní a formovaní adaptívnej imunitnej odozvy a pomáhajú organizovať obranu hostiteľa aj proti rôznym triedam patogénov. Okrem tohto signály pochádzajúcu z extracelulárneho priestoru môže okrem rozhodovania o osude buniek mať vplyv na kontrolu veľkosti T bunky, na efektorovú odpoveď a takto nastavujú rovnováhu medzi účinnými a patologickými imunitnými odpoveďami. Zároveň existujú dôkazy, že všetky Th bunky, snáď s jednou výnimkou, T_{reg} bunky, si po diferenciácii zachovávajú určitý stupeň plasticity efektorových buniek. To umožňuje prispôbenie sa imunitnej reakcie na meniace sa okolnosti na základe prichádzajúcich stimulačných alebo inhibičných stimulov.

S príchodom nových technológií môžeme súčasne merať tisíce proteínov a desiatky cytokínov spolu s inými markermi, ako sú tumor faktory (TF), integríny alebo chemokínové receptory už na úrovni jedinej bunky. Takáto citlivosť nám teoreticky dáva možnosť sledovať a kategorizovať každú jednu Th bunku na základe jednotlivých cytokínov alebo TF v konkrétnom čase. Zároveň je však nesmierne dôležité si uvedomiť, že takáto miera citlivosti so sebou prináša aj možné riziko prehliadnutia skutočnej komplexnej biológie a bunkového cieľa skrytého vo chvíľkovej expresii určitých cytokínov [12].

Summary

In current cancer research, special attention is focused on the complex interaction between the immune system

and the tumor. The presented work is focused on the proteomic analysis of CD4+ T lymphocytes isolated from the peripheral blood of patients with breast cancer, specifically the Luminal A subtype of breast cancer. By comparing the quantitative proteomic profiles of CD4+ T lymphocytes and control samples of healthy subjects, 61 proteins with differential expression in the compared groups were identified. Downregulation of proteins represented in cytokine signaling pathways in the immune system, specifically interleukin 12 (IL12) signaling as well as interferon signaling, was confirmed in the group of samples originating from the Luminal A subtype of breast cancer. Downregulation of the IL-12 signaling pathway, which is involved in the differentiation of naïve T cells into T helper cells, points to the direct involvement of CD4+ T lymphocytes in the interaction of the immune system with cancer.

The measured results indicate that the immunosuppressive environment of the tumor, in addition to directly suppressing the differentiation of naïve CD4+ T cells into Th1 cells with confirmed antitumor activity, also results in a reduction of the immune response using cytotoxic CD8+ T cells and natural killer cells (NK cells), as of the main factors of antitumor immunity due to the downregulation of signaling cytokines.

Práca bola finančne podporená grantom APVV-19-0476.

Literatúra

1. Balkwill, F. R., Capasso, M., Hagemann, T., The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science*, 125 (23), 2012, 5591-5596.
2. Basu, A., Ramamoorthi, G., Albert, G., Gallen, C., Beyer, A., Snyder, C., Koski, G., Disis I, M., Czerniecki, B, J., Kodumudi, K.: Differentiation and Regulation of TH Cells A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology.*, 12, 2021, article 669474.
3. Cui Yang., Normal and pathological functions of the T cell signaling protein, THEMIS, in CD4+ T cells., *Immunology. Université Paul Sabatier - Toulouse III*, 2021.
4. Geginat, J., Paroni, M., Maglie, S., Alfen, J.S., Kastirr, I., Gruarin, P., De Simone, M., Pagani, M., Abrignani, S., Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Front. Immunol.*, 5, 2014, 630.
5. Hwang, J.R., Byeon, Y., Kim, D., Park, S.G., Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp. Mol. Med.*, 52, 2020, s. 750-761.
6. Mandai, M., Hamanishi, J., Abiko, K., Matsumura, N., Baba, T., Konishi, I.: Dual Faces of IFN γ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Proand Antitumor Immunity, *Clinical Canc. Res.*, 22 (10), 2016, 2329 – 2334.
7. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., Forsthuber, T.G., T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74, 2015, 5–17.
8. Ross, H.S., Cantrell, A.D.: Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 36, 2018, 411-433
9. Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Cortes, J.: Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(21), 2020, 2020-2031.
10. Speiser D.E., Chijoke, O., Schaeuble, K., Munz, Ch.: CD4+ T cells in cancer. *Nature Cancer*, 4, 2023, 317- 329.
11. Subbannayya, Y., Haug M., Pinto M, S., Mohanty V., Meas Z. H., Flo H.T., Prasad T.S.K., Kandasamy K.R.: *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 2020, 275
12. Tuzlak, S., Dejean, A.S., Iannacone, M., Francisco, J.Q., Waisman, A., Ginhoux, F., Korn, T., Becher, B.: Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help, *Nature Immunology*, 22, 2021, 1210 – 1217.

Zmeny proteómu monocytov CD14 periférnej krvi u pacientok s Luminal A podtypom karcinómu prsníka

Dávid Tóth¹, Lule Tomiq¹, Gabriel Lipčei¹, Peter Urdzík¹, Michaela Šulíková², Martin Menkyna³,
Mária Kacírová³, Soňa Tkáčiková², Ivan Talian², Peter Bober², Marek Lenárt⁴, Ján Sabo^{2*}

¹Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, ²Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ³Medipark, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ⁴I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, * korešp. autor

Rakovina prsníka je podľa GLOBOCAN 2020 u žien najčastejšie diagnostikovanou malignitou vo svete a hlavnou príčinou úmrtia u žien na zhubné ochorenie. Predstavuje výzvu pre novú éru vysoko integrovanej presnej diagnostiky a personalizovanej onkomedicíny. Výskyt rakoviny prsníka narastá vo všetkých regiónoch sveta. Z tohto dôvodu, napriek pokroku v jeho detekcii a liečbe, ktorý sa premieňa do znižovania úmrtnosti, sa zdá byť potrebné hľadať nové terapeutické metódy, prediktívne a prognostické faktory.

Výsledky mnohých štúdií viedli k záveru, že progresia rakoviny indukuje systémové imunitné zmeny u hostiteľa. V periférnej krvi a lymfoidných orgánoch pacientov s rakovinou boli identifikované zmeny v počte a funkcii imunitných buniek - imunocytov. Progresia malignity je komplikovaný proces regulovaný interakciami medzi bunkami nádoru a imunitného systému prostredníctvom bunkových a molekulárnych faktorov v organizme a mikroprostredí nádoru.

Proteomické technológie produkujú dôležité údaje pri diagnostike rakoviny prsníka, objavovaní a overovaní prognostických a prediktívnych biomarkerov, zisťujú genetické aberácie na úrovni proteómu, popisujú funkčné a regulačné dráhy a zdôrazňujú špecifické proteínové a peptidové profily v ľudských tkanivách, biologických tekutinách, bunkových líniiach a zvieracích modeloch. Pomáhajú identifikovať rôzne podtypy rakoviny prsníka a expresiu špecifických proteínov a proteoforiem, posúdiť účinnosť terapie rakoviny na bunkovej a tkanivovej úrovni, či dokonca identifikovať nové terapeutické cieľové proteíny.

Táto štúdia je zameraná na zmeny v expresii proteínov imunocytov so znakom CD14 u pacientiek s karcinómom prsníka (Luminal A) v porovnaní so zdravou populáciou, ktoré boli kvantifikované pomocou proteomických metód. Najsignifikantnejší nárast sme pozorovali u plectínu (PLEC), gelsolínu (GSN), matrixovej metaloproteinázy 9 (MMP9) a ABRA C - terminálneho proteínu (ABRACL/MSP9). Bližšie skúmanie týchto proteínov môže mať v budúcnosti vplyv v imunoterapeutickom výskume, včasnej predikcii a prognóze ochorenia.

Kľúčové slová: rakovina prsníka, proteomika, monocyty, makrofágy

Keywords: breast cancer, proteomics, monocytes, macrophages

Úvod

Rakovina prsníka je najčastejšie diagnostikovaným malígnym ochorením u žien na celom svete s viac ako 2 miliónmi nových prípadov ročne. Výskyt sa za posledné tri desaťročia zvýšil v dôsledku screeningu a včasnej diagnostiky, ako aj zmenami profilov rizikových faktorov. Na základe hladín génovej expzie mRNA možno karcinóm prsníka rozdeliť na 4 základné molekulárne podtypy - luminal A, luminal B, HER2-obohatený a triplne negatívny (TNBC). Molekulárne podtypy poskytujú pohľad na nové liečebné stratégie a stratifikácie pacientov, ktoré následne ovplyvňujú ich manažment. Liečba rakoviny prsníka zahŕňa multimodálny prístup integrujúci chirurgiu, rádioterapiu a systémovú liečbu. Tieto terapeutické prístupy však nemôžu zabrániť vzniku rakoviny prsníka a sú používané len v prípade výskytu ochorenia. Iba komplexné pochopenie molekulárnych mechanizmov tumorigenézy a progresívny vývoj účinných prístupov môže výrazne zlepšiť diagnostické a terapeutické výsledky [3, 7, 11].

Vrodená imunita ovplyvňuje primárny vývoj nádoru, rast, angiogénzu a šírenie metastáz [8, 16]. Monocyty sú

heterogénnou populáciou myeloidných buniek exprimujúcich vysoké hladiny povrchových proteínov CD14 (klasické), CD16 (neklasické) alebo oboch markerov (stredné). Klasické monocyty cirkulujú v krvi, kde prechádzajú konverziou na hliadkujúce monocyty, podliehajú apoptóze alebo transmigrujú cez endotelové tkanivá. V tkanivách si monocyty môžu zachovať väčšinu svojho transkripcného profilu, získať schopnosť prezentovať antigén a diferencovať sa na makrofágy, dendritické bunky alebo supresorové bunky odvodené od monocytových myeloidov. Makrofágy sú často klasifikované ako M1 makrofágy s proinflatórnym účinkom a M2 makrofágy s antiinflatórnym účinkom, uľahčujúce remodeláciu a hojenie rán [20].

Pri solídnych nádoroch tvoria 5-40 % nádorovej hmoty makrofágy spojené s nádorom (TAM). Predstavujú najčastejšie funkčne aktívne bunky vrodenej imunity v mikroprostredí tumoru [4]. Existuje korelácia medzi počtom TAM a zlou prognózou v závislosti od typu nádoru. TAM sa zvyčajne podobajú makrofágom M2. Na rozdiel od M1-makrofágov, ktoré majú prozápalové a protirakovinové funkcie, M2-makrofágy pôsobia imunosupresívne, prispievajú k remodelácii extracelulárnej matrix a tým podporujú

rast nádoru [15]. Faktory mikroprostredia nádoru vrátane hypoxie, cytokínov a rastových faktorov produkovaných nádorovými bunkami asistujú v nábore monocytov do nádorového tkaniva a ich diferenciácii smerom k makrofágom podobným M2. Cirkulujúce monocyty sú prekurzormi väčšiny TAM, ktoré kontrolujú rast nádoru a jeho schopnosť zakladať vzdialené metastázy. Existuje vysoká korelácia proliferujúcich TAM a nízkym prežívaním pacientov v dôsledku vysokej malignity nádoru. Vo väčšine malignít, vrátane rakoviny prsníka, pľúc, prostaty a vaječníkov, TAM výrazne podporujú progresiu nádoru [8].

V článku porovnávame zmeny proteínovej expresie vybraných proteínov v CD14 monocytoch v periférnej krvi u pacientiek s karcinómom prsníka v porovnaní so zdravou populáciou. Cieľom je potvrdiť, že expresia proteínov vyskytujúcich sa v monocyto- makrofágovom systéme môže byť ovplyvnená prítomnosťou karcinómu prsníka.

Materiál a metódy

Vzorky periférnej krvi boli odobrané od novo diagnostikovaných pacientok s karcinómom prsníka (KP) pred začatím akejkolvek terapie kvôli minimalizácii potenciálnych proteomických zmien vyvolaných terapiou. Štúdia bola vedená v zhode s Helsinskou deklaráciou a bola schválená Etickou komisiou LF UPJŠ v Košiciach, protokol kód 9N/2021, dátum schválenia 17. 6. 2021, Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura 2020/EK/06047, dátum schválenia 25. 6. 2020, a Etickou komisiou Východoslovenského onkologického ústavu a.s., protokol kód EK/1/06/2020, dátum schválenia 1. 6. 2020. Randomizované vzorky periférnej krvi z kontrolnej skupiny zdravých subjektov boli získané z Gynekologicko-pôrodníckej kliniky LF UPJŠ a UN LP v Košiciach, vzorky s TNBC boli odobraté na I. chirurgickej klinike LF UPJŠ a UN LP v Košiciach. Informovaný súhlas (2020/EK/06407) bol získaný písomne od žien v oboch skupinách, kontrolnej skupine a skupine s rakovinou prsníka (podtyp Luminal A). Všetky vzorky boli získané v období od júna 2022 do marca 2023. Bolo použitých 10 vzoriek kontrolných vzoriek zdravých subjektov (bez nádorového ochorenia) s priemerným vekom 69 rokov (v rozmedzí 38-84 rokov), 5 vzoriek od pacientok s rakovinou prsníka podtypom Luminal A s priemerným vekom 64 rokov (v rozmedzí 56-76 rokov). Výber pacientov s diagnózou karcinóm prsníka, podtyp Luminál A, bol uskutočnený na základe imunohistochemických výsledkov akreditovaným laboratóriom Ústavu patológie UPJŠ LF a UNLP v Košiciach, číslo registrácie 158/Q-044, certifikovaným podľa ISO 9001:2025, s platnosťou certifikátu do apríla 2026. Akreditácia bola udelená Slovenskou národnou akreditačnou službou (SNAS).

Jednotlivým pacientom bolo odobraných 10 ml venóznej krvi. Krv bola následne zriedená s 20 ml izolačného roztoku (2 mmol EDTA+PBS+BSA) a centrifugovaná pri 600 x g počas 10 min pri 4 °C. Po centrifugácii sme odstránili vrchnú časť plazmy, tak aby vrstva buniek PBMC a erytro-

cytov ostala neporušená. Do tejto dvojvrstvy sa postupne pridávali magnetické guľičky s jednotlivým CD14 znakom (Invitrogen Dynabeads, Thermo Fisher Scientific, homogenita izolovanej populácie CD14 podľa výrobcu 98 % - 100 %) CD14, za účelom separácie subpopulácie mononukleárných leukocytov z periférnej krvi (PBMC). Po pridaní CD14 guľičiek do skúmavky so zriedenou krvou došlo k inkubácii po dobu 20 min pri 4 °C v Hulamixéri. Po inkubácii magnetické guľičky spolu s bunkami s príslušným CD znakom boli odseparované magnetom v magnetickom stojane. Supernatant (zriedená krv bez buniek s CD14 znakom) bol pipetorom odstránený do novej skúmavky. Magnetické guľičky s naviazaným CD14 znakom boli 3 krát premývané izolačným roztokom. Po ukončení premývania buniek, bolo k magnetickým guľičkám pridané 400 µl 50 mM NH₄HCO₃. Všetky štyri subpopulácie PBMC boli sonifikované a vortexované v striedavom cykle. Sonifikovalo sa v ultrazvukovej vani (f = 37 kHz, t = 15 min) a ultrazvukovom bloku (γ = 85 %, t = 15 min), vzorky boli vortexované 5 min v chladničke. Následne zo všetkých vzoriek boli magnetické guľičky odseparované magnetom. Každá vzorka sa delila na 3 frakcie. Prvá frakcia činila 200 µl supernatantu vzorky a 1800 µl etanolu, kde počas noci pri -20 °C došlo k zrážaniu. Druhá frakcia bola len samotná vzorka – supernatant odobraný z magnetických guľičiek, uskladnená v chladničke. Tretiu frakciu predstavovali magnetické guľičky, ktoré boli odseparované v magnetickom stojane a k nim sme pridali 120 µl invitrosolu. S touto frakciou sa zopakoval cyklus sonifikovania a vortexovania. Po skončení tohto cyklu, tento typ frakcií bol inkubovaný cez noc v termomixéri pri 21 °C.

Na druhý deň frakcie s jednotlivými subpopuláciami PBMC, ktoré boli cez noc zrážané s etanolom boli centrifugované počas 20 min pri 18 000 g a 4 °C. Po centrifugácii bol etanolový supernatant odstránený a pelet vysušený. Do vysušeného peletu sa pridalo 150 µl 50 mM NH₄HCO₃. Magnetické guľičky s CD14 znakom, boli cez noc inkubované s invitrosolom a následne boli odstránené na magnetickom stojane. V ďalšom kroku boli stanovená koncentrácia proteínov pomocou BCA metódy. Pri insolúcia digescii boli k vzorkám pridané požadované objemy 0,025 M roztoku DTT a boli inkubované v termomixéri pri 60 °C po dobu 30 minút. Ku vzorkám boli pridané výpočtom stanovené objemy 0,25 M roztoku IAA a boli inkubované v termomixéri v tme, pri 21 °C a po dobu 30 minút. Napokon boli pridané vypočítané objemy 5 mM roztoku CaCl₂ a bol pridaný trypsín v pomere - trypsín: vzorka = 1 : 40 (w/w). Vzorky boli inkubované počas noci pri 21 °C.

Následujúci deň boli vzorky okyslené na pH 2 až 3 pridaním 20 % kyseliny mravečej. Všetky vzorky boli upravené na požadované objemy buď odparovaním v SpeedVacu alebo pridaným loading roztokom. Vzorky boli centrifugované (20 min., 18 000xg, 4 °C) a merané pomocou metódy LC-MS na hmotnostnom spektrometri - iónová pasca (Amazon speed ETD, Bruker Daltonics).

LC-MS/MS analýza

Pre LC/MS experiment sme použili UHPLC systém (Ultimate 3000 RSLC Nano, Thermo Fisher Scientific) a hmotnostný spektrometer iónovej pasce (amaZon speed ETD s iónovým zdrojom CaptiveSpray, Bruker Daltonik). V kroku prípravy vzorky kvapalinovej chromatografie sa použila metóda zachytávania a eluovania. 1 ug peptidov z izolovaných lymfocytov (5 ul injikovanej vzorky s koncentráciou 0,2 ug/ul) sa naniesol a zachytil na zachytávacej kolóne Acclaim® PepMap C18 (100 um x 2 cm, veľkosť častíc 5 um, pór 100 Å veľkosť) pred elúciou a separáciou na analytickej kolóne PepMap RSLC C18 na ďalšiu analýzu (75 um x 30 cm, veľkosť častíc 3 um, veľkosť pórov 100 Å). Ako nanášací roztok sa použila 98 % voda a 2 % acetonitril s 0,1 % kyselinou mravčou. Prietok pri nanášaní vzorky bol 8 ul/min. Elučný proces zahŕňal použitie dvoch mobilných fáz s rôznym zložením: mobilná fáza A pozostávala z 90 % vody a 10 % acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravčej, zatiaľ čo mobilná fáza B pozostávala z 95 % acetonitrilu a 5 % vody s 0,1 % kyselina mravčia. Elučný gradient začína s pomerom 96 % A a 4 % B počas prvých 5 minút. Počas nasledujúcich 90 minút sa pomer mobilnej fázy B postupne lineárnym spôsobom zvyšoval zo 4 % na 35 %. Potom sa uskutočnilo 10-minútové premývanie kolóny s použitím 90 % B, nasledované 15-minútovou reekvilibráciou kolóny s 4 % B. Počas celého elučného gradientu sa prietok udržiaval na 0,3 ul/min. Analýza hmotnostnou spektrometriou s použitím elektrosprejovej ionizácie (ESI) sa uskutočnila na eluovaných peptidoch. Parametre MS skenovania použité v experimente boli nasledovné: bol zvolený kladný iónový móď so skenmi so zvýšeným rozlíšením a kontrolou iónového náboja (ICC) nastavenou na 400 000. Maximálny čas akumulácie bol 50 ms a analyzovaný rozsah m/z sa pohyboval od 300 do 1300. Okrem toho boli nastavenia parametrov skenovania MS/MS nastavené na nasledujúce hodnoty: režim s vysokým rozlíšením, cieľový ICC nastavený na 500 000, maximálny čas akumulácie 100 ms a šírkou izolácie 2,2 m/z. Identifikácia proteínov sa uskutoč-

nila použitím vyhľadávacieho algoritmu Mascot (Matrix Science, verzia 2.4.0) spolu s databázou SwissProt (verzia 2020_02). Kritériá vyhľadávania boli nasledovné: taxonómia bola obmedzená na Homo sapiens (človek), trypsin bol použitý ako enzým, karbamidometylácia cysteínu (C) bola nastavená ako fixná modifikácia a oxidácia metionínu (M) bola povolená ako premenná modifikácia. Boli povolené až dve chybné štiepenia a do úvahy sa brali len peptidy s nabitými stavmi +2 a +3 a minimálnou dĺžkou 3.

Štatistické metódy

Uskutočnila sa kvantitatívna proteomická analýza (bez značenia) CD4+ T-lymfocytov periférnej krvi Luminal A karcinómu prsníka v porovnaní s kontrolnou skupinou. Na vyhodnotenie beta-binomického testu sa použili vážené spektrálne počty a na výpočet p-hodnoty sa použil balík BetaBinomial 1.2 R softvéru Proline Studio (Catalfamo, M.; Henkart, P.A. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. Curr. Opin. Immunol. 2003, 15, 522–527) a nominálna hodnota $p < 0,05$.

Výsledky

Na analýzu bolo celkovo použitých 15 vzoriek z toho 10 zdravých abudantov a 5 chorých pacientiek s Luminal A subtypom karcinómu prsníka. Použitím kvantitatívnej metódy bez označenia (spektrálny počet) sa uskutočnila proteomická analýza CD14+ T-lymfocytmi izolovanými z periférnej krvi pomocou nano-HPLC a ESI-MS hmotnostného spektrometra s iónovou pascou. Diferenciálna expresia proteínov CD14+ T-lymfocytov podtypu kaarcinómu prsníka Luminal A a zdravých jedincov bola analyzovaná na základe kvantitatívneho profilovania proteínov. V skupine karcinómu prsníka Luminal A a kontrolnej skupine bolo celkovo identifikovaných 515 proteínov z toho signifikantne zmenených ($\log_2FC \geq 1.5$ or ≤ -1.5 , $p\text{-value} < 0.05$) bolo 33 proteínov (Tab. 1). 1 proteín bol down regulovaný a 32 proteínov bolo up regulovaných. Na vyhodnotenie signálnych dráh sme použili STRING a KEGG databázy.

Skratka proteínu	Proteín	Logaritmická násobná zmena (log ratio)
H2A1B_HUMAN	Histone H2A type 1-B/E	-1,5486
PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	1,5305
APOBR_HUMAN	Apolipoprotein B receptor	1,5406
HXK3_HUMAN	Hexokinase-3	1,5475
GMFG_HUMAN	Glia maturation factor gamma	1,585
IGHG4_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	1,585
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	1,6146
RPN2_HUMAN	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2	1,6781
F16P1_HUMAN	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	1,7137
ASC_HUMAN	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	1,737
TCP4_HUMAN	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	1,737
ML12A_HUMAN	Myosin regulatory light chain 12A	1,7447
MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	1,7472
MYL1_HUMAN	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	1,7655

COPG1_HUMAN	Coatomer subunit gamma-1	1,7655
RAP1A_HUMAN	Ras-related protein Rap-1A	1,8074
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	1,8851
ANXA3_HUMAN	Annexin A3	1,9005
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	1,9125
CAH1_HUMAN	Carbonic anhydrase 1	1,9156
KCD12_HUMAN	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	1,9175
MCUR1_HUMAN	Talin-1	1,9798
EF2_HUMAN	Elongation factor 2	2
CD44_HUMAN	CD44 antigen	2,0704
FKBP1A_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	2,0995
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta	2,1064
TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2,1155
ITAM_HUMAN	Integrin alpha-M	2,152
GELS_HUMAN	Gelsolin	2,1783
SUMO2_HUMAN	Small ubiquitin-related modifier 2	2,263
MMP9_HUMAN	Matrix metalloproteinase-9	2,2801
ABRAL_HUMAN	Costars family protein ABRACL	2,433
PLEC_HUMAN	Plectin	2,4594

Tabuľka 1 Signifikantne zmenené proteíny ($\log_2FC \geq 1.5$ or ≤ -1.5 , $p\text{-value} < 0.05$) získané porovnaním skupín Luminal A versus kontrola. Proteíny sú zoradené vzostupne. Histón H2A typ 1-B/E je jediným down regulovaným proteínom. Zvyšných 32 proteínov je up regulovaných. Najsignifikantnejšie zmeny sme pozorovali u plectínu, aktín viažuceho Rho aktivujúceho C - terminálneho proteínu, matrixovej metaloproteinázy 9, malého modifikátora súvisiaceho s ubiquitínom 2 (SUMO2) a gelsolínu.

Diskusia

V článku sme pomocou proteomických techník analyzovali zmeny vybraných proteínov v monocyto – makrofágovom systéme periférnej krvi pacientiek s karcinómom prsníka v porovnaní s kontrolnou skupinou. Periférna krv predstavuje cennú vzorku na proteomickú analýzu s minimálnou invazivitou, vysokou reprodukovateľnosťou a minimálnym dyskomfortom pre pacienta.

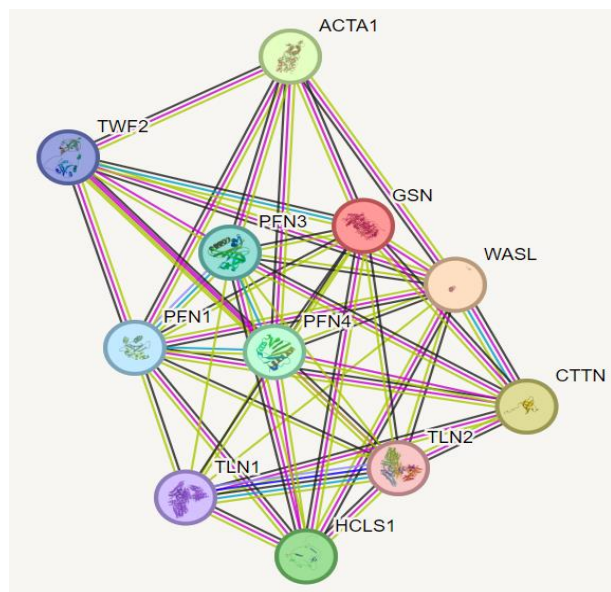
Ludský monocytový diferenciačný antigén CD14 bol prvým identifikovaným vzorkovým receptorom viažúcim sa priamo na lipopolysacharidy. V literatúre sa často používa ako marker kmeňových buniek. Je známy aj ako koreceptor pre niekoľko Toll-like receptorov (TLR). Prenáša produkty bakteriálnej bunkovej steny do TLR, aby zapojil signálnu kaskádu na bunkovom povrchu aj v endozomálnom kompartmente, a tým sprostredkoval pohotovú reakciu vrodenej (nešpecifickej) imunity na infekciu alebo poranenie vedúce k poškodeniu buniek. Okrem toho bola potvrdená jeho úloha pri regulácii rakoviny, aterosklerózy a metabolických ochorení [10].

Monocyty periférnej krvi sú hlavným zdrojom makrofágov spojených s nádorom (TAM). Infiltrácia TAM je spojená s horším klinickým výsledkom pri rakovine prsníka a mnohých ďalších typoch rakoviny [24]. V štúdií sme sa v dôsledku vyššie spomínaných asociácií zamerali na bunky monocyto - makrofágového systému so znakom CD14 a hľadali najsignifikantnejšie zmeny v expresii ich proteínov.

Štúdium proteómu, t.j. proteínového komplementu genómu, predstavuje spôsob, ako získať viac informácií o expresii proteínov a modifikácii proteínov v bunkách, tkanivách a organizmoch. Pomocou proteomických techník je možná systematická a simultánna analýza proteínov exprimovaných určitým typom bunky alebo tkaniva. Proteomické technológie tiež umožňujú merať množstvo proteínov, charakterizovať posttranslačné modifikácie (PTM) a študovať proteínovú štruktúru a interakcie. V porovnaní so statickým genómom je ľudský proteóm rozmanitejší, pretože pozostáva z odhadovaných 500 000 proteínových izoform odvođených z približne 20 000 génov kódujúcich proteín [2]. Tento veľký nárast proteínovej diverzity je do značnej miery spôsobený alternatívnym zostrihom a PTM proteínov. Genómové technológie môžu poskytnúť iba statické informácie, pretože nie všetky génom kódované proteíny sú exprimované vždy a vo všetkých typoch buniek. Okrem toho je možné nájsť len slabú koreláciu medzi úrovňami množstva transkriptov a proteínov. Všetky tieto fakty naznačujú, že proteomické aplikácie možno použiť na preklenutie priepasti medzi genómovými informáciami a funkčnými proteínmi [12]. Z rovnakého dôvodu boli použité v našom výskume.

Gelsolín (GSN) (Obr. 1) je najhojnejším proteínom viažúcim aktín v ľudskom tele. Ovplyvňuje cytoskeletálny remodeling, apoptózu, diferenciáciu, pohyb a morfológiu buniek. Jeho proteínová expresia varíuje u mnohých patologických stavov, vrátane neurodegeneratívnych ochorení, zápalov a nádorov. Baig a kolektív uvádza súvislosť medzi zníženou expresiou GSN a zvýšeným rizikom

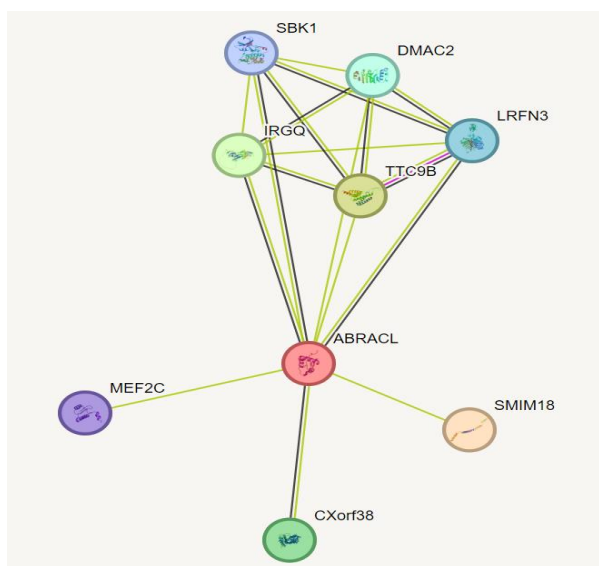
karcinómu prsníka [1], zatiaľčo zvýšená expresia GSN je v iných štúdiách spojená s horšou prognózou rakoviny prsníka, pľúc a kččka maternice [28]. Nízka expresia GSN u pacientov s rakovinou hrubého čreva je priaznivým faktorom, ktorý zlepšuje prognózu. Dôvodom je spomalenie migrácie malígnych buniek kolorektálneho karcinómu a stagnácia ich bunkového cyklu [7]. Wang a kolektív v recentnej štúdii z roku 2023 potvrdili gelsolín ako excelentný biomarker na diferenciáciu pacientiek s karcinómom prsníka a zdravej populácie [25]. V našej štúdii bola expresia gelsolínu 2,17 - násobne vyššia u pacientiek s karcinómom prsníka ako u pacientiek bez ochorenia.



Obrázok 1 Gelsolín a jeho interakcie. Gelsolín je vápnikom regulovaný, aktín-modulujúci proteín, ktorý sa viaže na kladné konce aktínových monomérov alebo filamentov, čím bráni výmene monomérov. Môže podporovať spájanie monomérov do filamentov (nukleáciu), ako aj prerušovať už vytvorené filamente. Hrá úlohu v ciliogenéze. Na obrázku sú znázornené jeho interakcie s ďalšími proteínmi. Skratky: GSN - gelsolín, ACTA1 - aktín, TWF-2 - twinfilín, PFN1-4 - profilín 1-4, WASL - neurálny proteín Wiskott - Aldrichovho syndrómu, CTTN - kortaktín, TLN1-2 - talín 1-2, HCLS1 - bunkovo špecifický proteín hematopoetickej línie [23]

Aktín viažuci Rho aktivujúci C - terminálny proteín (ABRACL) (Obr. 2), v minulosti známy aj ako HSPC280, patrí do novej rodiny proteínov s nízkou molekulovou hmotnosťou. Jeho hlavnou funkciou je regulácia dynamiky aktínu a migrácie buniek, čím ovplyvňuje ich proliferáciu a pohyb. Výsledky štúdií potvrdili, že expresia ABRACL je signifikantne zvýšená pri rakovine žalúdka a hrubého čreva. Zároveň jeho zvýšená expresia koreluje s horšou prognózou ochorení [6, 24]. Li a kolektív v štúdii z roku 2022 dokázali, že ABRACL by mohol byť transkripčne regulovaný pomocou MYBL protoonkogénu a podporovať malígne biologické správanie v bunkách rakoviny prsníka [11]. Regulácia ABRACL môže byť v budúcnosti potenciálne využitá pri liečbe rakoviny prsníka. Expresia proteínu ABRACL bola v našej štúdii 2,4 - násobne vyššia u pacien-

tiek s rakovinou prsníka ako v kontrolnej skupine zdravých žien.

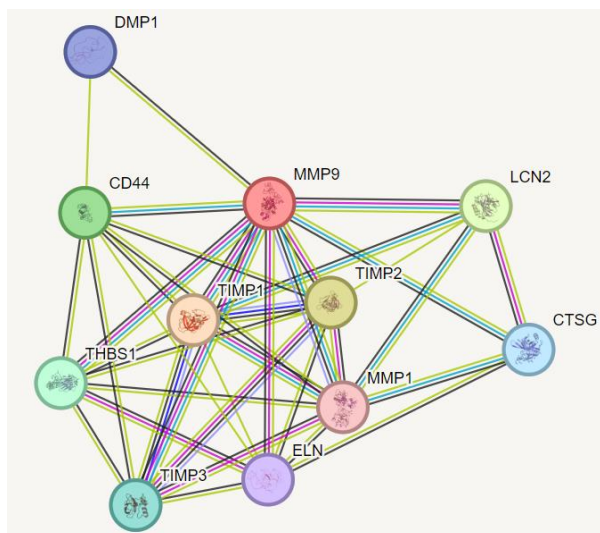


Obrázok 2 Aktín viažuci Rho aktivujúci C - terminálny proteín (ABRACL) a jeho interakcie. Úloha ABRACL v ľudskom organizme nie je úplne objasnená, predpokladá sa, že sa podieľa na regulácii procesov aktínových filament. Skratky: MEF2C - enhancer 2C špecifický pre monocyty, CXorf38 - necharakteristický proteín CXorf38, SMIM18 - malý membránový integrálny proteín 18, SBK1 - serínová proteínkináza 1, DMAC2 - distálny membránový komplexný proteín 2, LRFN3 - proteín 3 obsahujúci doménu obohatenú o leucín a fibronektín typu III, IRGQ - proteín rodiny Q GTPázy súvisiaci s imunitou, TTC9B - tetratrikopeptidová opakujúca sa doména 9B [23]

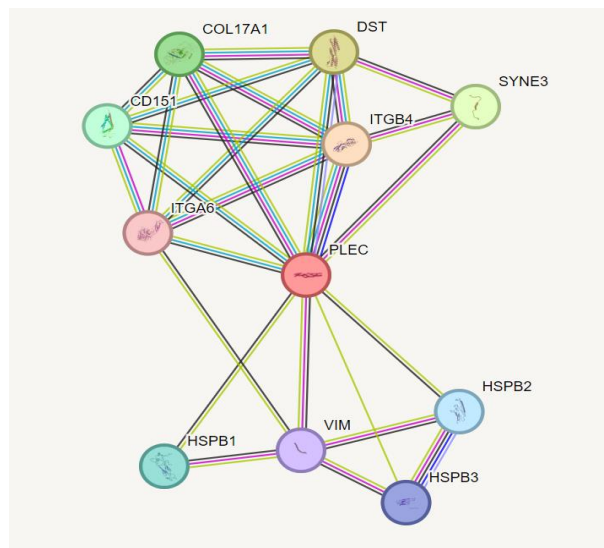
Matrixové metaloproteinázy (MMP) degradujú proteíny v extracelulárnej matrix svojou endopeptidázovou aktivitou. Ich expresia je zvýšená takmer pri všetkých typoch rakoviny a je spojená s rôznymi dôležitými aspektmi jej progresie, vrátane proliferácie, invázie, epitelovo - mezenchýmalnej transformácie, metastázy a angiogenézy. MMP sú často asociované so zlou prognózou ochorenia pre pacientov. Medrad a kolektív demonštrovali na vzorke 38 žien s karcinómom prsníka rôzneho stupňa zvýšenú expresiu MMP-9 v 97,5 % prípadov. Zároveň dokázali, že rozdielna expresia MMP9 (Obr. 3) signifikantne korelovala s histologickým stupňom a celkovým prežívaním pacientiek [15]. Jiang a kolektív na vzorke 6517 pacientov s karcinómom prsníka demonštrovali kratšie celkové prežívanie u žien s overexpresiou MMP-9 [8]. V našom prípade bola expresia MMP-9 u postihnutých žien zvýšená 2,28-násobne.

Plektín (PLEC) (Obr. 4) je cytoskeletálny proteín objavený pred vyše štyrmi dekadami, ktorý sa bežne vyskytuje v bunkách a tkanivách cicavcov [27]. Doposiaľ bolo identifikovaných minimálne 12 izoform plektínu. Z dôvodu tejto diverzity možno plektín nájsť v rôznych lokalizáciách v závislosti od typu buniek (hemidesmozómy, fokálne adhézie, bunkové jadro, bunkové membrány, mitochondrie), kde zastávajú rozličné funkcie (organizácia

buniek, signálna transdukcia). Okrem jeho fyziologickej funkcie sa objavilo viacero štúdií, ktoré uvádzajú, že plektín účinkuje aj ako protumorogénny regulátor proliferácie, migrácie a invázie rakovinových buniek [2, 21]. Najmä atypická lokalizácia a expresia plektínu pri špecifických typoch onkologických ochorení poukázala na možnosť jeho využitia ako onkomarkera pre prognózu a výskyt ochorenia, napríklad v prípade rakoviny pankreasu, vaječníkov, pľúc, prostaty a nádorov hlavy a krku. Pлектín bol identifikovaný ako interakčný partner proteínu BRCA2 (breast cancer susceptibility protein 2), ktorý má zásadnú úlohu pri oprave poškodennej DNA a duplikácii centrozómov [16, 19]. Expresia plektínu u žien s karcinómom prsníka bola v našej štúdií 2,45 násobne zvýšená v porovnaní s jeho expresiou v kontrolnej skupine. Výsledok teda koreloval s upreguláciou plektínu pri karcinóme prsníka, hepatocelulárneho karcinómu, cholangiokarcinómu, karcinómu obličiek z jasných buniek, karcinómu hlavy a krku a karcinómu štítnej žľazy v iných štúdiách [20].



Obrázok 3 Matrixová metaloproteináza 9 (MMP9) a jej interakcie. MMP9 môže plniť zásadnú úlohu pri lokálnej proteolyze extracelulárnej matrix a pri migrácii leukocytov. Plní tiež rôzne funkcie pri kostnej osteoklastickej resorpcii. Skratky: DMP1 - kyslý fosfoproteín dentínovej matrix, CD44 - CD44 antigén, LCN2 - lipokalín asociovaný s gelatinázou neutrofilov, TIMP1-3 - metaloproteinázový inhibítor 1 -3, MMP1 - matrixová metaloproteináza 1, THBS1 - trombospondín 1, CTSG - katepsín G, ELN - elastín [23]



Obrázok 4 Pлектín (PLEC) a jeho interakcie. Pлектín prepája intermediárne filamenty s mikrotubulami a mikrofilamentami a ukotvuje intermediárne filamenty k desmozómom alebo hemidesmozómom. Môže tiež viazať svalové proteíny, ako je aktín, na membránové komplexy vo svaloch. Skratky: COL17A1 - kolagén 17 alfa 1, DST - dystonín, SYNE3 - nesprín 3, CD151 - CD151 antigén, ITGB4 - integrín beta 4, ITGA6 - integrín alfa 6, HSPB1-3 - proteín tepelného šoku beta 1-3, VIM - vimentín [23]

Summary

Breast cancer is one of the most common malignancy worldwide and the main cause of death in women from a malignant disease. It represents a challenge for a new era of highly integrated precision diagnostics and personalized oncology. The incidence of breast cancer is increasing in all regions of the world. For this reason, despite progress in its detection and treatment, which is reflected in the reduction of mortality, it seems necessary to search for new therapeutic methods, predictive and prognostic factors.

The results of many studies have led to the conclusion that cancer progression induces systemic immune changes in the host. Changes in the number and function of immune cells - immunocytes - have been identified in the peripheral blood and lymphoid organs of cancer patients. Malignancy progression is a complicated process regulated by interactions between tumor cells and the immune system through cellular and molecular factors in the organism and tumor microenvironment.

Proteomic technologies produce important data in breast cancer diagnosis, discover and validate prognostic and predictive biomarkers, detect genetic aberrations at the proteome level, describe functional and regulatory pathways, and highlight specific protein and peptide profiles in human tissues, biological fluids, cell lines, and animal models. They help to identify different subtypes of breast cancer and the expression of specific proteins and proteoforms, assess the effectiveness of cancer therapy at the

cellular and tissue level, or identify new therapeutic target proteins.

This article is focused on the changes in the protein expression of CD14-marked immunocytes in breast cancer patients compared to the healthy population, which were quantified using proteomic methods. We observed the most significant increase in plectin, gelsolin, matrix metallopro-

teinase 9 (MM9) and ABRA C - terminal protein (ABRACL). A closer examination of these proteins may have an impact in the future of immunotherapeutic research, early prediction and prognosis of the disease.

Tento výskum bol financovaný Agentúrou na podporu výskumu a vývoja APVV-19-0476.

Literatúra

- Baig, R. M., Mahjabeen, I., Sabir, M., Masood, N., Ali, K., Malik, F. A., et al. Mutational spectrum of Gelsolin and its down regulation is associated with breast cancer. *Disease markers*, 34 (2), 2013, s. 71 – 80.
- Buckup, M., Rice, M. A., Hsu, E. C., Garcia-Marques, F., Liu, S., Aslan, M. et al. Plectin is a regulator of prostate cancer growth and metastasis. *Oncogene* 40 (3), 2021, s. 663 – 676.
- Ezkurdia, I., Juan, D., Rodriguez, J. M., Frankish, A., Diekhans, M., Harrow, J., et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Human molecular genetics*, 23 (22), 2014, s. 5866 – 5878.
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology*, 8 (5), 2007, s. 1-17.
- Hinshaw, D. C., Shevde, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer research*, 79 (18), 2019, s. 4557–4566.
- Hsiao, B. Y., Chen, C. H., Chi, H. Y., Yen, P. R., Yu, Y. Z., Lin, C. H., et al. Human Costars Family Protein ABRACL Modulates Actin Dynamics and Cell Migration and Associates with Tumorigenic Growth. *Int J Mol Sci*, 22 (4), 2021, s. 2037.
- Huang, C. Y., Lee, K. C. Tung, S. Y. Huang, W. S. Teng, C. C., Lee, K. F. 2D-DIGE-MS Proteomics Approaches for Identification of Gelsolin and Peroxiredoxin 4 with Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancers*, 14, 2022, 3189.
- Jiang, H., Li, H., Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer*, 21(1), 2021, s. 149 – 162.
- Johnson, K. S., Conant, E., F., Soo, M., S. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists, *Journal of Breast Imaging*, 3 (1), 2021, s. 12 – 24
- Larionova, I., Tuguzbaeva, G., Ponomaryova, A., Stakheyeva, M., Cherdyntseva, N., Pavlov, V. et al. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol*. 10, 2020, s. 1 - 34.
- Li, J., Chen, H., Actin-binding Rho activating C-terminal like (ABRACL) transcriptionally regulated by MYB proto-oncogene like 2 (MYBL2) promotes the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Bioengineered*, 13 (4), 2022, s. 9019–9031.
- Lobba, A. R., Forni, M. F., Carreira, A. C., & Sogayar, M. C. Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines. *Cytometry A*, 81 (12), 2012, s. 1084 – 1091.
- Łukasiewicz, S., Czelelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., Stanisławek, A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, 13 (17), 2021, 4287
- Maes, E., Cho, W. C., Baggerman, G. Translating clinical proteomics: the importance of study design. *Expert review of proteomics*, 12 (3), 2015, s. 217 – 219.
- Merdad, A., Karim, S., Schulten, H. J., Dallol, A., Buhmeida, A., Al-Thubaity, F., Gari, M. A., Chaudhary, A. G., Abuzenadah, A. M., & Al-Qahtani, M. H., Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer research*, 34 (3), 2014, s. 1355 – 1366.
- Niwa, T., Saito, H., Imajoh-ohmi, S., Kaminishi, M., Seto, Y., Miki, Y., et al. BRCA2 interacts with the cytoskeletal linker protein plectin to form a complex controlling centrosome localization. *Cancer science*, 100 (11), 2009, s. 2115–2125.
- Olingy, C. E., Dinh, H. Q., Hedrick, C. C.. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *Journal of leukocyte biology*, 106 (2), 2019, s. 309 – 322.
- Patysheva, M., Frolova, A., Larionova, I., Afanas'ev, S., Tarasova, A., Cherdyntseva, N., et al. Monocyte programming by cancer therapy. *Frontiers in immunology*, 13, 2022, s. 1 - 21.
- Perez, S. M., Brinton, L. T., Kelly, K. A. Plectin in Cancer: From Biomarker to Therapeutic Target. *Cells*, 10 (9), 2021, s. 2246 - 2272.
- Rao, M.M.V., Likith, M., Kavya, R., Hariprasad T. P. N., Plectin as a putative novel biomarker for breast cancer: an in silico study. *Netw Model Anal Health Inform Bioinforma*, 11 (49), 2022, s. 91 – 97.
- Shin, S. J., Smith, J. A., Reznicek, G. A., Pan, S., Chen, R., Brentnall, T. A., et al. Unexpected gain of function for the scaffolding protein plectin due to mislocalization in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (48), 2013, s. 19414–19419.
- Smolag, K. I., Mueni, C. M., Leandersson, K., Jirström, K., Hagerling, C., Mörgelin, M., et al.: Complement inhibitor factor H expressed by breast cancer cells differentiates CD14+ human monocytes into immunosuppressive macrophages. *Oncoimmunology*, 9 (1), 2020, s. 1-16.
- voľne dostupné na <https://string-db.org/>
- Wang, D., Liu, H., Ren, C., et al. High expression of ABRACL is associated with tumorigenesis and affects clinical outcome in gastric cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*. 23 (2), 2019, s. 91– 97.
- Wang, Y., Bi, X., Luo, Z., Wang, H., Ismtula, D., Guo, C. Gelsolin: A comprehensive pan-cancer analysis of potential prognosis, diagnostic, and immune biomarkers. *Frontiers in genetics*, 14, 2023, s. 1 – 22.
- Wang, L., Simons, D. L., Lu, X., Tu, T. Y., Avalos, C., Chang, A. Y., et al. Breast cancer induces systemic immune changes on cytokine signaling in peripheral blood monocytes and lymphocytes. *EBioMedicine*, 52, 2020, s. 1 – 15.
- Wiche, G., Castañón, M. J. Intermediate Filament Linker Proteins: Plectin and BPAG1. In *Encyclopedia of Biological Chemistry III*, 3rd ed.; Jez, J., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, 2021; s. 200–219. ISBN 978-0-12-822040-5.
- Zhu, W. Y., Hunag, Y. Y., Liu, X. G., He, J. Y., Chen, D. D., Zeng, F., et al. Prognostic evaluation of CapG, gelsolin, P-gp, GSTP1, and Topo-II proteins in non-small cell lung cancer. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 295 (2), 2012, s. 208–214.

Analýza proteínov subpopulácie CD4 T-lymfocytov periférnej krvi pacientok s karcinómom prsníka luminál B

Michaela Šulíková¹, Peter Bober¹, Jozef Parnica¹, Martin Menkyna¹, Mária Kacírová², Miroslav Marcin¹,
Dávid Tóth³, Marek Lenárt⁴, Dominik Šafčák⁵, Ján Sabo^{1*}

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, ²Medipark, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ³Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, Košice, ⁴I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, ⁵Klinika rádioterapie a onkológie UPJŠ LF a VOÚ a.s., Košice, * korešp. autor

Karcinóm prsníka stáva sa jedným z najčastejších onkologických ochorení u žien. V štúdií sme sa zamerali na analýzu signálnych dráh v cirkulujúcich CD4+ T-lymfocytoch pacientok s karcinómom prsníka typu luminal B. Analýza výsledkov odhalila zmeny v koncentráciách proteínov, ktoré sú súčasťou signálnej dráhy spliceozómu. Pomocou kvantitatívnej proteomickej LC-MS analýzy s použitím MASCOT databázy ($FDR \leq 1$, $score \leq 36$) bolo identifikovaných celkovo 810 proteínov. Na základe proteínových interakcií (použitím STRING softvéru; verzia 11.5) bola potvrdená spliceozómová signálna dráha (KEGG_hsa03040), kde bolo identifikovaných 20 proteínov. Výsledky našej štúdie korelujú s údajmi z literatúry, že pri karcinóme prsníka dochádza k nepresnému zostrihu intrónov a teda začínajú sa tvoriť chybné proteíny. Na určenie podielu chybných proteínov na vzniku a progresii karcinómu prsníka sú potrebné ďalšie multiómické štúdie.

Kľúčové slová: CD4+ T-bunky, proteín, signálna dráha, spliceozóm, karcinóm prsníka

Keywords: CD4+ T-cells, protein, signaling pathway, spliceosome, breast cancer

Úvod

Pri karcinóme prsníka dochádza k abnormálnemu a nekontrolovateľnému rastu buniek v tkanivách prsníka [5]. Karcinómové bunky prsníka začínajú rásť vo vnútri mliečnych kanálikov alebo lalokov prsníka produkujúcich mlieko. Najskoršia forma karcinómu nie je životu ohrozujúca. Avšak karcinómové bunky sa môžu šíriť do okolitého tkaniva preniká a vytvárajú sa nádory, ktoré sú zodpovedné za nahmatateľné zhrubnutia tkaniva [1].

Nádory je možné zaradiť do nasledovných typov podľa expresie estrogénových, progesteronových receptorov, expresii receptoru HER2, mitotickej aktivity určovanej proteínom Ki67: **na luminálny typ A** (ER viac ako 80 %, PgR viac ako 80 %, HER2 negatívne, Ki67 menej 20 %), **luminálny typ B, podtyp1** (ER menej ako 20 %, PgR menej ako 20 %, HER2 negatívny, Ki67 viac ako 20 %), **luminálny typ B, podtyp2** (ER menej ako 20 %, PgR menej ako 20 %, HER2 pozitívny, Ki67 viac ako 20 %), **triple negatívny** (ER negatívny, PgR negatívny, HER2 negatívny), **HER2 pozitívny** (ER negatívny, PgR negatívny, HER2 pozitívny) [6, 7].

Jednou z hlavných výziev pre liečbu karcinómov je ich heterogénny charakter, ktorý určuje terapeutické možnosti. Luminálne typy karcinómov majú za základ liečbu endokrinnú terapiu, ktorá blokuje účinky hormónu alebo znižuje hladinu hormónu. Odporúča sa sekvenčné podávanie endokrinné liečby až do indikácie chemoterapie [11]. Metastatické luminálne karcinómy si môžu vyvinúť rezistenciu na štandardné hormonálne terapie, ktorá bola sprostredkovaná genómovými zmenami a/alebo up-

reguláciou iných signálnych dráh. Preto sa vývoj nových látok zameria na zvrátenie rezistencie na hormonálne terapie [12].

Pre karcinóm typu HER2+ je možné použiť niekoľko molekulárnych cieľných liečiv samostatne alebo v kombinácii s chemoterapiou. Zahŕňajú (i) trastuzumab (anti-HER2 monoklonálna protilátka); (ii) pertuzumab (anti-HER2 monoklonálna protilátka s iným väzbovým miestom na HER2 ako trastuzumab); (iii) ado-trastuzumab emtanzín, konjugát protilátka-cytotoxická látka pozostávajúci z trastuzumabu spojeného s inhibítorom mikrotubulov s malou molekulou (emtanzín); (iv) lapatinib, duálny inhibítor tyrozínkinázy (TKI), ktorý prerušuje obe dráhy HER2 a receptora epidermálneho rastového faktora (EGFR) + trastuzumab deruxtecan (štúdia DESTINY BREAST 03, tucatinib (štúdia HER2CLIMB), Margetuximab (štúdia SOPHIA), neratinib (štúdia NALA). Pacienti s karcinómom prsníka sú testovaní na amplifikáciu génu HER2 alebo nadmernú expresiu proteínu, aby sa určilo, či by im prospela liečba anti-HER2 [12].

Triple negatívne karcinómy prsníka sú agresívnejšie a ťažšie liečiteľné ako vyššie spomínané karcinómy. Nedostatok expresie ER, PR a HER2 vylučuje hormonálnu terapiu a komplikuje použitie cieľných terapií pri pokročilom triple negatívnom karcinóme. V tomto prípade zostáva základom liečby štandardná chemoterapia zvyčajne taxánmi, antracyklínmi, karboplatinou s alebo bez bevacizumabu (rekombinantná humanizovaná monoklonálna protilátka proti vaskulárnemu endotelovému rastovému faktoru (VEGF) [2]. Spomedzi všetkých podtypov karcinómov prsníka má triple negatívny karcinóm najmenšie terapeutické možnosti v dôsledku nedostatku

dobře definovaných molekulárných cieľov [12]. V tejto práci sme sa zamerali na karcinóm lumenálny typ B. Tento podtyp karcinómu v porovnaní s lumenálnym typom A karcinómom je náročnejší na liečbu a súčasne priebeh ochorenia je agresívnejší. Zo všetkých karcinómov prsníka lumenálny B tvorí 20 % [8]. Vzhľadom na to, že CD4+ T lymfocyty hrajú ústrednú úlohu pri koordinácii adaptívnych imunitných reakcií na miestach epitelu uvoľňovaním širokého spektra cytokínov, regulujú aktivitu iných imunitných buniek. Subpopulácia Th1 CD4+ T lymfocytov sprostredkúva imunitu proti pokročilým karcinómom cez produkciu iných zápalových mediátorov, ktoré sa priamo zameriavajú na rakovinové bunky [4].

Materiál a metódy

Štúdia bola vedená v zhode s Helsinskou deklaráciou a bola schválená Etickou komisiou LF UPJŠ v Košiciach, protokol kód 9N/2021, dátum schválenia 17. 6. 2021, Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura 2020/EK/06047, dátum schválenia 25. 6. 2020, a Etickou komisiou Východoslovenského onkologického ústavu a. s., protokol kód EK/1/06/2020, dátum schválenia 1. 6. 2020. Randomizované vzorky periférnej krvi z kontrolnej skupiny zdravých subjektov boli získané z Gynekologicko-pôrodníckej kliniky LF UPJŠ a UN LP v Košiciach, vzorky s TNBC boli odobraté na I. chirurgickej klinike LF UPJŠ a UN LP v Košiciach. Informovaný súhlas (2020/EK/06407) bol získaný písomne od žien v oboch skupinách, kontrolnej skupine a skupine s rakovinou prsníka (podtyp Lumenálny A). Všetky vzorky boli získané v období od júna 2022 do marca 2023. Bolo použitých 10 vzoriek kontrolných vzoriek zdravých subjektov (bez nádorového ochorenia) s priemerným vekom 69 rokov (v rozmedzí 38-84 rokov), 5 vzoriek od pacientok s rakovinou prsníka podtypom Lumenálny B s priemerným vekom 64 rokov (v rozmedzí 56-76 rokov). Výber pacientov s diagnózou karcinóm prsníka, podtyp Lumenálny A, bol uskutočnený na základe imunohistochemických výsledkov akreditovaným laboratóriom Ústavu patológie UPJŠ LF a UNLP v Košiciach, číslo registrácie 158/Q-044, certifikovaným podľa ISO 9001:2025, s platnosťou certifikátu do apríla 2026. Akreditácia bola udelená Slovenskou národnou akreditačnou službou (SNAS).

Jednotlivým pacientom a kontrolnej skupine bolo odobraných 10 ml periférnej krvi do skúmaviek BD Vacutainer K2EDTA, ochladených na 4 °C a spracovaných do 30 minút od získania. Následne bola krv zriedená s 20 ml izolačného roztoku (2 mmol EDTA+PBS+BSA) a centrifugovaná pri 600 G počas 10 min pri 4 °C. Po centrifugácii sme odstránili vrchnú časť plazmy, tak aby vrstva buniek PBMC a erytrocytov ostala neporušená. Do tejto dvojvrstvy sa pridávali magnetické guľičky s CD4+ znakom ((Invitrogen Dynabeads, Thermo Fisher Scientific, homogenita izolovanej populácie CD4+ podľa výrobcu 98 % - 100 %) za účelom separácie subpopulácie leukocytov. Po pridaní CD4+ guľičiek do skúmavky so zriedenou krvou došlo k inkubácii po dobu 20 min pri 4 °C v Hulamixéri. Po inkubácii, magne-

tické guľičky spolu s bunkami s príslušným CD4+ znakom boli odseparované magnetom v magnetickom stojane. Magnetické guľičky s naviazaným CD4+ znakom boli 3 krát premývané izolačným roztokom. Po ukončení premývania buniek, bolo k magnetickým guľičkám pridané 400 µl 50 mM NH₄HCO₃. Subpopulácia leukocytov bola sonifikovaná a vortexovaná v striedavom cykle. Sonifikovalo sa v ultrazvukovej vani (f= 37 kHz, t= 15 min) a ultrazvukovom bloku (γ = 85 %, t = 15 min), vzorka bola vortexovaná 5 min v chladničke. Následne boli zo vzorky odseparované magnetické guľičky pomocou magnetu. Každá vzorka sa delila na 3 frakcie. Prvá frakcia činila 200 µl supernatantu vzorky a 1800 µl etanolu, kde počas noci pri -20 °C došlo k zrážaniu proteínov. Druhá frakcia bola len samotná vzorka – supernatant odobraný z magnetických guľičiek, uskladnená v chladničke. Tretiu frakciu predstavovali magnetické guľičky, ktoré boli odseparované v magnetickom stojane a k nim sme pridali 100 µl invitrosolu. Stouto frakciou sa zopakoval cyklus sonifikovania a vortexovania. Po skončení tohto cyklu, tento typ frakcií bol inkubovaný cez noc v termomixéri pri 21 °C. Druhý deň frakcie s jednotlivými subpopuláciami leukocytov, ktoré boli cez noc zrážané s etanolom, sa následne centrifugovali počas 20 min pri 18 000 g a 4 °C. Po centrifugácii bol etanolový supernatant odstránený a pelet vysušený. Do vysušeného peletu sa pridalo 150 µl 50 mM NH₄HCO₃. Magnetické guľičky s CD4+ znakom (cez noc inkubované s invitrosolom) boli odstránené na magnetickom stojane.

V ďalšom kroku boli stanovené koncentrácie všetkých frakcií s CD4+ znakom pomocou BCA metódy. Pri insolubilizácii boli k vzorkám pridané požadované objemy 0,025 M roztoku DTT a boli inkubované v termomixéri pri 60 °C po dobu 30 minút. Ku vzorkám boli pridané výpočtom stanovené objemy 0,25 M roztoku IAA a boli inkubované v termomixéri v tme, pri 21 °C a po dobu 30 minút. Napokon boli pridané vypočítané objemy 5 mM roztoku CaCl₂ a bol pridaný trypsin v pomere - trypsin: vzorka = 1 : 40 (w/w). Vzorky boli inkubované počas noci pri 21 °C. Nasledujúci deň boli vzorky okyslené na pH = 2 až 3 pridaním 20 % kyseliny mravčej. Všetky vzorky boli upravené na požadované objemy buď odparovaním v SpeedVacu alebo pridaným loading roztokom. Vzorky boli centrifugované (20 min., 18 000xg, 4 °C) a merané pomocou metódy LC-MS na hmotnostnom spektrometri - iónová pasca (Amazon speed ETD, Bruker Daltonics).

LC-MS/MS analýza (vyhľadávanie v databáze): pre LC/MS experiment sme použili UHPLC systém (Ultimate 3000 RSLC Nano, Thermo Fisher Scientific) a hmotnostný spektrometer iónovej pasce (amazon speed ETD s iónovým zdrojom CaptiveSpray, Bruker Daltonik). V kroku prípravy vzorky kvapalinovej chromatografie sa použila metóda zachytávania a eluovania. 1 µg peptidov z izolovaných lymfocytov (5 µl injikovanej vzorky s koncentráciou 0,2 µg/µl) sa naniesol a zachytil na zachytávacej kolóne Acclaim® PepMap C18 (100 µm x 2 cm, veľkosť častíc 5 µm, pór 100 Å veľkosť) pred elúciou a separáciou na analytickej kolóne PepMap RSLC C18 na ďalšiu analýzu

(75 µm x 30 cm, veľkosť častíc 3 µm, veľkosť pórov 100 Å). Ako nanášací roztok sa použila 98 % voda a 2 % acetonitril s 0,1 % kyselinou mravčou. Prietok pri nanášaní vzorky bol 8 µl/min. Elučný proces zahŕňal použitie dvoch mobilných fáz s rôznym zložením: mobilná fáza A pozostávala z 90 % vody a 10 % acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravčej, zatiaľ čo mobilná fáza B pozostávala z 95 % acetonitrilu a 5 % vody s 0,1 % kyselina mravčia. Elučný gradient začínal s pomerom 96 % A a 4 % B počas prvých 5 minút. Počas nasledujúcich 90 minút sa pomer mobilnej fázy B postupne lineárnym spôsobom zvyšoval zo 4 % na 35 %. Potom sa uskutočnilo 10-minútové premývanie kolóny s použitím 90 % B, nasledované 15-minútovou reekvilibráciou kolóny s 4 % B. Počas celého elučného gradientu sa prietok udržiaval na 0,3 µl/min. Analýza hmotnostnou spektrometriou s použitím elektrosprejovej ionizácie (ESI) sa uskutočnila na eluovaných peptidoch. Parametre MS skenovania použité v experimente boli nasledovné: bol zvolený kladný iónový mód so skenmi so zvýšeným rozlíšením a kontrolou iónového náboja (ICC) nastavenou na 400 000. Maximálny čas akumulácie bol 50 ms a analyzovaný rozsah m/z sa pohyboval od 300 do 1300. Okrem toho boli nastavenia parametrov skenovania MS/MS nastavené

na nasledujúce hodnoty: režim s vysokým rozlíšením, cieľový ICC nastavený na 500 000, maximálny čas akumulácie 100 ms a šírkou izolácie 2,2 m/z. Identifikácia proteínov sa uskutočnila použitím vyhľadávacieho algoritmu Mascot (Matrix Science, verzia 2.4.0) spolu s databázou SwissProt (verzia 2020_02). Kritériá vyhľadávania boli nasledovné: taxonómia bola obmedzená na Homo sapiens (človek), trypsin bol použitý ako enzým, karbamido-metylácia cysteínu (C) bola nastavená ako fixná modifikácia a oxidácia metionínu (M) bola povolená ako premenná modifikácia. Boli povolené až dve chybné štiepenia a do úvahy sa brali len peptidy s nabitými stavmi +2 a +3 a minimálnou dĺžkou 3.

Štatistické metódy: uskutočnila sa kvantifikačná analýza CD4+ T-lymfocytov proteínov v kontrolnej skupine a skupine s benígnym nádorom prsníka. Na vyhodnotenie beta-binomického testu sa použili vážené spektrálne počty a na výpočet p-hodnoty pre každú sadu proteínov sa použil balík BetaBinomial 1.2 R softvéru Proline Studio (Catalfamo, M.; Henkart, P.A. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. Curr. Opin. Immunol. 2003, 15, 522–527) a nominálna hodnota $p < 0,05$.

Proteínová sada	Popis	Binomická p-hodnota	Násobky zmeny Log2	-log10 (binomická P-hodnota)
K2C1_HUMAN	Keratín, typu II	0,0456	1,6654	1,341
K1C10_HUMAN	Keratín, typu I	0,0201	2,954	1,6958
DX39B_HUMAN	Spliceozóm RNA helikáza	0,0093	-2,1581	2,0332
PERM_HUMAN	Myeloperoxidáza	0,0021	2,6919	2,6879
K2C5_HUMAN	Keratín, typu II	0,0115	1,5635	1,9396
SFPQ_HUMAN	Zostrihový/Splicing faktor	0,0245	-2,1403	1,6109
RL12_HUMAN	60S ribozomálny proteín	0,0061	-1,9773	2,215
VDAC1_HUMAN	Napätovo závislý aniónovo selektívny kanálový proteín 1	0,0033	-2,4594	2,4772
VDAC3_HUMAN	Napätovo závislý aniónovo selektívny kanálový proteín	0,033	-1,9069	1,4814
ALDR_HUMAN	Aldo-ketoreduktázová rodina 1 člen B1	0,0223	-2,1375	1,6517
THIO_HUMAN	Thioredoxín	0,0056	-2,2668	2,2549
PRDX5_HUMAN	Peroxiredoxin-5, mitochondriálny	0,0064	-1,8826	2,193
EF1G_HUMAN	Faktor predĺženia 1-gama	0,0048	-1,7105	2,3198
B2MG_HUMAN	Beta-2-mikroglobulín	0,0148	-2,4215	1,8286
IF5A1_HUMAN	Eukaryotický translačný iniciačný faktor	0,016	-2,0297	1,7956
AT5F1_HUMAN	Komplex ATP syntázy F(0) podjednotka B1, mitochondriálna	1,34E-04	-2,511	3,8744
BAF_HUMAN	Faktor bariéry proti autointegrácii	0,0366	1,663	1,4363

Tabuľka 1 Zoznam up a down-regulovaných proteínov CD4+ Luminál B karcinómu prsníka. Zoznam proteínov zahŕňa iba tie proteíny, ktoré spĺňajú podmienky, binomická hodnota $P \leq 0,05$ a abs (Log2) $\geq 1,5$. Kladná hodnota (Log2 - benígny / zdravý) signalizuje up reguláciu a záporná hodnota signalizuje down-reguláciu daného proteínu.

Výsledky

Použitím kvantitatívnej metódy bez označenia (spektrálny počet) sa uskutočnila proteomická analýza CD4+ T-lymfocytov izolovaných z periférnej krvi pomocou nano-HPLC a ESI-MS hmotnostného spektrometra s iónovou

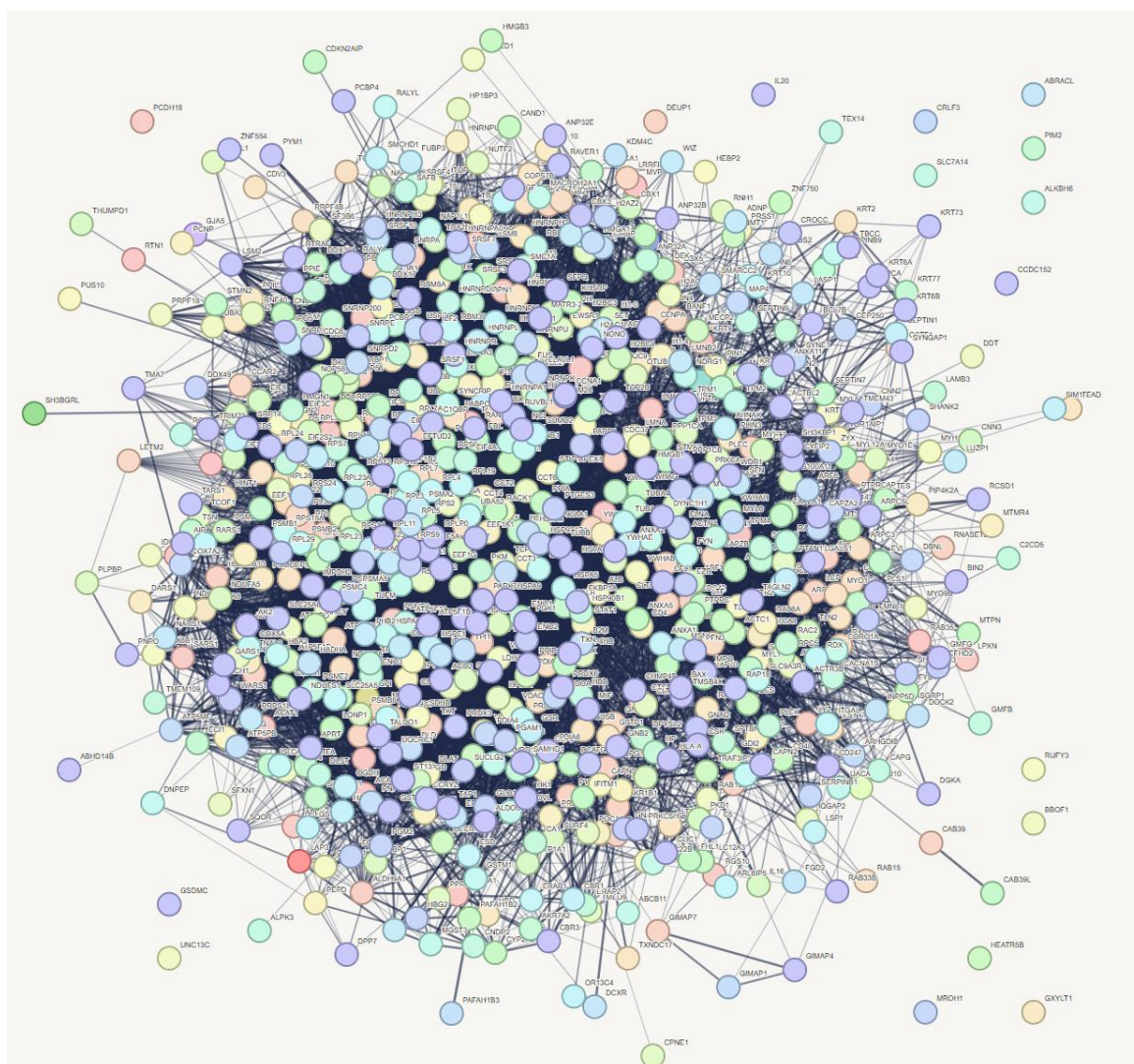
pascou. Diferenciálna expresia proteínov CD4+ T-lymfocytov podtypu karcinómu prsníka Luminal B a zdravých jedincov bola analyzovaná na základe kvantitatívneho profilovania proteínov. Vo vzorkách bolo identifikovaných 810 proteínov, z toho 18 signifikantne zmenených ($\log_2FC \geq 1.5$ or ≤ -1.5 , $p\text{-value} < 0.05$) – 12 proteínov bolo down-

regulovaných a 6 proteínov bolo up regulovaných. Zoznam týchto proteínov je v tabuľke 1. Na vyhodnotenie signálnych dráh sme použili STRING a KEGG databázy.

Diskusia

Z nameraných dát sme vygenerovali proteín proteínové interakcie pomocou softvéru STRING ktoré môžeme vidieť na Obr. 1. V našej štúdiu sa nám podarilo verifikovať skutočnosť, že pri karcinóme prsníka dochádza k regulácii signálnej dráhy spliceozómu. Úlohou spliceozómov v orga-

nizme je zostrihovať resp. vystrihovať intróny (nekódujúce sekvencie) z pre-mRNA, tak aby ostali len kódujúce sekvencie - exóny [14]. Preto táto signálna dráha je dôležitá pri tvorbe funkčných proteínov v organizme. Ak táto dráha nefunguje správne, tak bude dochádzať k tvorbe disfunkčných proteínov. Signálna dráha spliceozómu hsa03040 je zobrazená na Obr. 2. V obrázku je aj zahrnuté vyznačenie up a down-regulovaných proteínov. Up-regulované proteíny sú zobrazené červenou farbou a down-regulované proteíny sú zobrazené zelenou farbou.

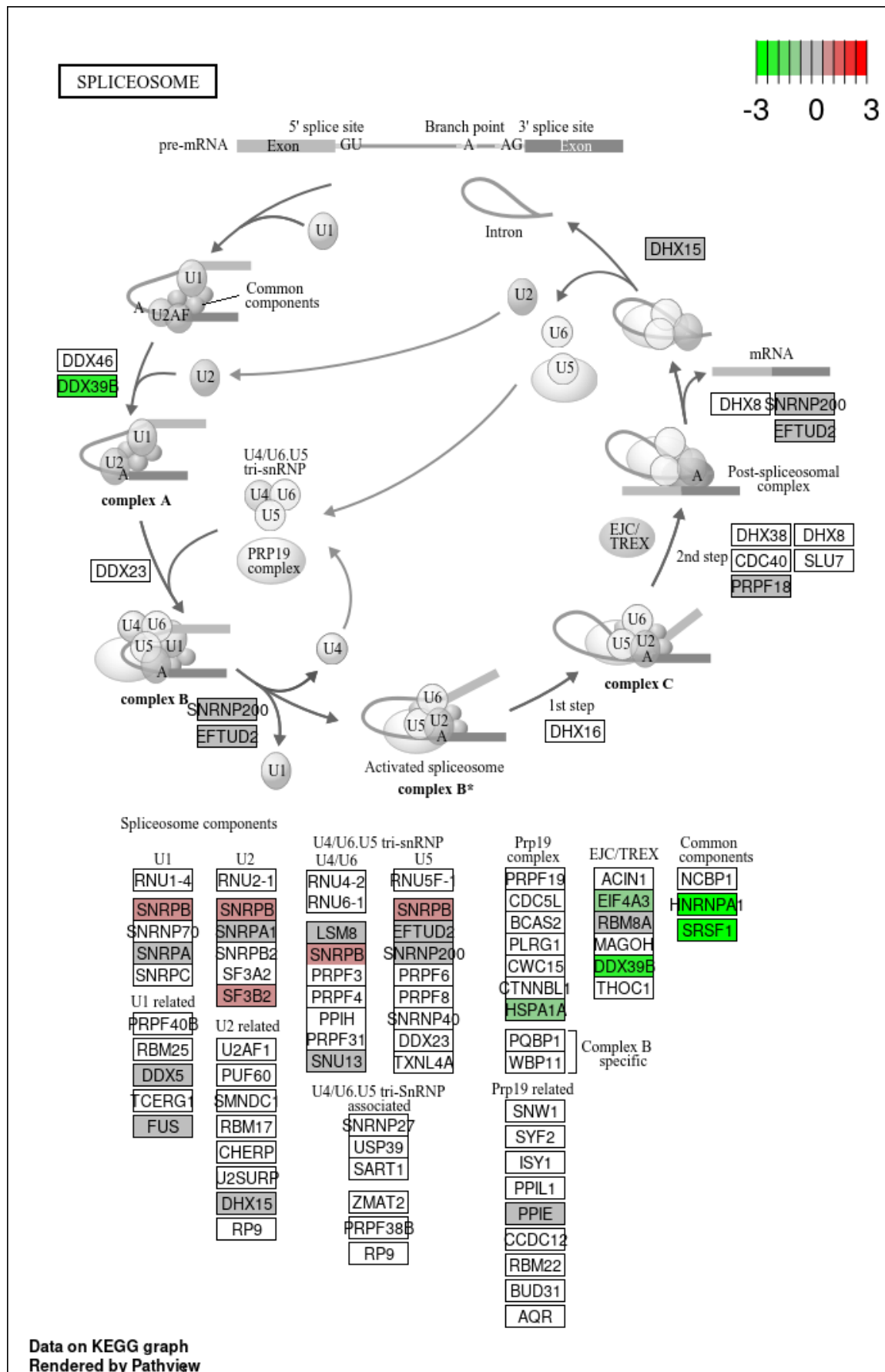


Obrázok 1 Proteíny a im odpovedajúce signálne dráhy CD4+ T-lymfocytov karcinómu prsníka Luminál B. Na obrázku sú znázornené všetky proteíny (810), ktoré boli identifikované pri analýze vzoriek. Z týchto proteínov sme sa zamerali na jednu signálnu dráhu. Obrázok je vygenerovaný zo softvéru STRING.

Proteín SNRNP200 má za úlohu katalyzovať ATP-dependentné odvíjanie duplikátov RNA U4/U6 a je schopný viazať RNA a interagovať s TBK1, čo je kináza, ktorá podporuje expresiu prozápalových a antivírusových cytokínov a chemokínov. Ak je v tele vírusová infekcia, tak SNRNP200 sa relokalizuje do cytoplazmatických štruktúr obsahujúcich TBK1 a následne podporuje aktiváciu antivírusovej vrodenej imunitnej odpovede. Strata expresie SNRNP200 má

za následok zníženie antivírusovej vrodenej imunity [10, 14, 18].

Vzhľadom na naše výsledky ktoré boli získané, vieme konštatovať, že spliceozóm RNA helikáza u karcinómových pacientok je down-regulovaná. To znamená, že v procese karcinogenézy dochádza k poruche signálnej dráhy spliceozómu (Obr. 2). K tejto signálnej dráhe vieme povedať, že v karcinómových bunkách dochádza k jej poškodeniu a teda disfunkci zostrihu génov [15].



Obrázok 2 Signálna dráha spliceozómu hsa03040. Na obrázku sú znázornené proteíny ktoré sme identifikovali a súčasne sa nachádzajú v signálnej dráhe. Zelenou farbou sú znázornené down-regulované proteíny, červenou up-regulované proteíny a šedou farbou, len identifikované proteíny.

Ďalším proteínom, ktorý bol nájdený v našich vzorkách a je súčasťou signálnej dráhy je DDX39B. Tento proteín riadi proliferáciu buniek vo fáze G0/G1 do fázy S, taktiež je dokázané, že sa viaže na prvý exón pre-mRNA a zvyšuje jeho expresiu. Preukázalo sa, že tento proteín produkuje abnormálnu expresiu spliceozómov pri karcinóme prsníka [19, 16].

V poradí tretím proteínom, ktorý sa zapája do signálnej dráhy spliceozómu je DHX15. Úlohou tohto proteínu je rozpoznávať a viazať vírusovú dvojvláknovú RNA [11]. Ukazuje sa, že ak je tento proteín up-regulovaný, tak dochádza k bujneniu karcinómu prsníka [21]. Avšak v našom prípade je v CD4+ T lymfocytoch tento proteín down-regulovaný, čo pravdepodobne súvisí so spustením obranných mechanizmov organizmu voči karcinómu prsníka. Je potrebné podotknúť, že toto naše tvrdenie je potrebné overiť a verifikovať.

Ďalším proteínom, ktorý sme identifikovali v našich výsledkoch a súčasne sa nachádza aj v signálnej dráhe spliceozómu je EFTUD2 proteín. Tento proteín je potrebný pri zostrihu pre-mRNA a je súčasťou spliceozómu a je súčasťou predkatalytických a postkatalytických zostrihov komplexov [20]. V našej štúdii je tento proteín up-regulovaný, čo koreluje so skutočnosťou, že pri karcinóme prsníka dochádza k zvýšenému počtu zostrihov mRNA [3].

Proteín SNRPB je základnou zložkou spliceozómu a hrá hlavnú rolu pri regulácii alternatívneho zostrihu pre-mRNA. O jeho úlohe pri karcinóme vieme málo, no vieme povedať, že pri karcinóme je tento proteín up-regulovaný, čo koreluje s našimi výsledkami [9].

Literatúra

1. 'Breast cancer'. Accessed: Feb. 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
2. Berrada N., Delaloge S., and André F., 'Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization?', *Annals of Oncology*, vol. 21, no. SUPPL. 7, pp. Vii30–vii35, Oct. 2010, doi: 10.1093/ANNONC/MDQ279.
3. Beyer S. et al., 'High RIG-I and EFTUD2 expression predicts poor survival in endometrial cancer', *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 149, no. 8, pp. 4293–4303, Jul. 2023, doi: 10.1007/S00432-022-04271-Z/TABLES/7.
4. Boieri M., et al., 'CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 219, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.1084/JEM.20201963/213261.
5. Cserni G., 'Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time', *Pathologica*, vol. 112, no. 1. Pacini Editore S.p.A., pp. 25–41, Mar. 01, 2020. doi: 10.32074/1591-951X-1-20.
6. Ennis S Lamon D. J., et al., 'Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2', <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>, vol. 344, no. 11, pp. 783–792, Mar. 2001, doi: 10.1056/NEJM200103153441101.

Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že pri karcinóme prsníka dochádza k chybnému zostrihu intrónov a následne k chybné tvorbe proteínov. Z našich predbežných výsledkov nie je možné vysloviť hypotézu, v akej miere sa chybné proteíny podieľajú na raste a šírení karcinómu v tele pacientok.

Summary

Breast cancer is one of the most common oncological diseases in women. In the study, we focused on the analysis of signaling pathways in circulating CD4+ T-lymphocytes of patients with luminal B breast cancer. Analysis of the results revealed changes in protein concentrations that are part of the spliceosome signaling pathway. A total of 810 proteins were identified by quantitative proteomic LC-MS analysis using the MASCOT database (FDR $\leq$ 1, score $\leq$ 36). Based on protein interactions (using STRING software; version 11.5), the spliceosome signaling pathway (KEGG_hsa03040) was confirmed, where 20 proteins were identified. The results of our study correlate with data from the literature that inaccurate splicing of introns occurs in breast cancer and thus defective proteins begin to form. Further multiomics studies are needed to determine the contribution of defective proteins to the development and progression of breast cancer.

Tento výskum bol financovaný Agentúrou na podporu výskumu a vývoja projekt APVV-19-0476.

7. Jackisch C., Harbeck N., Huober J., von Minckwitz G., Gerber B., Kreipe H.H., Liedtke C., Marschner N., Möbus V., Scheithauer H., Schneeweiss A., Thomssen C., Loibl S., Beckmann M.W., Blohmer J.U., Costa S.D., Decker T., Diel I., Fasching P.A., Fehm T., Janni W., Lück H.J., Maass N., Scharl A., Untch M. 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015: Evidence, Controversies, Consensus – Primary Therapy of Early Breast Cancer: Opinions Expressed by German Experts. *Breast Care (Basel)*. 2015 Jul;10(3):211-9. doi: 10.1159/000433590. Epub 2015 Jun 23. PMID: 26557827; PMCID: PMC4569213.
8. Johnson K. S., Conant E. F., and Soo M. S., 'Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists', *J Breast Imaging*, vol. 3, no. 1, pp. 12–24, Jan. 2021, doi: 10.1093/JBI/WBAA110.
9. Liu N. et al., 'SNRPB promotes the tumorigenic potential of NSCLC in part by regulating RAB26', *Cell Death & Disease* 2019 10:9, vol. 10, no. 9, pp. 1–11, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1929-y.
10. Liu S., et al., 'Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation', *Science*, vol. 347, no. 6227, Mar. 2015, doi: 10.1126/SCIENCE.AAA2630.
11. Lu H., Lu N., Weng L., Yuan B., Liu Y., and Zhang Z., 'DHX15 senses double-stranded RNA in myeloid dendritic cells', *J Immunol*, vol. 193, no. 3, pp. 1364–1372, Aug. 2014, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1303322.
12. Reinert T. and Barrios C. H., 'Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016', *Ther Adv*

- Med Oncol, vol. 7, no. 6, pp. 304–320, Oct. 2015, doi:10.1177/1758834015608993/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1758834015608993-FIG1.JPEG.
13. Tong C. W. S., Wu M., Cho W. C. S., and To K. K. W., 'Recent advances in the treatment of breast cancer', *Frontiers in Oncology*, vol. 8, no. JUN. Frontiers Media S.A., Jun. 14, 2018. doi: 10.3389/fonc.2018.00227.
14. Tremblay N., *et al.*, 'Spliceosome SNRNP200 Promotes Viral RNA Sensing and IRF3 Activation of Antiviral Response', *PLoS Pathog*, vol. 12, no. 7, Jul. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005772.
15. Wang E. and Aifantis I., 'RNA Splicing and Cancer', *Trends Cancer*, vol. 6, no. 8, pp. 631–644, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.TRECAN.2020.04.011.
16. Wang L. *et al.*, 'Transcriptome-wide analysis and modelling of prognostic alternative splicing signatures in invasive breast cancer: a prospective clinical study', *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41598-020-73700-1.
17. Will C. L. and Lü R., 'Spliceosome Structure and Function', doi: 10.1101/cshperspect.a003707.
18. Yang H., Beutler B., and Zhang D., 'Emerging roles of spliceosome in cancer and immunity', *Protein Cell*, vol. 13, no. 8, pp. 559–579, Aug. 2022, doi: 10.1007/S13238-021-00856-5.
19. Zhang H. *et al.*, 'ARTICLE OPEN DDX39B contributes to the proliferation of colorectal cancer through direct binding to CDK6/CCND1', doi: 10.1038/s41420-022-00827-7.
20. Zhang X., Yan C., Hang J., Finci L. I., Lei J., and Shi Y., 'An Atomic Structure of the Human Spliceosome', *Cell*, vol. 169, no. 5, pp. 918–929.e14, May 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.04.033.
21. Zheng W., Wang X., Yu Y., Ji C., and Fang L., 'CircRNF10-DHX15 interaction suppressed breast cancer progression by antagonizing DHX15-NF-κB p65 positive feedback loop', *Cell Mol Biol Lett*, vol. 28, no. 1, p. 34, Dec. 2023, doi: 10.1186/S11658-023-00448-7.

Pilotná analýza proteínov subpopulácie CD8+ T-lymfocytov z periférnej krvi pacientok s triple negatívnym karcinómom prsníka

Jozef Parnica¹, Michaela Šulíková¹, Mária Kacírová², Martin Menkyna¹, Soňa Tkáčiková¹, Dávid Tóth³, Marek Lenárt⁴, Dominik Šafčák⁵, Ján Sabo^{1*}

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, ²Medipark, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ³Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, Košice, ⁴I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, ⁵Klinika rádioterapie a onkológie UPJŠ LF a VOÚ a.s., Košice, * korešp. autor

Analyzovali sme proteomický profil CD8+ T lymfocytov z periférnej krvi od 3 pacientok s diagnostikovaným triple negatívnym karcinómom prsníka (TNBC) a 10 kontrolných subjektov bez ochorenia, zodpovedajúceho veku a pohlavia, pomocou kvapalinovej chromatografie kombinovanej s hmotnostnou spektrometriou (tandem LC-MS). Vytvorili sme zoznam všetkých UP a DOWN regulovaných proteínov v meraných vzorkách. Medzi šiestimi odlišne exprimovanými proteínmi s najvyššou p-hodnotou sme pozorovali štyri proteíny, ktoré majú potenciálnu úlohu pre rozvoj ochorenia. Proteín CXCL7, ktorý je uvoľňovaný aktivovanými krvnými doštičkami, súvisí s výskytom karcinómov pri niekoľkých bežných malignitách, vrátane karcinómov pľúc, obličiek, hrubého čreva a prsníka, a možno ho teda považovať za biomarker progresie rôznych nádorov. Podľa inej štúdie spolupracuje s inými nádorovými supresorovými génmi na transformácii epiteliálnych buniek prsníka narušením bunkovej diferenciácie a tkanivovej architektúry. Naša štúdia potvrdila prítomnosť DOWN regulácie FUBP1 proteínu, ďalšieho potenciálneho onkomarkera. Pribúdajúce experimentálne dôkazy preukázali onkogénne aj nádorové supresívne úlohy FUBP1. Ďalším pozorovaným proteínom v našich vzorkách bol GRP75. Rozsiahle štúdie potvrdili, že GRP75 sa nachádza v mnohých ľudských malignitách, čo kauzálnu koreluje s ich invazívnym rastom, šírením metastáz a rezistenciou na chemoterapiu a rádioterapiu. Naším štúdiom proteómu imunitných buniek CD8+ T lymfocytov z periférnej krvi by sme chceli nasledovať trend vo využití tekutej biopsie na klinické účely pomocou analýzy proteómu cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov. Pacientky s TNBC majú zlú prognózu z dôvodu agresívnej povahy týchto nádorov a nedostatku cielených terapií. Identifikácia nových relevantných proteínov pre cielenú terapiu pre skupinu TNBC pacientok je relevantná.

Kľúčové slová: CD8+ T lymfocyty, triple negatívny karcinóm prsníka, proteomická analýza, LC-MS hmotnostná spektrometria

Keywords: CD8+ T lymphocytes, triple negative breast cancer, proteomic analysis, LC-MS mass spectrometry

Úvod

Rakovina prsníka je najčastejšou a hlavnou príčinou úmrtnosti na rakovinu u žien všetkých vekových skupín na celom svete [27]. Ide o vysoko heterogénne maligné ochorenie s rôznymi funkčnými fenotypmi, ktoré vytvárajú mimoriadne náročnú hádanku histomorfologických, proteomických a genómových znakov s odlišnými podtypmi.

Nádory je možné zaradiť do nasledovných typov podľa expresie estrogénových, progesteronových receptorov, expresii receptoru HER2, mitotickej aktivity určovanej proteínom Ki67 (St Gallen Consensus Conference, 2015). Triple negatívny karcinóm je definovaný nasledovnou kombináciou receptorov: ER negatívny, PgR negatívny, HER2 negatívny [26].

Malígne karcinómy prsníka sa ťažko liečia, najmä vysoko metastatické TNBC, ktorým ako terapeutické ciele chýbajú molekuly ER, PR a HER2 receptora [32]. Tvoria asi 20 % všetkých karcinómov prsníka. Najčastejšie sa vyskytuje u žien mladších ako 40 rokov a u afroamerických žien.

TNBC je vysoko heterogénny a výskumníci identifikovali niekoľko molekulárnych podtypov v rámci TNBC

na základe vzorov génovej expresie a molekulárnych charakteristík. Tieto podtypy zahŕňajú i) Basal-like TNBC sú charakterizované expresiou génov, ktorých produkty (proteíny) sú typicky prítomné v bazálnej epiteliálnej vrstve prsných kanálikov. Bazálne TNBC sa ďalej delia na podtypy BL1 a BL2. Nádory BL1 majú typicky vysokú expresiu génov zapojených do regulácie bunkového cyklu a opravy poškodenia DNA, zatiaľ čo nádory BL2 vykazujú vyššiu expresiu signálnych dráh rastového faktora, ii) Claudin-low TNBC sú charakterizované nízkou expresiou génov zapojených do bunkovej adhézie, vrátane claudínov. Tieto nádory často vykazujú znaky prechodu z epitelu na mezenchým (EMT), ktorý môže prispieť k agresivite nádoru a metastázam, iii) Mezenchymálne (MES) TNBC vykazujú vzory génovej expresie pripomínajúce mezenchymálne bunky. Tieto nádory často vykazujú znaky EMT a sú spojené s invazívnejším fenotypom a horšou prognózou, iv) Luminálny androgénny receptor (LAR) TNBC exprimujú vysoké hladiny androgénneho receptora (AR) a génov spojených s luminálnymi epitelovými bunkami. Tieto nádory sú zvyčajne menej agresívne ako iné podtypy TNBC a môžu reagovať na antiandrogénne terapie, v) Imunomodulačné (IM) TNBC sa vyznačujú vysokou expresiou génov zapojených do dráh imunitnej odpovede. Tieto nádory často

vykazujú zvýšené lymfocyty infiltrujúce nádor (TIL) a molekuly imunitných kontrolných bodov a môžu lepšie reagovať na imunoterapiu.

Uvedené molekulárne subtypy TNBC poskytujú pohľad na základnú biológiu ochorenia a môžu mať dôsledky na liečebné stratégie a výsledky pacientov. Je však dôležité poznamenať, že TNBC je komplexné ochorenie s rôznymi molekulárnymi charakteristikami a na úplné pochopenie jeho heterogenity a vývoj cielených terapií je potrebný ďalší výskum.

Basal-like TNBC sú najčastejšie s 50–70 % prevalenciou [14]. TNBC sa prejavuje agresívnym správaním a 80 % nádorov rakoviny prsníka patrí do daného subtypu [18]. Riziko vzniku TNBC sa líši v závislosti od genetiky, rasy, veku, nadváhy a obezity, vzorcov dojčenia a vyznačuje sa svojou agresivitou, skorým relapsom a väčšou tendenciou prejavovať sa v pokročilých štádiách [14]. Histologicky ide o slabo diferencovaný, vysoko proliferatívny heterogénny nádor s variabilnou prognózou. Imunohistochemicky sa TNBC delia na bazálne a nebazálne. Prvé sa vyznačujú expresiou cytokeratínov (CK)5/6 a receptora ľudského epidermálneho rastového faktora typu 1 (EGFR1), zatiaľ čo nebazálne cytokeratíny CK5/6 neexprimujú [21]. Napriek starostlivému imunitnému dohľadu sa však rakovina môže nakoniec presadiť a väčšina imunitných buniek sa polarizuje na protumorigénne alebo protinádorové bunky v závislosti od množstva aktivačných a inhibičných signálov odvodených z rakovinových buniek a ich mikroprostredia [30], pričom pre účinnosť imunoterapie je rozhodujúca aj infiltrácia imunitných buniek CD4+ a CD8+ do nádoru, alebo ich vylúčenie z nádoru [2].

CD8+ T bunky sú jednou z hlavných subpopulácií efektorových buniek v imunoterapii. Keď sú však T bunky opakovane vystavené rakovinovým antigénom, diferencujú sa do dysfunkčných stavov. Okrem toho sú na vznik a progresiu dysfunkcie T-buniek potrebné signálne dráhy sprostredkované receptorom T-buniek (TCR) [20]. Prítomnosť CD8+ T buniek infiltrujúcich nádor (TIL) pri rakovine prsníka je spojená s významným znížením relatívneho rizika úmrtia na ochorenie. Avšak až u 57,6 % primárnych nádorov prsníka chýbajú CD8+ T bunky infiltrujúce nádor [17].

V súčasnosti, keď prechádzame vznikajúcou érou vysoko integrovanej presnej diagnostiky [4], proteomika (štúdium veľkého súboru proteínov) sa stáva čoraz dôležitejšou v diagnostike aj liečbe. Proteín je základnou jednotkou bunkovej funkcie a biologickej dráhy [10, 24]. Proteomické informácie sú nevyhnutné na klasifikáciu funkčných podtypov a štádií rakoviny prsníka, na dešifrovanie mechanizmov tumorigenézy, správania a agresivity rakovinových buniek, na predpovedanie recidívy a posúdenie rezistencie rakovinových buniek, na výber a monitorovanie najvhodnejšej liečby rakoviny prsníka.

Najflexibilnejším a najvšeobecnejším dostupným nástrojom pre štúdium proteómu buniek imunitného systému v periférnej krvi je proteomická analýza krvi, ktorá sa opie-

ra o hmotnostnú spektrometriu v tandeme s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (LC/MS). Táto technika je minimálne invazívna na rozdiel od biopsie tkanív [22]. Odhaduje sa, že v plazmatickom proteóme je viac ako 8 000 proteínov [34], a niekoľko proteínov odvodených od nádoru bolo identifikovaných už počas prvých štádií tumorigenézy.

V poslednej dobe sa veľký dôraz kladie na zavedenie tekutých biopsií, ktoré sa v súčasnosti zameriavajú predovšetkým na cirkulujúce nádorové bunky (CTC) a cirkulujúcu nádorovú DNA (ctDNA) [33]. Tekuté biopsie vyvíjajú sa ako minimálne invazívna metóda na štúdium recidívy, odpovede na liečbu a prežitia v klinickom prostredí. Naším štúdiom proteómu imunitných buniek v periférnej krvi by sme chceli nasledovať trend vo využití tekutej biopsie na klinické účely pomocou proteomickej analýzy cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov.

Materiál a metódy

Použité boli vzorky periférnej krvi od pacientok s diagnostikovaným triple negatívnym karcinómom prsníka (TNBC) pred akoukoľvek terapiou kvôli minimalizácii terapiou vyvolaných proteomických zmien u pacientov. Štúdia bola vedená v zhode s Helsinskou deklaráciou a bola schválená Etickou komisiou LF UPJŠ v Košiciach, protokol kód 9N/2021, dátum schválenia 17. 6. 2021, Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura 2020/EK/06047, dátum schválenia 25. 6. 2020, a Etickou komisiou Východoslovenského onkologického ústavu a. s., protokol kód EK/1/06/2020, dátum schválenia 1. 6. 2020. Od subjektov v kontrolnej skupine, ako aj v skupine s rakovinou prsníka bol získaný informovaný súhlas (2020/EK/06407) v písomnej forme. Randomizované vzorky periférnej krvi z kontrolnej skupiny (N = 10) boli získané z Gynekologicko-pôrodníckej kliniky LF UPJŠ a UN LP v Košiciach, vzorky s TNBC (N = 3) boli odobraté na I. chirurgickej klinike LF UPJŠ a UN LP v Košiciach. Výber pacientov s diagnózou karcinóm prsníka, podtyp Luminál A, bol uskutočnený na základe imunohistochemických výsledkov akreditovaným laboratóriom Ústavu patológie UPJŠ LF a UNLP v Košiciach, číslo registrácie 158/Q-044, certifikovaným podľa ISO 9001:2025, s platnosťou certifikátu do apríla 2026. Akreditácia bola udelená Slovenskou národnou akreditačnou službou (SNAS).

Experimentálny protokol.

Jednotlivým pacientom a kontrolnej skupine bolo odobraných 10 ml periférnej krvi do skúmaviek BD Vacutainer K2EDTA, ochladených na 4 °C a spracovaných do 30 minút od získania. Následne bola krv zriedená s 20 ml izolačného roztoku (2 mmol EDTA+PBS+BSA) a centrifugovaná pri 600 G počas 10 min pri 4 °C. Po centrifugácii sme odstránili vrchnú časť plazmy, tak aby vrstva buniek PBMC (mononukleárne bunky periférnej krvi) a erytrocytov ostala neporušená. Do tejto dvoj-vrstvy sa pridávali magnetické guľičky s CD8+ znakom (Invitrogen Dynabeads, Thermo

Fisher Scientific, homogenita izolovanej populácie CD8+ určená flow cytometriou podľa výrobcu 98 % - 100 %, výťažnosť metodiky 95 % - 100 %) za účelom separácie subpopulácie leukocytov. Po pridaní CD8+ guľičiek do skúmavky so zriedenou krvou došlo k inkubácii po dobu 20 min pri 4 °C v Hulamixéri. Po inkubácii, magnetické guľičky spolu s bunkami s príslušným CD znakom boli odseparované magnetom v magnetickom stojane. Magnetické guľičky s naviazaným CD8 znakom boli 3 krát premývané izolačným roztokom.

Po ukončení premývania buniek, bolo k magnetickým guľičkám pridané 400 µl 50 mM NH₄HCO₃. Subpopulácia leukocytov bola sonifikovaná a vortexovaná v striedavom cykle. Sonifikovalo sa v ultrazvukovej vani (f = 37 kHz, t = 15 min) a ultrazvukovom bloku (y = 85 %, t = 15 min), vzorka bola vortexovaná 5 min v chladničke. Následne boli zo vzorky odseparované magnetické guľičky pomocou magnetu. Každá vzorka sa delila na 3 frakcie. Prvá frakcia, ktorú sme používali na naše merania, činila 200 µl supernatantu vzorky a 1800 µl etanolu, kde počas noci pri -20 °C došlo k zrážaniu proteínov. Druhá frakcia bola len samotná vzorka – supernatant odobraný z magnetických guľičiek, uskladnená v chladničke. Tretiu frakciu predstavovali magnetické guľičky, ktoré boli odseparované v magnetickom stojane a k nim sme pridali 100 µl invitrosolu. S touto frakciou sa zopakoval cyklus sonifikovania a vortexovania. Po skončení tohto cyklu, tento typ frakcií bol inkubovaný cez noc v termomixéri pri 21 °C.

Druhý deň frakcie s jednotlivými subpopuláciami leukocytov, ktoré boli cez noc zrážané s etanolom, sa následne centrifugovali počas 20 min pri 18 000 g a 4 °C. Po centrifugácii bol etanolový supernatant odstránený a pelet vysušený. Do vysušeného peletu sa pridalo 150 µl 50 mM NH₄HCO₃. Magnetické guľičky s CD8+ znakom (cez noc inkubované s invitrosolom) boli odstránené na magnetickom stojane.

V ďalšom kroku boli stanovené koncentrácie všetkých frakcií s CD8+ znakom pomocou BCA metódy. Pri insolúcia digescii boli k vzorkám pridané požadované objemy 0,025 M roztoku DTT a boli inkubované v termomixéri pri 60 °C po dobu 30 minút. Ku vzorkám boli pridané výpočtom stanovené objemy 0,25 M roztoku IAA a boli inkubované v termomixéri v tme, pri 21 °C a po dobu 30 minút. Napokon boli pridané vypočítané objemy 5 mM roztoku CaCl₂ a bol pridaný trypsin v pomere - trypsin : vzorka = 1 : 40 (w/w). Vzorky boli inkubované počas noci pri 21 °C. Nasledujúci deň boli vzorky okyslené na pH= 2 až 3 pridaním 20 % kyseliny mravčej. Všetky vzorky boli upravené na požadované objemy buď odparovaním v SpeedVacu alebo pridaným loading (doplňujúceho) roztoku. Vzorky boli centrifugované (20 min., 18 000xg, 4 °C) a merané pomocou metódy LC-MS na hmotnostnom spektrometri - iónová pasca (Amazon speed ETD, Bruker Daltonics).

LC-MS/MS analýza (vyhľadávanie v databáze):

Pre LC/MS experiment sme použili UHPLC systém (Ultimate 3000 RSLC Nano, Thermo Fisher Scientific) a hmotnostný spektrometer iónovej pasce (amazon speed ETD s iónovým zdrojom CaptiveSpray, Bruker Daltonik). V kroku prípravy vzorky kvapalinovej chromatografie sa použila metóda zachytávania a eluovania. 1 µg peptidov z izolovaných lymfocytov (5 µl injikovanej vzorky s koncentráciou 0,2 µg/µl) sa naniesol a zachytil na zachytávacej kolóne Acclaim® PepMap C18 (100 µm x 2 cm, veľkosť častíc 5 µm, pór 100 Å veľkosť) pred elúciou a separáciou na analytickej kolóne PepMap RSLC C18 na ďalšiu analýzu (75 µm x 30 cm, veľkosť častíc 3 µm, veľkosť pórov 100 Å). Ako nanášací roztok sa použila 98 % voda a 2 % acetonitril s 0,1 % kyselinou mravčou. Prietok pri nanášaní vzorky bol 8 µl/min. Elučný proces zahŕňal použitie dvoch mobilných fáz s rôznym zložením: mobilná fáza A pozostávala z 90 % vody a 10 % acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravčej, zatiaľ čo mobilná fáza B pozostávala z 95 % acetonitrilu a 5 % vody s 0,1 % kyselina mravčia. Elučný gradient začínal s pomerom 96 % A a 4 % B počas prvých 5 minút. Počas nasledujúcich 90 minút sa pomer mobilnej fázy B postupne lineárnym spôsobom zvyšoval zo 4 % na 35 %. Potom sa uskutočnilo 10-minútové premývanie kolóny s použitím 90 % B, nasledované 15-minútovou reekvilibráciou kolóny s 4 % B. Počas celého elučného gradientu sa prietok udržiaval na 0,3 µl/min. Analýza hmotnostnou spektrometriou s použitím elektrosprejovej ionizácie (ESI) sa uskutočnila na eluovaných peptidoch. Parametre MS skenovania použité v experimente boli nasledovné: bol zvolený kladný iónový mód so skenmi so zvýšeným rozlíšením a kontrolou iónového náboja (ICC) nastavenou na 400 000. Maximálny čas akumulácie bol 50 ms a analyzovaný rozsah m/z sa pohyboval od 300 do 1300. Okrem toho boli nastavenia parametrov skenovania MS/MS nastavené na nasledujúce hodnoty: režim s vysokým rozlíšením, cieľový ICC nastavený na 500 000, maximálny čas akumulácie 100 ms a šírkou izolácie 2,2 m/z. Identifikácia proteínov sa uskutočnila použitím vyhľadávacieho algoritmu Mascot (Matrix Science, verzia 2.4.0) spolu s databázou SwissProt (verzia 2020_02). Kritériá vyhľadávania boli nasledovné: taxonómia bola obmedzená na Homo sapiens (človek), trypsin bol použitý ako enzým, karbamidometylácia cysteínu (C) bola nastavená ako fixná modifikácia a oxidácia metionínu (M) bola povolená ako premenná modifikácia. Boli povolené až dve chybné štiepenia a do úvahy sa brali len peptidy s nabitými stavmi +2 a +3 a minimálnou dĺžkou 3.

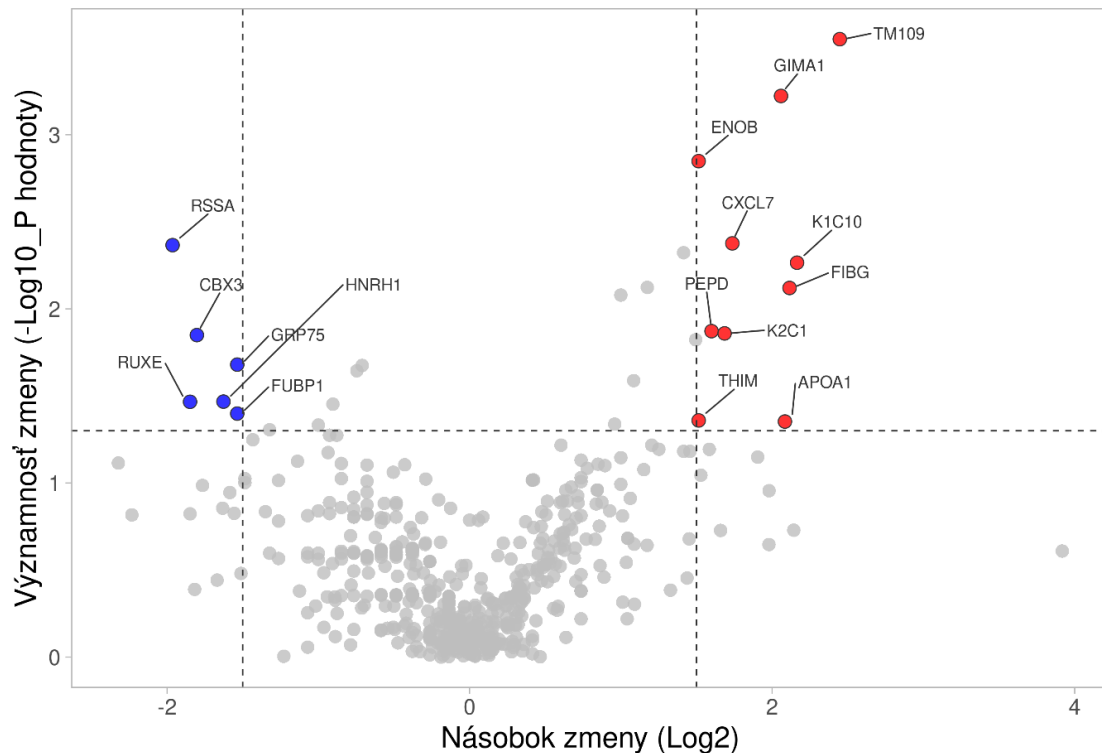
Štatistické metódy:

Uskutočnila sa kvantifikačná analýza proteínov z CD8+ T-lymfocytov v kontrolnej skupine a skupine s TNBC. Na vyhodnotenie beta-binomického testu sa použili vážené spektrálne počty a na výpočet p-hodnoty pre každú sadu proteínov sa použil balík BetaBinomial 1.2 R softvéru Proline Studio [3] a nominálna hodnota p < 0,05.

Výsledky

V súčasnej štúdii sme analyzovali proteomické profily CD8+ T lymfocytov separovaných z periférnej krvi od 3 diagnostikovaných pacientok s TNBC a 10 zdravých kontrol zodpovedajúceho veku a pohlavia pomocou LC/MS, aby sme získali nové poznatky o procesoch v imunitných bunkách periférnej krvi pri prítomnosti TNBC v tele pacientok.

Zamerali sme sa tiež na integráciu dostupných súborov údajov o TNBC na úrovni proteómu, aby sme identifikovali a overili nových kandidátov na prognostické biomarkery. Hľadali sme štúdie zahŕňajúce kohorty pacientov s TNBC s publikovanými informáciami o prežití a proteomických údajoch. Proteomické profilovanie mononukleárných buniek plnej krvi by mohlo prispieť k dosiahnutiu nových poznatkov o vývoji patológie pacientov s TNBC.



Obrázok 1 Volcano plot: Významne UP regulované (červenou) a DOWN regulované (modrou) proteíny subpopulácie CD8+ T lymfocytov periférnej krvi pacientok s TNBC.

Proteínová sada	Popis	binomická P-hodnota	Násobok zmeny Log2	-log10 (binomická P-hodnota)
K2C1	Keratín II, cytoskeletálny typ 1	0,0138	1,6859	1,8591
K1C10	Keratín I, cytoskeletálny typ 10	0,0054	2,1648	2,2652
FUBP1	protein 1 - viažuci prvok ďaleko pred jeho prúdom	0,0399	-1,5361	1,3987
GRP75	proteín 75 regulovaný glukózou, mitochondriálny	0,0209	-1,5361	1,6798
CBX3	Chromobox proteínový homológ 3	0,0141	-1,8028	1,8494
HNRH1	Heterogénny jadrový ribonukleoproteín H	0,0341	-1,6271	1,4674
ENOB	Beta-enoláza	0,0014	1,5142	2,8483
THIM	3-ketoacyl-CoA tioláza, mitochondriálna	0,0437	1,5146	1,3593
FIBG	Fibrinogénový gama reťazec	0,0076	2,1155	2,1201
RSSA	Malý ribozomálny podjednotkový proteín uS2	0,0043	-1,9635	2,366
CXCL7	Základný proteín krvných doštičiek	0,0042	1,737	2,3761
APOA1	Apolipoproteín A-I	0,0444	2,0849	1,3529
GIMA1	Člen rodiny GTPázy IMAP 1	5,99E-04	2,0589	3,2226
TM109	Napät'ovo riadený monoatomický katiónový kanál TMEM109	2,83E-04	2,4475	3,5488
RUXE	Malý jadrový ribonukleoproteín E	0,0342	-1,848	1,4664
PEPD	Xaa-Pro dipeptidáza	0,0134	1,5995	1,8721

Tabuľka 1 Zoznam UP a DOWN regulovaných proteínov, ktoré z celkovo 653 zistených proteínov spĺňali podmienku, že binomická hodnota $P \leq 0,05$ a abs (Log2) $\geq 1,5$. Kladná hodnota (Log2) signalizuje UP reguláciu a záporná hodnota signalizuje DOWN reguláciu daného proteínu subpopulácie CD8+ T-lymfocytov periférnej krvi pacientok s TNBC.

Podarilo sa nám identifikovať 653 proteínov v CD8+ T lymfocytoch. Aby sa zvýšila šanca na štúdium skutočných proteínov rozdielne exprimovaných medzi vzorkami pacientok s TNBC a zdravými kontrolami s potenciálnym vplyvom na funkciu buniek, použil sa prísnejší filter na selekciu. Výberom, ktorým splnili nasledujúce kritérium (binomická hodnota $P \leq 0,05$ a abs (Log pomer) $\geq 1,5$) v rámci skupiny významne rozdielne exprimovaných proteínov prešlo 16 proteínov (Obr. 1). Kladná hodnota (Log2 - pomer benígny / zdravý) signalizuje UP reguláciu a záporná hodnota signalizuje DOWN reguláciu (Tab. 1) daného proteínu subpopulácie CD8+ T-lymfocytov periférnej krvi pacientok s TNBC. Vytvorili sme zoznam všetkých odlišne exprimovaných proteínov v našich meraných vzorkach (informácie o proteínoch čerpané z UniProt Databazy) [8]:

K2C1_HUMAN (Keratín II, cytoskeletálny typ 1)
Môže regulovať aktivitu kináz (PKC, SRC) prostredníctvom väzby na integrín beta-1 a receptor aktivovanej proteín C kinázy 1 (RACK1).

K1C10_HUMAN (Keratín I, cytoskeletálny typ 10)
Hrá úlohu pri vytváraní epidermálnej bariéry na plantárnej koži. Podieľa sa na udržiavaní vývoja bunkovej vrstvy a zväzkov keratínových filamentov v suprabazálnych bunkách epitelu.

FUBP1_HUMAN (Far upstream element-binding protein 1)
Môže pôsobiť ako aktivátor aj represor transkripcie. Podieľa sa na regulácii metylácie RNA N6-metyladenozínu (m6A) a jeho strata vedie ku globálnym zmenám v zostrihu RNA a rozšírenej expresii aberantných izoformiem.

GRP75_HUMAN (proteín 75 regulovaný glukózou, mitochondriálny)
Chaperónový proteín, tiež nazývaný mortalín alebo HSPA9, alebo mitochondriálny HSP75 (mtHSP75), alebo proteín viažuci peptid 74 (PBP74), ktorý hrá dôležitú úlohu v mitochondriálnej biogenéze. Reguluje erytropoézu prostredníctvom stabilizácie a môže hrať úlohu v regulácii bunkového cyklu prostredníctvom svojej interakcie a podpory degradácie TP53, taktiež môže hrať úlohu pri kontrole bunkovej proliferácie a bunkového starnutia.

CBX3_HUMAN (Chromobox proteínový homológ 3)
Zdá sa, že sa podieľa na uhlčení transkripcie v komplexoch podobných heterochromatínu. Rozpoznáva a viaže histónové H3 chvosty metylované na 'Lys-9', čo vedie k epigenetickej represii. Môže prispievať k asociácii heterochromatínu s vnútornou jadrovou membránou prostredníctvom jeho interakcie s receptorom lamin B (LBR).

Sprostredkuje nábor na miesta poškodenia DNA pri dvojvláknových zlomoch.

HNRH1_HUMAN (Heterogénny jadrový ribonukleoproteín H)
Tento proteín je zložkou heterogénnych komplexov nukleárných ribonukleoproteínov (hnRNP), ktoré poskytujú substrát pre procesy spracovania, ktorým prechádzajú pre-mRNA predtým, ako sa stanú funkčnými, translatovateľnými mRNA v cytoplazme. Sprostredkuje alternatívnu reguláciu zostrihu pre-mRNA.

ENOB_HUMAN (Beta-enoláza)
Glykolytický enzým, ktorý katalyzuje premenu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. Zdá sa, že má funkciu pri vývoji a regenerácii priečne pruhovaného svalstva.

THIM_HUMAN (3-ketoacyl-CoA tioláza, mitochondriálna)
Pri výrobe energie z tukov ide o jeden z enzýmov, ktorý katalyzuje posledný krok mitochondriálnej beta-oxidačnej dráhy, aeróbného procesu rozkladu mastných kyselín na acetyl-CoA. Tiež katalyzuje kondenzáciu dvoch molekúl acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA a mohol by sa podieľať na produkcii ketolátok. Vykazuje hydrolázovú aktivitu na rôznych mastných acyl-CoA a tým by mohol byť zodpovedný za produkciu acetátu pri vedľajšej reakcii na beta-oxidáciu.

FIBG_HUMAN (Fibrinogénový gama reťazec)
Spolu s fibrinogénom alfa a fibrinogénom beta, polymerizuje za vzniku nerozpustnej fibrínovej matrice. Má hlavnú funkciu pri hemostáze ako jedna z primárnych zložiek krvných zrazenín. Okrem toho funguje počas skorých štádií hojenia rany na stabilizáciu lézie a usmernenie migrácie buniek počas reepitelizácie. Môže tiež uľahčiť antibakteriálnu imunitnú odpoveď prostredníctvom vrodenných aj T-bunkami sprostredkovaných dráh a Gama-reťazec nesie hlavné väzbové miesto pre receptor krvných doštičiek.

RSSA_HUMAN (Malý ribozomálny podjednotkový proteín uS2)
Vyžaduje sa na zostavenie a stabilitu ribozomálnej podjednotky 40S. Vyžaduje sa na spracovanie 20S rRNA-prekursora na zrelú 18S rRNA v neskoršom kroku dozrievania 40S ribozomálnych podjednotiek. Funguje tiež ako bunkový povrchový receptor pre laminín. Zohráva úlohu pri bunkovej adhézii k bazálnej membráne a následnej aktivácii signálnych transdukčných dráh. Môže hrať úlohu pri určovaní bunkového osudu a morfogénne tkanív. Pôsobí ako receptor pre rôzne vírusy, receptor pre patogénny priónový proteín a receptor pre baktérie.

CXCL7_HUMAN (Základný proteín krvných doštičiek)

Stimuluje syntézu DNA, mitózu, glykolýzu, intracelulárnu akumuláciu cAMP, sekréciu prostaglandínu E2 a syntézu kyseliny hyalurónovej a sulfátovaného glykozamínoglykánu. CXCL7, tiež nazývaný NAP-2 je uvoľňovaný aktivovanými krvnými doštičkami a súvisí s výskytom a vývojom rôznych nádorov. Stimuluje tiež tvorbu a sekréciu aktivátora plazminogénu ľudskými synoviálnymi bunkami a je aktivátor pre neutrofile.

APOA1_HUMAN (Apolipoproteín A-I)

Podieľa sa na reverznom transporte a vylučovaní cholesterolu z tkanív do pečene (podporuje odtok cholesterolu z tkanív) a pôsobí ako kofaktor pre lecitín cholesterol acyltransferázu.

GIMA1_HUMAN (Člen rodiny GTPázy IMAP 1)

Môže regulovať prežitie lymfocytov. Vyžaduje sa pre normálne hladiny zreých T-lymfocytov a zreých B-buniek.

TM109_HUMAN (Napäťovo riadený monoatomický kationový kanál TMEM109)

Funguje ako napäťovo riadený monoatomický kationový kanál priepustný pre draslík aj vápnik a hrá úlohu v bunkovej odpovedi na poškodenie DNA.

RUXE_HUMAN (Malý jadrový ribonukleoproteín E)

Zohráva úlohu pri zostrihu pre-mRNA ako základná zložka spliceozomálnych malých jadrových ribonukleoproteínov. Komponent pre-katalytického komplexu spliceozómu B aj aktivovaných komplexov spliceozómu C. Pacienti so systémovým lupus erythematosus produkujú protilátky, ktoré interagujú s proteínmi snRNP.

PEPD_HUMAN (Xaa-Pro dipeptidáza)

Dipeptidáza, ktorá katalyzuje hydrolýzu dipeptidov s prolylovým (Xaa-Pro) alebo hydroxyprolylovým zvyškom v C-koncovkej polohe. Výhodným dipeptidovým substrátom je Gly-Pro a hrá dôležitú úlohu v metabolizme kolagénu kvôli vysokej hladine iminokyselín v kolagéne.

Diskusia

Somatické mutácie pri rakovine vedú k nádorovo špecifickým novým proteínom, nazývaným neoantigény [25]. Tieto neoantigénové podpisy sú spojené s väčšou protinádorovou odpoveďou CD8+ T buniek a existujú dôkazy, že táto odpoveď môže byť posilnená imunoterapiou. Neoantigény sú mimoriadne prítlačlivým aj imunitným cieľom vzhľadom na ich selektívne zastúpenie v nádorových bunkách bez expresie na normálnych bunkách [31]. TNBC má vyšší stupeň neoantigénov v porovnaní s inými podtypmi rakoviny prsníka [19]. Funkcie a interakcie medzi vrodeným a adaptívnym imunitným systémom sú životne dôležité pre protirakovinovú imunitu. Cytotoxické T bunky exprimujúce CD8+ znak na bunkovom povrchu sú najsilnejšími efektormi v protirakovinovej odpovedi a tvoria základ súčasných úspešných

imunoterapií a diagnostikovania rakoviny. Vychádzajú sa nové generácie cytotoxických CD8+ T buniek s geneticky modifikovanými, alebo syntetickými receptormi a vyhodnocujú sa v klinických štúdiách. Okrem toho môžu kombinované režimy optimalizovať účinky liečby a znížiť nežiaduce účinky [23].

Medzi šestnástimi odlišne exprimovanými proteínmi s najvyššou p-hodnotou sme pozorovali štyri proteíny, ktoré majú potenciálnu úlohu pre rozvoj ochorenia. Proteín CXCL7, ktorý je uvoľňovaný aktivovanými krvnými doštičkami a súvisí s výskytom rakoviny a možno ho považovať za biomarker progresie rôznych nádorov [16]. Proteín CXCL7 patrí do skupiny chemokínov (8–12 kDa sekrečné proteíny), ktoré môžu regulovať migráciu leukocytov a zohrávajú dôležitú úlohu v mnohých fyziologických a patologických procesoch, vrátane zápalu a opravy poškodených a poranených tkanív [11]. Tieto malé proteíny možno klasifikovať do podskupiny CXC-, CX3C-, CC- a XCL na základe polohy konzervovaných cysteínov blízko N-konca. CXCL7, tiež nazývaný NAP-2 patrí do podskupiny CXCL [15]. Podľa štúdie Li L.H. a kol [16] bol tento proteín použitý ako nový biomarker na včasnú diagnostiku obštrukčného kolorektálneho karcinómu (CRC). Na základe ich zistení, boli stredné koncentrácie CXCL7 u CRC vyššie ako u kontrol a poukázali na to, že sérový CXCL7 môže byť pomocným diagnostickým biomarkerom pre CRC. Ďalšie nedávne štúdie ukázali, že signalizácia CXCL7 hrá podpornú úlohu pri niekoľkých bežných malignitách, vrátane rakoviny pľúc, obličiek, hrubého čreva a prsníka [6]. Niektoré imunitné bunky a zápalové cytokíny sú základnými zložkami v mikroprostredí nádoru na podporu progresie rakoviny prsníka. V štúdií Wang G.H. [29] a kol., aby identifikovali kľúčových imunitných hráčov v nádorovom mikroprostredí, použili vysoko invazívne bunkové línie rakoviny prsníka MDA-MB-231. Ich klinické skúmanie naznačilo, že vysoká expresia CXCL7 koreluje s progresiou rakoviny prsníka a zlým celkovým prežitím pacientov. Štúdia ďalej odhaľuje, že imunitný cytokín CXCL7, ktorý je vylučovaný monocytmi infiltrujúcimi nádor, stimuloval migráciu rakovinových buniek, inváziu a metastázy, čo prispievalo k podpore progresie rakoviny prsníka. Hodnoty namerané v našej štúdii indikujú UP reguláciu proteínu v subpopulácii CD8+ T-lymfocytov z periférnej krvi pacientok s trojnásobne negatívnym karcinómom prsníka. Porovnanie našich výsledkov s experimentálnymi výsledkami potvrdzuje univerzálnu úlohu CXCL7 pri karcinómoch vznikajúcich z tkanív rôznych orgánov [6, 29].

Novšie štúdie Elman J. S. a kol. [5] odhalili tiež triedu mutácií v nedostatočne preštudovaných, zriedkavo zmienených génoch, označovaných ako „long tail“ (LT) ovládače. Ich kľúčovou výzvou bolo nájsť klinicky relevantné ovládače LT a pochopiť, ako spolupracujú pri manažmente ochorenia. Pomocou in vivo CRISPR skríningu identifikovali väzbový proteín FUBP1 ako LT ovládač. Podľa ich štúdie, FUBP1 spolupracuje s inými nádorovými supresorovými génmi na transformácii epiteliálnych buniek prsníka narušením bunkovej diferenciácie a tkanivovej architekt-

túry. Mechanicky sa FUBP1 podieľa na regulácii metylácie RNA N6-metyladenozínu (m6A) a jeho strata vedie ku globálnym zmenám v zostihu RNA a rozšírenej expresii aberantných izoform. Tieto zistenia naznačujú, že somatická zmena jedného génu zapojeného do zostihu RNA a metylácie m6A môže produkovať potrebnú škálu prispievateľov pre neoplastickú transformáciu [5]. Naša štúdia potvrdila prítomnosť DOWN regulácie tohto proteínu v našich vzorkách pacientok s TNBC. Pribúdajúce dôkazy spoločne preukázali onkogénne aj nádorové supresívne úlohy FUBP1. V štúdiu Kang M. a kol. [13] ukázali, že hladina proteínu FUBP1 bola obohatená vo fáze S a zistili, že nedostatok FUBP1 zmenil progresiu bunkového cyklu, najmä v S fáze, znížením hladín expresie mRNA génov CCNA, lokalizovaných na chromozóme 13q12, kódujúcich cyklín A. Z ich výsledkov sa zdá, že os FUBP1-cyklín A existuje v niekoľkých typoch nádorov. FUBP1 vykazuje heterogénne vzorce expresie medzi rôznymi rakovinovými tkanivami, čo naznačuje, že vykazuje viaceré a komplikované funkcie pri vývoji rakoviny. Okrem toho nedostatok FUBP1 poskytuje bunkám výhody prežitia proti metabolickému stresu a protirakovinovému liekom, čo naznačuje, že môže hrať pozitívnu aj negatívnu úlohu pri malígnom vývoji [13].

Ďalším DOWN regulovaným proteínom v periférnych CD8+ lymfocytoch pozorovaným v našej pilotnej štúdiu bol GRP75. GRP75, známy aj ako mortalín alebo heat shock protein 70 (Hsp70), je proteín patriaci do rodiny heat shock protein 70. Tento proteín sa nachádza v bunkách a hrá dôležitú úlohu v rôznych bunkových procesoch, vrátane ochrany buniek pred stresom a podporou ich prežitia.

Mortalín sa zúčastňuje na rôznych bunkových funkciách, vrátane ochrany proteínov pred denaturáciou, podpory správnej proteínovej skladby a regulácie bunkovej smrti (apoptózy). Okrem toho sa mortalín viaže na iné proteíny a podieľa sa na ich transportovaní cez bunkové membrány.

Poruchy v expresii alebo funkciách mortalínu sa môžu podieľať na rôznych patologických stavoch, ako sú rakovina, neurodegeneratívne choroby a ďalšie. Rozsiahle štúdie potvrdili, že prítomnosť GRP75 sa nachádza v mnohých ľudských malignitách, čo kauzálna koreluje s ich invazívnym rastom, šírením metastáz a rezistenciou na chemoterapiu a rádioterapiu [12, 7]. Je známe, že GRP75 v tkanivách nádorov prispieva k karcinómu, ktoré sú spojené s mliečnymi žľazami [12]. Okrem toho sa GRP75 (mortalín) môže vyskytovať na povrchu rakovinových buniek, zohráva úlohu pri prenose bunkovej membrány a je typickou proteínovou zložkou exozómov vylučovaných nádormi rôzneho pôvodu vrátane nádorov prsníka [9]. GRP75 tiež interaguje s nádorovým supresorom p53, čím inaktívuje schopnosť p53 fungovať ako transkripčný faktor a indukuje apoptózu [28]. V ďalších experimentálnych prácach nadväzujúcich na našu pilotnú štúdiu bude potrebné dať do korelácie nami nameranú down reguláciu daného

proteínu s známymi poznatkami GRP75 v nádorových tkanivách.

V dôsledku malého počtu vzoriek získaných od TNBC pacientok naša štúdia má jednoznačne pilotný charakter. Na presnejšie potvrdenie a overenie biologického vplyvu vybraných proteínov v CD8+ T bunkách sú potrebné ďalšie štúdie.

Summary

We analyzed the proteomic profile of purified CD8+ T whole blood immune cell subsets from 3 diagnosed triple-negative breast cancer (TNBC) patients and 10 healthy age- and gender-appropriate controls using liquid chromatography combined with mass spectrometry. We created a list of all UP and DOWN regulated proteins in our measured samples. Of the sixteen best (based on p-value) differently regulated proteins in our samples of TNBC patients, we observed four proteins previously identified as having a potential role for disease development, either through genetic association, e.g., a cellular response to DNA damage (TM109 protein). The CXCL7 protein, which is released by activated platelets and is associated with incidence and can therefore be considered a biomarker of tumor progression plays a supporting role in several common malignancies, including lung, kidney, colorectal and breast cancers. According to another study, it works with other tumor suppressor genes to transform breast epithelial cells by disrupting cell differentiation and tissue architecture. Our study confirmed the presence of DOWN regulation of the FUBP1 protein, another potential oncomarker, in our samples of TNBC patients. Growing evidence has collectively demonstrated both oncogenic and tumor suppressive roles of FUBP1, and debate about its role in tumorigenesis has been ongoing for several years. Another protein observed in our country was GRP75. Extensive studies have confirmed that GRP75 is found in many human malignancies, which is causally correlated with their invasive growth, spread of metastases, and resistance to chemotherapy and radiotherapy. With our study of CD8+ immune cell proteome, we would like to follow the trend in the use of liquid biopsy for clinical purposes by detecting circulating CD8+ T lymphocytes. Those in the tumor micro-environment could be altered and contain a specific marker signaling the presence of cancer cells at an early stage of cancer by a non-invasive method. Most of the research so far has focused on the study of TIL – tumor-infiltrating leukocytes, which interact directly with tumor tissue and its vicinity, unlike circulating CD8+ T lymphocytes. Patients with TNBC have a poor prognosis due to the aggressive nature of these tumors and lack of targeted therapies, and identifying new relevant protein targets for this patient group is very important.

Tento výskum bol financovaný Agentúrou na podporu výskumu a vývoja projekt APVV-19-0476.

Literatúra

1. Ali H.R., Provenzano E., Dawson S.J., Blows F.M., Liu B., Shah M., Earl H.M., Poole C.J., Hiller L., Dunn J.A., Bowden S.J., Twelves C., Bartlett J.M.S., Mahmoud S.M.A., Rakha E., Ellis I.O., Liu S., Gao D., Nielsen T.O., Pharoah P.D.P., Caldas C., Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12.439 patients. *Ann. Oncol.* 25, 2014, 1536–1543
2. Barnes T.A., Amir E., HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *Br. J. Cancer.* 2017, 117, 451–460
3. Catalfamo, M., Henkart, P.A., Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 2003, 15, 522–527
4. Davatzikos C., Rathore S., Bakas S., Pati S., Bergman M., Kalarot R., Sridharan P., Gastounioti A., Jahani N., Cohen E., Akbari H., Tunc B., Doshi J., Parker D., Hsieh M., Sotiras A., Li H., Ou Y., Doot R.K., Bilello M., Fan Y., Shinohara R.T., Yushkevich P., Verma R., Kontos D., Cancer imaging phenomics toolkit: quantitative imaging analytics for precision diagnostics and predictive modeling of clinical outcome. *J Med Imaging (Bellingham)*, 2018, 5, 011018
5. Elman J.S., Ni T.K., Mengwasser K.E., Jin D., Wronski A., Elledge S.J., Kuperwasser C., Identification of FUBP1 as a Long Tail Cancer Driver and Widespread Regulator of Tumor Suppressor and Oncogene Alternative Splicing, *Cell Rep.*, 2019, 28, 3435–3449
6. Guo Q., Jian Z., Jia B., Chang L., CXCL7 promotes proliferation and invasion of cholangiocarcinoma cells, *Oncol Rep.*, 2017, 37, 1114–1122
7. Havalová H., Ondrovičová G., Keresztesová B., Bauer J.A., Pevala V., Kutejová E., Kunová N. Mitochondrial HSP70 Chaperone System—The Influence of Post-Translational Modifications and Involvement in Human Diseases., *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 8077
8. <https://www.uniprot.org>
9. Huang M.B., Xia M., Gao Z., Zhou H., Liu M., Huang S., Zhen R., Wu J.Y., Roth W.W., Bond V.C., et al., Characterization of Exosomes in Plasma of Patients with Breast, Ovarian, Prostate, Hepatic, Gastric, Colon, and Pancreatic Cancers, *J. Cancer Ther.*, 2019, 10, 382–399
10. Chandramouli K., Qian P.Y., Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics.* 2009, 2009, 239204
11. Chow M.T., Luster A.D., Chemokines in cancer, *Cancer Immunol Res.* 2014, 2, 1125–31
12. Kabakov A., Yakimova A., Matchuk O. Molecular Chaperones in Cancer Stem Cells: Determinants of Stemness and Potential Targets for Antitumor Therapy, *Cells*, 2020, 9, 892
13. Kang M., Kim H.J., Kim T.J., Byun J.S., Lee J.H., Lee D.H., Kim W., Kim D.Y., Multiple Functions of Fubp1 in Cell Cycle Progression and Cell Survival, *Cells.*, 2020, 9, 1347
14. Kumar P., Aggarwal R., An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Obstet Gynaecol.* 293, 2016, 247–269
15. Li L.H., Zhang L., Zhang T., Qi X., Cheng G., Xia L., Serum Chemokine CXCL7 as a Potential Novel Biomarker for Obstructive Colorectal Cancer., *Front Oncol.*, 2021, 10, 599363
16. Li L.H., Zhang L.H., Tian Y., Zhang T., Duan G.L., Liu Y.K., et al., Serum Chemokine CXCL7 as a Diagnostic Biomarker for Colorectal Cancer, *Front Oncol.* 2019, 9, 921
17. Liu S., Foulkes W.D., Leung S., Gao D., Lau S., Kos Z., Nielsen T.O., Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res.* 16, 2014, 432
18. Loibl S., Gianni L., HER2-positive breast cancer. *Lancet.* 389, 2017, 10087, 2415–2429
19. Luen S., Virassamy B., Savas P., et al., The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. *Breast.* 2016, 29, 241–250
20. McLane L.M., Abdel-Hakeem M.S., Wherry E.J., CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. *Annu Rev Immunol* 37, 2019, 457–495
21. Orrantia-Borunda E., Anchondo-Núñez P., Acuña-Aguilar L.E., et al., Subtypes of Breast Cancer, 2022, Chapter 3, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/>
22. Peng L., Cantor D.I., Huang C., Wang K., Baker M.S., Nice E.C., Tissue and plasma proteomics for early stage cancer detection. *Mol Omics.* 14, 2018, 405–423
23. Raskov H., Orhan A., Christensen J.P., Gögenur I., Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2021, 124, 359–367
24. Ren J., Wang B., Li J., Integrating proteomic and phosphoproteomic data for pathway analysis in breast cancer. *BMC Syst Biol.* 2018, 12, 130
25. Segal N.H., Parsons D.W., Peggs K.S., et al., Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res.* 2008, 68, 889–892
26. Shaath H., Elango R., Alajez N.M., Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers.* 2021, 13, 21, 5350
27. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A., Global cancer statistics 2012, *CA Cancer J. Clin.* 65, 2015, 87–108
28. Wadhwa, R. et al., Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein, *Exp. Cell Res.*, 2002, 274, 246–253
29. Wang Y.H., Shen C.Y., Lin S.C. et al., Monocytes secrete CXCL7 to promote breast cancer progression, *Cell Death Dis* 2021, 12, 1090
30. Wellenstein M.D., de Visser K.E., Cancer-cell-intrinsic mechanisms shaping the tumor immune landscape. *Immunity.* 2018, 48, 399–416
31. Yarchoan M., Johnson B.A., Lutz E.R., et al., Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer.* 2017, 17, 209–222
32. Zardavas D., Irrthum A., Swanton C. & Piccart M., Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 2015, 381–394
33. Zhao Y., Sheng M., Zheng L., Xiong D., Yang K., Luo Y., Application of circulating tumor DNA in breast cancer. *Breast J.* 26, 2020, 1797–1800
34. Zhou L., Beuerman R.W., The power of tears: how tear proteomics research could revolutionize the clinic. *Expert Rev Proteomics.* 14, 2017, 189–191

Analýza proteínov subpopulácie CD8+ T-lymfocytov periférnej krvi pacientok s benigným nádorom prsníka

Jozef Parnica¹, Michaela Šulíková¹, Martin Menkyna¹, Mária Kacírová², Soňa Tkáčiková¹, Dávid Tóth³, Marek Lenárt⁴, Dominik Šafčák⁵, Ján Sabo^{1*}

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, ²Medipark, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ³Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, Košice, ⁴I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice, ⁵Klinika rádioterapie a onkológie UPJŠ LF a VOÚ a.s., Košice, * korešp. autor

Skúmanie proteomického profilu periférnych CD8+ T lymfocytov v prítomnosti benígnych nádorov prsníka v tele pacientok je relevantnou oblasťou výskumu, ktorá môže poskytnúť pohľad na imunitnú odpoveď organizmu pacientok spojenú so skorými štádiami lézií prsníka. Aj keď nezhubné nádory prsníka nie sú malígne, imunitný systém stále hrá úlohu pri sledovaní a potenciálnej eliminácii benígnych lézií. Charakterizácia proteomického profilu CD8+ T lymfocytov v krvi pacientok s diagnózou benígneho nádoru prsníka môže viesť k objavu biomarkerov skorých štádií nádorov prsníka, ktoré naznačujú imunitnú aktiváciu alebo dysreguláciu CD8+ T lymfocytov v periférnej krvi pacientok. Tieto biomarkery by bolo možné použiť na včasnú diagnostiku alebo hodnotenie rizika vývoja nádoru z benígnej do malígnej formy.

Analyzovali sme proteomické profily CD8+ T lymfocytov separovaných z periférnej krvi od 7 pacientok s diagnostikovaným benigným nádorom prsníka a 10 zdravých kontrol zodpovedajúceho veku a pohlavia. Medzi dvadsiatimi odlišne exprimovanými proteínmi s najvyššou p-hodnotou sme pozorovali štyri proteíny, ktoré majú potenciálnu úlohu pre rozvoj ochorenia, a to buď prostredníctvom genetickej asociácie, napr. bunkovej odpovede na poškodenie DNA (proteín TM109), alebo progresie a závažnosti (faktor inhibujúci migráciu buniek / metastázu karcinómu prsníka proteín RACK1). Taktiež vysoká expresia proteínu ABRACL, ktorý bol rovnako identifikovaný v našich vzorkách, prispieva k významne zníženému celkovému prežitiu pacientov s rakovinou prsníka. Niektoré ďalšie štúdie potvrdili prítomnosť onkoproteínu RAP1A u niekoľkých ľudských malignít. Ten hrá kľúčovú úlohu v signálnej transdukcii a podieľa sa na rôznych biologických procesoch, ako je bunková proliferácia, delenie a diferenciácia. Podarilo sa nám potvrdiť jeho prítomnosť v našich skúmaných vzorkách. Štúdiom proteómu imunitných buniek CD8+ by sme chceli rozvíjať trend vo využití tekutej biopsie na klinické účely pomocou analýzy proteómu cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov. Väčšina doterajších výskumov sa uberala štúdiom TIL – tumor infiltrujúcich leukocytov, ktoré interagujú priamo s nádorovým tkanivom a jeho blízkym okolím, na rozdiel od analýzy cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov.

Kľúčové slová: CD8+ T bunky, benígny nádor prsníka, proteomická analýza, LC-MS hmotnostná spektrometria

Keywords: CD8+ T cells, benign breast tumor, proteomic analysis, LC-MS mass spectrometry

Úvod

Benígne nádorové ochorenie prsníka u žien je veľmi častým nálezom a je hlavným rizikovým faktorom, ktorý zdvojnásobuje riziko následného karcinómu prsníka [4].

Pomocou mamografie, ultrazvuku a magnetickej rezonancie prsníka a rozsiahleho využívania biopsií je možné u väčšiny pacientok diagnostikovať nezhubné nádorové ochorenie prsníka bez chirurgického zákroku. Pretože väčšina benígnych lézií nie je spojená so zvýšeným rizikom následného karcinómu prsníka, je vhodné vyhnúť sa zbytočným chirurgickým zákrokmi. Pre patológov, rádiológov a onkológov je dôležité rozpoznať benígne lézie, odlíšiť ich od invazívneho karcinómu prsníka a posúdiť riziko vzniku karcinómu prsníka u pacientky, aby bolo možné stanoviť najvhodnejšiu liečebnú modalitu pre každý prípad [17].

Benígne a malígne nádory majú odlišné charakteristiky. Niektoré z týchto vlastností lekárom uľahčujú diagnostiku nádoru [8,20]:

- Benígne nádory: zvyčajne rastú pomaly, majú hladké, zreteľné okraje, neprerastú do okolitého tkaniva alebo orgánov, nenapádajú iné časti tela
- Malígne alebo rakovinové nádory: môžu rýchlo rásť, majú nepravidelné hranice, môžu prerásť do okolitého tkaniva alebo orgánov, alebo sa môžu rozšíriť do iných častí tela.

CD8+ T lymfocyty hrajú kľúčovú úlohu v imunitnom dohľade a obrane proti infekciám a karcinómom. Po stretnutí s antigénou stimuláciou sa naivné CD8+ T bunky diferencujú a získavajú efektorové funkcie, čo im umožňuje eliminovať infikované alebo malígne bunky. Tradične boli cytotoxické T lymfocyty charakterizované svojou schopnosťou produkovať efektorové cytokíny a uvoľňovať cytotoxické granuly na priame zabíjanie cieľových buniek. Objavujúce sa dôkazy však naznačujú odlišné podskupiny efektorových CD8+ T buniek, z ktorých každá vykazuje jedinečné efektorové funkcie a terapeutický potenciál [11].

Po infekcii naivné CD8⁺ T bunky proliferujú a diferencujú sa na efektorové CD8⁺ T bunky, čo im umožňuje účinne eliminovať infikované bunky a chrániť hostiteľa pred ťažkou infekciou. Po odstránení antigénu sa frakcia efektorových CD8⁺ T buniek diferencuje na pamäťové bunky, ktoré môžu okamžite proliferovať po opätovnom vystavení antigénu, čím sa zabezpečí rýchla a silná imunitná odpoveď [15, 28]. Keď sú však CD8⁺ T bunky vystavené perzistentnej stimulácii antigénom, ako je to vidieť pri chronických vírusových infekciách alebo nádoroch, vyčerpajú sa, čím sa zhoršia ich reakcie na následnú stimuláciu antigénom [16, 1, 26].

Kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnotenie zmien proteómu CD8⁺ T lymfocytov, ktoré podmieňujú rozvoj karcinómu, možno dosiahnuť tandemovým použitím kvapalinovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie (LC-MS). Proteomické stratégie založené na LC-MS sa vykonávajú podľa vopred navrhnutých pracovných postupov, ktoré zahŕňajú niekoľko krokov, ako je výber vzorky, spracovanie vzorky vrátane označovania, metódy získavania MS, štatistické spracovanie a bioinformatiká analýza výsledkov s cieľom pochopiť biologický význam zistení. Keďže výber najlepších možností nemusí byť jednoduchý, vyplatí sa to skúmať a hodnotiť minulé a súčasné proteomické prístupy na objavenie nových biomarkerov nádorov. Okrem toho sú dôležité aj bio-informatické nástroje na interpretáciu a vizualizáciu výsledkov proteomiky a návrhy najpopulárnejších techník strojového učenia na výber prediktívnych biomarkerov [3].

Materiál a metódy

Vzorky periférnej krvi boli odobrané od novo diagnostikovaných pacientok s benígnym nádorom prsníka. Štúdia bola vedená v zhode s Helsinskou deklaráciou a bola schválená Etickou komisiou LF UPJŠ v Košiciach, protokol kód 9N/2021, dátum schválenia 17. 6. 2021, Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura 2020/EK/06047, dátum schválenia 25. 6. 2020, a Etickou komisiou Východoslovenského onkologického ústavu a. s., protokol kód EK/1/06/2020, dátum schválenia 1. 6. 2020. Randomizované vzorky periférnej krvi z kontrolnej skupiny zdravých subjektov boli získané z Gynekologicko-pôrodníckej kliniky LF UPJŠ a UN LP v Košiciach, vzorky s benígnym nádorom prsníka boli odobraté na I. chirurgickej klinike LF UPJŠ a UN LP v Košiciach. Informovaný súhlas (2020/EK/06407) bol získaný písomne od žien v oboch skupinách, kontrolnej skupine a skupine s nádorom prsníka. Všetky vzorky boli získané v období od júna 2022 do marca 2023. Desiat zdravých kontrolných vzoriek s priemerným vekom 69 rokov (v rozmedzí 38-84 rokov) a 7 vzoriek bolo odobraných pacientkam s benígnym tumorom prsníka s priemerným vekom 69 rokov (v rozmedzí 38-84 rokov). Výber pacientov s diagnózou karcinóm prsníka, podtyp Luminál A, bol uskutočnený na základe imunohistochemických výsledkov akreditovaným laboratóriom Ústavu patológie UPJŠ LF a UNLP v Košiciach, číslo registrácie 158/Q-

044, certifikovaným podľa ISO 9001:2025, s platnosťou certifikátu do apríla 2026. Akreditácia bola udelená Slovenskou národnou akreditačnou službou (SNAS).

Experimentálny protokol:

Jednotlivým pacientom a kontrolnej skupine bolo odobraných 10 ml periférnej krvi do skúmaviek BD Vacutainer K2EDTA, ochladených na 4 °C a spracovaných do 30 minút od získania. Následne bola krv zriedená s 20 ml izolačného roztoku (2 mmol EDTA+PBS+BSA) a centrifugovaná pri 600 G počas 10 min pri 4 °C. Po centrifugácii sme odstránili vrchnú časť plazmy, tak aby vrstva buniek PBMC (mononukleárne bunky periférnej krvi) a erytrocytov ostala neporušená. Do tejto dvojvrstvy sa pridávali magnetické guľičky s CD8⁺ znakom (Invitrogen Dynabeads, Thermo Fisher Scientific, homogenita izolovanej populácie CD8⁺ určená flow cytometriou podľa výrobcu 98 % - 100 %, výťažnosť metodiky 95 % - 100 %) za účelom separácie subpopulácie leukocytov. Po pridaní CD8⁺ guľičiek do skúmavky so zriedenou krvou došlo k inkubácii po dobu 20 min pri 4 °C v Hulamixéri. Po inkubácii, magnetické guľičky spolu s bunkami s príslušným CD znakom boli odseparované magnetom v magnetickom stojane. Magnetické guľičky s naviazaným CD8 znakom boli 3 krát premývané izolačným roztokom.

Po ukončení premývania buniek, bolo k magnetickým guľičkám pridané 400 µl 50 mM NH₄HCO₃. Subpopulácia leukocytov bola sonifikovaná a vortexovaná v striedavom cykle. Sonifikovalo sa v ultrazvukovej vani (f = 37 kHz, t = 15 min) a ultrazvukovom bloku (y = 85 %, t = 15 min), vzorka bola vortexovaná 5 min v chladničke. Následne boli zo vzorky odseparované magnetické guľičky pomocou magnetu. Každá vzorka sa delila na 3 frakcie. Prvá frakcia, ktorú sme používali na naše merania, činila 200 µl supernatantu vzorky a 1800 µl etanolu, kde počas noci pri -20 °C došlo k zrážaniu proteínov. Druhá frakcia bola len samotná vzorka – supernatant odobraný z magnetických guľičiek, uskladnená v chladničke. Tretiu frakciu predstavovali magnetické guľičky, ktoré boli odseparované v magnetickom stojane a k nim sme pridali 100 µl invitosolu. S touto frakciou sa zopakoval cyklus sonifikovania a vortexovania. Po skončení tohto cyklu, tento typ frakcií bol inkubovaný cez noc v termomixéri pri 21 °C.

Druhý deň frakcie s jednotlivými subpopuláciami leukocytov, ktoré boli cez noc zrážané s etanolom, sa následne centrifugovali počas 20 min pri 18 000 g a 4 °C. Po centrifugácii bol etanolvý supernatant odstránený a pelet vysušený. Do vysušeného peletu sa pridalo 150 µl 50 mM NH₄HCO₃. Magnetické guľičky s CD8⁺ znakom (cez noc inkubované s invitosolom) boli odstránené na magnetickom stojane.

V ďalšom kroku boli stanovené koncentrácie všetkých frakcií s CD8⁺ znakom pomocou BCA metódy. Pri insolúcie digescii boli k vzorkám pridané požadované objemy 0,025 M roztoku DTT a boli inkubované v termomixéri pri 60 °C po dobu 30 minút. Ku vzorkám boli pridané

výpočtom stanovené objemy 0,25 M roztoku IAA a boli inkubované v termomixéri v tme, pri 21 °C a po dobu 30 minút. Napokon boli pridané vypočítané objemy 5 mM roztoku CaCl₂ a bol pridaný trypsin v pomere – trypsin : vzorka = 1:40 (w/w). Vzorky boli inkubované počas noci pri 21 °C. Nasledujúci deň boli vzorky okyslené na pH= 2 až 3 pridaním 20 % kyseliny mravčej. Všetky vzorky boli upravené na požadované objemy buď odparovaním v SpeedVacu alebo pridaným loading (doplňujúceho) roztoku. Vzorky boli centrifugované (20 min., 18 000xg, 4 °C) a merané pomocou metódy LC-MS na hmotnostnom spektrometri - iónová pasca (Amazon speed ETD, Bruker Daltonics).

LC-MS/MS analýza (vyhľadávanie v databáze):

Pre LC/MS experiment sme použili UHPLC systém (Ultimate 3000 RSLC Nano, Thermo Fisher Scientific) a hmotnostný spektrometer iónovej pasce (amazon speed ETD s iónovým zdrojom CaptiveSpray, Bruker Daltonik). V kroku prípravy vzorky kvapalinovej chromatografie sa použila metóda zachytávania a eluovania. 1 ug peptidov z izolovaných lymfocytov (5 ul injektovanej vzorky s koncentráciou 0,2 ug/ul) sa naniesol a zachytil na zachytávacej kolóne Acclaim® PepMap C18 (100 um x 2 cm, veľkosť častíc 5 um, pór 100 Å veľkosť) pred elúciou a separáciou na analytickej kolóne PepMap RSLC C18 na ďalšiu analýzu (75 um x 30 cm, veľkosť častíc 3 um, veľkosť pórov 100 Å). Ako nanášací roztok sa použila 98 % voda a 2 % acetonitril s 0,1 % kyselinou mravčou. Prietok pri nanášaní vzorky bol 8 ul/min. Elučný proces zahŕňal použitie dvoch mobilných fáz s rôznym zložením: mobilná fáza A pozostávala z 90 % vody a 10 % acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravčej, zatiaľ čo mobilná fáza B pozostávala z 95 % acetonitrilu a 5 % vody s 0,1 % kyselina mravčia. Elučný gradient začínal s pomerom 96 % A a 4 % B počas prvých 5 minút. Počas nasledujúcich 90 minút sa pomer mobilnej fázy B postupne lineárnym spôsobom zvyšoval zo 4 % na 35 %. Potom sa uskutočnilo 10-minútové premývanie kolóny s použitím 90 % B, nasledované 15-minútovou reekvilibráciou kolóny s 4 % B. Počas celého elučného gradientu sa prietok udržiaval na 0,3 ul/min. Analýza hmotnostnou spektrometriou s použitím elektrosprejovej ionizácie (ESI) sa uskutočnila na eluovaných peptidoch. Parametre MS skenovania použité v experimente boli nasledovné: bol zvolený kladný iónový mód so skenmi so zvýšeným rozlíšením a kontrolou iónového náboja (ICC) nastavenou na 400 000. Maximálny čas akumulácie bol 50 ms a analyzovaný rozsah m/z sa pohyboval od 300 do 1300. Okrem toho boli nastavenia parametrov skenovania MS/MS nastavené na nasledujúce hodnoty: režim s vysokým rozlíšením, cieľový ICC nastavený na 500 000, maximálny

čas akumulácie 100 ms a šírkou izolácie 2,2 m/z. Identifikácia proteínov sa uskutočnila použitím vyhľadávacieho algoritmu Mascot (Matrix Science, verzia 2.4.0) spolu s databázou SwissProt (verzia 2020_02). Kritériá vyhľadávania boli nasledovné: taxonómia bola obmedzená na Homo sapiens (človek), trypsin bol použitý ako enzým, karbamidometylácia cysteínu (C) bola nastavená ako fixná modifikácia a oxidácia metionínu (M) bola povolená ako premená modifikácia. Boli povolené až dve chybné štiepenia a do úvahy sa brali len peptidy s nabitými stavmi +2 a +3 a minimálnou dĺžkou 3.

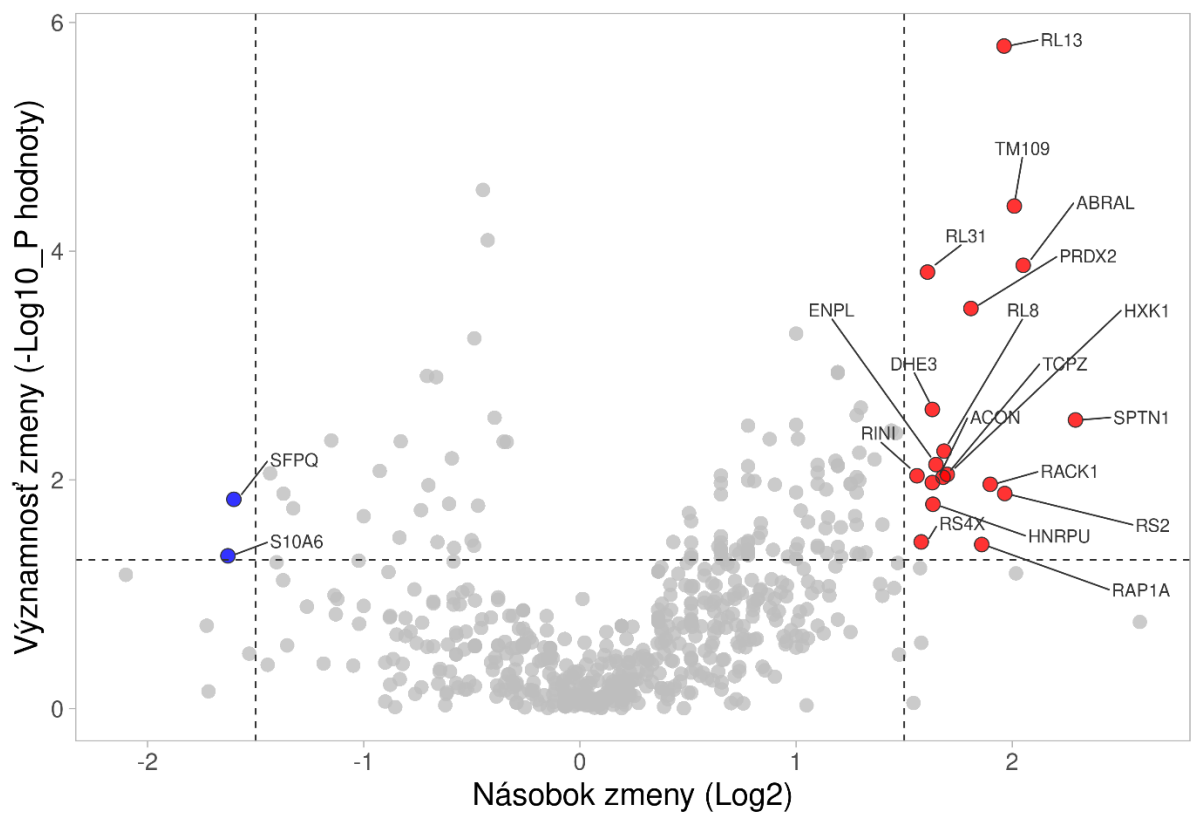
Štatistické metódy:

Uskutočnila sa kvantifikačná analýza proteínov z CD8+ T-lymfocytov v kontrolnej skupine a skupine s benígnym nádorom prsníka. Na vyhodnotenie beta-binomického testu sa použili vážené spektrálne počty a na výpočet p-hodnoty pre každú sadu proteínov sa použil balík BetaBinomial 1.2 R softvéru Proline Studio [5] a nominálna hodnota $p < 0,05$.

Výsledky

V štúdiu sme hodnotili T bunky na úrovni proteínov pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie (LC-MS), aby sme získali poznatky o procesoch v imunitných bunkách a možnosť stanoviť biomarkery pre daný typ tumoru. Analyzovali sme proteomické profily CD8+ T lymfocytov purifikovaných z plnej krvi od 7 diagnostikovaných pacientov s benígnym nádorom prsníka a 10 zdravých kontrol zodpovedajúceho veku a pohlavia. Zamerali sme sa tiež na integráciu dostupných súborov údajov o nádoroch prsníka na úrovni proteómu, aby sme identifikovali a overili nových kandidátov na prognostické biomarkery. Proteomické profilovanie mononukleárných buniek plnej krvi by mohlo prispieť k dosiahnutiu mechanistických poznatkov o vývoji patológie pacientov s benígnym nádorom prsníka.

Podarilo sa nám identifikovať 760 proteínov v CD8+ T bunkách. Aby sa zvýšila šanca na štúdium skutočných kandidátskych proteínov rozdielne exprimovaných medzi prípadmi pacientov s benígnym nádorom prsníka a zdravými kontrolami s potenciálnym vplyvom na funkciu buniek, bol použitý prísnejší filter na selekciu. Výberom, ktoré splnili nasledujúce kritérium (binomická hodnota $P \leq 0,05$ a abs (Log pomer) $\geq 1,5$) v rámci skupiny významne rozdielne exprimovaných proteínov prešlo 20 proteínov. Kladná hodnota (Log 2- pomer benígny / zdravý) signalizuje UP reguláciu a záporná hodnota signalizuje DOWN reguláciu (Obr. 1) daného proteínu subpopulácie CD8+ T-lymfocytov periférnej krvi pacientov s benígnym nádorom prsníka (Tab. 1).



Obrázok 1 Volcano plot: Významne UP regulované (červenou) a DOWN regulované (modrou) proteíny subpopulácie CD8+ T lymfocytov periférnej krvi pacientov s benígnym nádorom prsníka v porovnaní so zdravou kontrolou.

Proteínová sada	Popis	binomická P-hodnota	Násobok zmeny Log2	-log10 (binomická P-hodnota)
SPTN1	Alfa reťazec spektrínu, neerytrocytový 1	0,003	2,2922	2,5236
HNRPU	Heterogénny jadrový ribonukleoproteín U	0,0164	1,6328	1,7864
DHE3	Glutamátdehydrogenáza 1, mitochondriálna	0,0024	1,6301	2,6155
RACK1	Malá ribozomálna podjednotka proteín RACK1	0,0109	1,8979	1,9609
ENPL	Endoplazmín	0,0074	1,6468	2,1336
PRDX2	Peroxiredoxin-2	3,17E-04	1,8086	3,4986
ACON	Akonitát hydratáza, mitochondria	0,0106	1,6301	1,9761
RINI	Ribonukleazový inhibítor	0,0092	1,559	2,0356
HXK1	Hexokináza-1	0,009	1,699	2,0474
RS2	Malý ribozomálny podjednotkový proteín uS2	0,0132	1,9652	1,8801
TCPZ	T-komplex proteín 1, podjednotka zeta	0,0095	1,6798	2,0231
RS4X	Malá ribozomálna podjednotka proteínu eS4, izoforma X	0,0349	1,5787	1,4573
RL13	Veľká ribozomálna podjednotka proteínu eL13	1,61E-06	1,962	5,7933
RAP1A	Ras-príbuzný proteín Rap-1A	0,0368	1,8585	1,4343
RL31	Veľká ribozomálna podjednotka proteínu eL31	1,53E-04	1,6077	3,8167
SFPQ	Zostrihový faktor, bohatý na prolín a glutamín	0,0148	-1,6009	1,8297
S10A6	Proteín S100-A6	0,0462	-1,6284	1,3356
ABRAL	Proteín rodiny Costars ABRACL	1,33E-04	2,0506	3,8759
RL8	Veľká ribozomálna podjednotka proteínu uL2	0,0056	1,6845	2,2512
TM109	Napät'ovo riadený monoatomický katiónový kanál TMEM109	4,03E-05	2,0093	4,3944

Tabuľka 1 Zoznam UP a DOWN regulovaných proteínov, ktoré z celkovo 760 zistených proteínov spĺňali podmienku, že binomická hodnota $P \leq 0,05$ a $abs(Log2) \geq 1,5$. Kladná hodnota (Log2 - benígny / zdravý) signalizuje UP reguláciu a záporná hodnota signalizuje DOWN reguláciu daného proteínu subpopulácie CD8+ T-lymfocytov periférnej krvi pacientov s benígnym nádorom prsníka.

Vytvorili sme zoznam všetkých odlišne exprimovaných proteínov v našich meraných vzorkách (informácie o proteínoch čerpané z UniProt Databazy [9]):

SPTN1_HUMAN (Alfa reťazec spektrínu, neerytrocytový 1)
Tento proteín je zapojený do sekrécie a interaguje s kalmolulínom spôsobom závislým od vápnika. Je teda kandidátom na pohyb cytoskeletu na membráne závislý od vápnika.

HNRPU_HUMAN (Heterogénny jadrový ribonukleoproteín U)
Proteín viažuci DNA a RNA zapojený do niekoľkých bunkových procesov, ako je organizácia jadrového chromatinu, regulácia dĺžky telomér, transkripcia, alternatívne zostrihy a stabilita mRNA, umlčovanie transkripcie a progresia mitotických buniek.

DHE3_HUMAN (Glutamátdehydrogenáza 1, mitochondriálna)
Mitochondriálna glutamátdehydrogenáza, ktorá katalyzuje premenu L-glutamátu na alfa-ketoglutarát. Hrá kľúčovú úlohu pri glutamínovej anapleróze tým, že produkuje alfa-ketoglutarát, dôležitý medziprodukt v cykle trikarboxylových kyselín. Hrá úlohu pri homeostáze inzulínu a môže sa podieľať na reakciách učenia a pamäte zvýšením obratu excitačného neurotransmiteru glutamátu.

RACK1_HUMAN (Malá ribozomálna podjednotka proteínu RACK1)
Proteín lešenia zapojený do získavania, zostavovania a/alebo regulácie rôznych signálnych molekúl. Interaguje so širokou škálou proteínov a hrá úlohu v mnohých bunkových procesoch. Podieľa sa na iniciácii kontroly kvality ribozómov, čo je dráha, ku ktorej dochádza, keď sa ribozóm počas translácie zastaví. RACK1 je prognostický faktor, ktorý podporuje migráciu/metastázu karcinómu prsníka interakciou s RhoA (člen rodiny homológov RasA - malý proteín GTPázy) a aktiváciou RhoA/Rho kinázovej dráhy.

ENPL_HUMAN (Endoplazmin)
Molekulárny chaperón, ktorý funguje pri spracovaní a transporte vylučovaných proteínov a je potrebný na správne skladanie Toll-like receptorov. Ma rôzne funkcie pri degradácii spojenej s endoplazmatickým retikulom a má ATPázovú aktivitu.

PRDX2_HUMAN (Peroxiredoxin-2)
Tiol-špecifická peroxidáza, ktorá katalyzuje redukciu peroxidu vodíka a organických hydroperoxidov na vodu a alkoholy. Zohráva úlohu pri ochrane buniek pred oxidačným stresom detoxikáciou peroxidov a ako senzor signalizačných udalostí sprostredkovaných peroxidom vodíka. Môže sa podieľať na signalizačných kaskádach rastových faktorov a tumor nekrotizujúceho faktora alfa, reguláciou intracelulárnych koncentrácií H₂O₂.

ACON_HUMAN (Akonitát hydratáza, mitochondria)
Katalyzuje izomerizáciu citrátu na izocitrát cez cis-akonitát. metabolizmus uhľohydrátov a cyklus trikarboxylovej kyseliny.

RINI_HUMAN (Ribonukleázový inhibítor)
Inhibítor ribonukleázy, ktorý inhibuje RNAzu1, RNAzu2 a ANG. Môže hrať úlohu pri redoxnej homeostáze.

HXK1_HUMAN (Hexokinase-1)
Katalyzuje fosforyláciu rôznych hexóz, ako je D-glukóza, D-glukózamín, D-fruktóza, D-manóza a 2-deoxy-D-glukóza, na hexóza-6-fosfát (D-glukóza 6-fosfát, D-glukózamín 6-fosfát, D-fruktóza-6-fosfát, D-manóza-6-fosfát a 2-deoxy-D-glukóza-6-fosfát, v tomto poradí). Podieľa sa na vrodenej imunite a zápale tým, že pôsobí ako receptor na rozpoznávanie vzorov pre bakteriálny peptidoglykán.

RS2_HUMAN (Malý ribozomálny podjednotkový proteín uS2)
Komponent ribozómu. Malá ribozomálna podjednotka viaže messengerové RNA (mRNA) a prekladá zakódovaný správu výberom molekúl príbuznej aminoacyl-transferovej RNA. Hrá úlohu pri zostavovaní a funkcii ribozomálnej podjednotky 40S. Mutácie v tomto proteíne ovplyvňujú kontrolu translačnej vernosti a podieľa sa na nukleárnom spracovaní pre-18S ribozomálnej RNA a zostave ribozómov.

TCPZ_HUMAN (T-komplex proteín 1 podjednotka zeta)
Zložka T-komplexu obsahujúceho chaperonín (TRiC), molekulárneho chaperónového komplexu, ktorý napomáha skladaniu proteínov pri hydrolýze ATP. Komplex TRiC sprostredkováva skladanie WRAP53/TCAB1, čím reguluje udržiavanie telomér a pravdepodobne hrá úlohu pri skladaní aktínu a tubulínu.

RS4X_HUMAN (Malá ribozomálna podjednotka proteínu eS4, izoforma X)
Zložka malej ribozomálnej podjednotky. Ribozóm je veľký ribonukleoproteínový komplex zodpovedný za syntézu proteínov v bunke.

RL13_HUMAN (Veľká ribozomálna podjednotka proteínu eL13)
Zložka ribozómu, veľký ribonukleoproteínový komplex zodpovedný za syntézu proteínov v bunke. Malá ribozomálna podjednotka viaže messengerové RNA (mRNA) a prekladá zakódovaný správu výberom molekúl príbuznej aminoacyl-transferovej RNA (tRNA).

RAP1A_HUMAN (Ras-príbuzný proteín Rap-1A)
Indukuje morfológickú reverziu bunkovej línie transformovanej onkogénom Ras. Pôsobí proti mitogénnej funkcii Ras a hrá úlohu pri raste neuritov, indukovanom nervovým rastovým faktorom (NGF). Zohráva úlohu pri regulácii tvorby krvných ciev v embryu. Podieľa sa na vytvorení

funkcie bazálnej endotelovej bariéry. Môže sa podieľať na regulácii expresie KDR receptora vaskulárneho endotelového rastového faktora na endotelových bunkových spojeniach.

RAP1A je členom nadrodiny malých GTPáz a nedávno bol identifikovaný ako nový onkoproteín u niekoľkých ľudských malignít. Hrá kľúčovú úlohu v signálnej transdukcii a podieľa sa na rôznych biologických procesoch, ako je bunková proliferácia, delenie a diferenciácia [18]. Obsahuje päť funkčných podskupín vrátane Ras, Rho/Rac, Rab, Arf a Ran, medzi ktorými sa Ras javí ako najrozsiahlnejšie študovaný. Proteín 1A súvisiaci s Ras (RAP1A) je členom podskupiny Ras a funguje ako kľúčový regulátor v reakcii T buniek [10]. Nedávno pribúdajúce štúdie ukázali, že jeho nadmerná expresia môže prispievať k malignej progresii mnohých ľudských malignít vrátane rakoviny vaječníkov, prostaty, pažeráka a mozgu [14, 21]. Okrem svojej úlohy pri raste nádoru predchádzajúce štúdie preukázali, že prispieva aj k invázii a metastázovaniu rakovinových buniek [14, 2, 13]. Celkovo tieto dôkazy spoločne naznačujú, že RAP1A je kľúčovým onko-proteínom pri vývoji nádoru, a preto môže slúžiť ako potenciálny terapeutický cieľ pre pacientov s rakovinou.

RL31_HUMAN (Veľká ribozomálna podjednotka proteínu eL31)

Komponent veľkej ribozomálnej podjednotky.

SFPQ_HUMAN (Zostrihový faktor, bohatý na prolín a glutamín)

Proteín viažuci DNA a RNA, zapojený do niekoľkých jadrových procesov. Esenciálny pre-mRNA zostrihový faktor potrebný na začiatku tvorby spliceozómu a na zostrihový katalytický krok II. Viaže sa na pre-mRNA v komplexe spliceozómu C a špecificky sa viaže na intrónové polypyrimidínové trakty. Podieľa sa na regulácii signálom indukovaného alternatívneho zostrihu.

S10A6_HUMAN (Proteín S100-A6)

Môže fungovať ako vápnikový senzor a modulátor, prispievať k bunkovej vápnikovej signalizácii. Môže fungovať interakciou s inými proteínmi a nepriamo zohrávať úlohu v mnohých fyziologických procesoch, ako je reorganizácia aktínového cytoskeletu a bunkovej motility. Viaže 2 vápenaté ióny.

ABRAL_HUMAN (Proteín rodiny Costars ABRACL)

Aktín viažuci Rho aktivujúci C-terminálne podobný (ABRACL). Je transkripčne regulovaný MYB proto-onkogénom (MYBL2) a podporuje proliferáciu, inváziu, migráciu a epitelovo-mezenchymálny prechod buniek rakoviny prsníka.

RL8_HUMAN (Veľká ribozomálna podjednotka proteínu uL2)

Zložka veľkej ribozomálnej podjednotky.

TM109_HUMAN (Napäťovo riadený monoatomický katiónový kanál TMEM109)

Funguje ako napäťovo riadený monoatomický katiónový kanál priepustný pre draslík aj vápnik. Hrá úlohu v bunkovej odpovedi na poškodenie DNA.

Diskusia

Štúdia Marty Román a kol. poskytla dôkazy o dlhodobom charaktere rizika rakoviny prsníka po diagnostikovaní nezhubného ochorenia prsníka skríningovou mamografiou. Ženy s benígnym nádorovým ochorením prsníka mali v priemere o 70 % vyššie riziko rakoviny prsníka ako ženy bez ochorenia. Ich výsledky tiež ukazujú, že zvýšené riziko zostalo stabilne zvýšené počas 20 rokov po diagnostikovaní benígneho nádorového ochorenia prsníka. Zvýšenie rizika postihlo ženy všetkých vekových skupín vo veku 50–69 rokov, ako aj všetky obdobia na indexovom mamografe. Ženy s proliferatívnym benígnym ochorením prsníka mali vyššie riziko ako ženy s neproliferatívnym ochorením a rozdiel v riziku zostal v priebehu času [19].

Medzi dvadsiatimi odlišne exprimovanými proteínmi s najvyššou p-hodnotou sme pozorovali štyri proteíny, ktoré majú potenciálnu úlohu pre rozvoj ochorenia, a to buď prostredníctvom genetickej asociácie, napr. bunkovej odpovede na poškodenie DNA (proteín TM109), alebo progresie a závažnosti (faktor inhibujúci migráciu / metastázu karcinómu prsníka interakciou s RhoA a aktiváciou RhoA/Rho kinázovej dráhy proteín RACK1) [25]. Niektoré ďalšie štúdie potvrdili prítomnosť onkoproteínu u niekoľkých ľudských malignít (proteín RAP1A). Ten hrá kľúčovú úlohu v signálnej transdukcii a podieľa sa na rôznych biologických procesoch, ako je bunková proliferácia, delenie a diferenciácia [18, 10, 14, 21]. Podarilo sa nám potvrdiť jeho prítomnosť v našich skúmaných vzorkách.

Ďalším potenciálnym markerom nájdeným v našich vzorkách je proteín ABRACL, ktorý sa predtým nazýval HSPC280 a patrí do novej rodiny proteínov s nízkou molekulovou hmotnosťou. Hlavnou funkciou je regulácia dynamiky aktínu a migrácie buniek, čím sa ovplyvňuje proliferácia a migrácia nádorových buniek. Predchádzajúce štúdie ukázali, že ABRACL sa podieľa na proliferácii nervových progenitorových buniek [7, 22] a taktiež, že expresia ABRACL je zvýšená pri rakovine endometria, rakovine pažeráka a rakovine žalúdka. ABRACL je spojený so zlou prognózou pri týchto rakovinách. Je to pravdepodobne spôsobené tým, že ABRACL sa podieľa na proliferácii a migrácii nádorových buniek [24, 6, 23]. V štúdií Jie Li a Hui Chena sa zistilo, že ABRACL bol vysoko exprimovaný v tkanivách rakoviny prsníka pomocou databázy GEPIA2 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). Vysoká expresia ABRACL prispela k významne zníženému celkovému prežitiu pacientov s rakovinou prsníka. Aby v štúdií zistili expresiu ABRACL v bunkových líniiach rakoviny prsníka, skúmali expresiu ABRACL v normálnej bunkovej línii prsného epitelu MCF-10A a niekoľkých reprezentatívnych bunkových líniiach MDA-MA-231, MCF-7 a SUM190PT. Bolo jasne

vidieť, že expresia ABRACL bola v týchto bunkových líniiach rakoviny prsníka výrazne zvýšená v porovnaní so skupinou MCF-10A. Dôležité je, že najvyššia expresia ABRACL bola pozorovaná v bunkách MCF-7. Preto boli bunky MCF-7 vybrané pre experimenty v tejto štúdii. Na základe vyššie uvedených štúdií možno konštatovať, že ABRACL má hojnú expresiu v bunkách rakoviny prsníka [12].

Štúdiom proteómu imunitných buniek CD8+ by sme chceli rozvíjať trend vo využití tekutej biopsie na klinické účely pomocou analýzy proteómu cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov. Väčšina doterajších výskumov sa uberala štúdiom TIL – tumor infiltrujúcich leukocytov, ktoré interagujú priamo s nádorovým tkanivom a jeho blízkym okolím, na rozdiel od cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov.

Našou štúdiou proteómu imunitných buniek CD8+ by sme chceli nasledovať trend vo využití tekutej biopsie na klinické účely pomocou detekcie cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov. Väčšina doterajších výskumov sa uberala štúdiom TIL – tumor infiltrujúcich leukocytov, ktoré interagujú priamo s nádorovým tkanivom a jeho blízkym okolím, na rozdiel od cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov. Naša štúdia je obmedzená malým počtom testovaných vzoriek a na presnejšie potvrdenie a overenie biologického vplyvu vybraných proteínov v CD8+ T bunkách sú potrebné ďalšie štúdie.

Porovnanie proteomických profilov periférnych CD8+ T lymfocytov pacientok s benígnymi a malígnymi nádormi prsníka môže odhaliť rozdiely v aktivácii imunitných buniek, prezentácii antigénu, stratégiách úniku nádorov imunity a identifikovať molekulárne proteínové vzory špecifické pre každé štádium nádoru a pomôcť pri rozlišovaní medzi benígnymi a malígnymi léziami.

Analýza proteomického profilu CD8+ T lymfocytov v krvi pacientok s diagnózou benígneho nádoru prsníka môže mať klinické dôsledky pre manažment pacienta a terapeutické rozhodovanie a môže poskytnúť informácie o vývoji imunomodulačných stratégií zameraných na využitie protinádorovej imunitnej odpovede v ranom štádiu lézií prsníka alebo na identifikáciu pacientok s vyšším rizikom progresie ochorenia.

Skúmanie proteomického profilu CD8+ T buniek v benígnych nádoroch prsníka ponúka jedinečnú príležitosť odhaliť skorú imunitnú odpoveď spojenú s vývojom nádoru a môže mať dôsledky na prevenciu rakoviny prsníka a stratégie včasnej intervencie.

Literatúra

- Ando, M., Ito, M., Srirat, T., Kondo, T. & Yoshimura, A. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *Immunol. Med.* 43, 2020, 1–9
- Bischoff A., Huck B., Keller B., Strotbek M., Schmid S., Boerries M., Busch H., Muller D., Olayioye M.A., miR149 functions as a tumor suppressor by controlling breast epithelial cell migration and invasion. *Cancer Res.*, 2014, 74, 5256–5265
- Carrillo-Rodriguez P., Selheim F., Hernandez-Valladares M., Mass Spectrometry-Based Proteomics Workflows in Cancer

Summary

Investigating the proteomic profile of peripheral CD8+ T lymphocytes in the presence of benign breast tumors in the body of patients is a relevant area of research that can provide insight into the immune response of the patient's organism associated with the early stages of breast lesions. Although benign breast tumors are not malignant, the immune system still plays a role in tracking and potentially eliminating benign lesions. Characterization of the proteomic profile of peripheral CD8+ T lymphocytes in benign breast tumors may lead to the discovery of biomarkers of early stages of breast tumors that indicate immune activation or dysregulation of CD8+ T lymphocytes in the peripheral blood of patients. These biomarkers could be used for early detection or assessment of the risk of tumor development from benign to malignant form.

We analysed the proteomic profiles of CD8+ T lymphocytes isolated from peripheral blood from 7 patients diagnosed with benign breast cancer and 10 age- and sex-matched healthy controls. Among the twenty differentially expressed proteins with the highest p-value, we observed four proteins that have a potential role for the development of the disease, either through genetic association, e.g. cellular response to DNA damage (TM109 protein), or progression and severity (breast cancer migration/metastasis inhibitor protein RACK1). Also, high expression of the ABRACL protein, which was also identified in our samples, contributes to a significantly reduced overall survival of breast cancer patients. Some other studies have confirmed the presence of the RAP1A oncoprotein in several human malignancies. The latter plays a key role in signal transduction and is involved in various biological processes such as cell proliferation, division and differentiation. We were able to confirm its presence in our examined samples. By studying the proteome of CD8+ immune cells, we would like to develop the trend in the use of liquid biopsy for clinical purposes by analysing the proteome of circulating CD8+ T lymphocytes. Most research to date has focused on the study of TILs – tumor infiltrating leukocytes that interact directly with the tumor tissue and its immediate surroundings, in contrast to the analysis of circulating CD8+ T lymphocytes.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-19-04

Research: The Relevance of Choosing the Right Steps., *Cancers* (Basel), 2023, 15, 555

- Castells X., Domingo L., Corominas J.M., Torá-Rocamora I., Quintana M.J., Baré M., Vidal C., Natal C., Sánchez M., Saladié F., et al. Breast cancer risk after diagnosis by screening mammography of nonproliferative or proliferative benign breast disease: A study from a population-based screening program. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, 149, 237–244
- Catalfamo, M., Henkart, P.A., Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 2003, 15, 522–527

6. Fan S., Chen P., Li S., miR-145-5p Inhibits the Proliferation, Migration, and Invasion of Esophageal Carcinoma Cells by Targeting ABRACL Biomed Res. Int., 2021, 6692544
7. Hsiao B.Y., Chen C.H., Chi H.Y., Yen P.R., Yu Y.Z., Lin C.H., Pang T.L., Lin W.C., Li M.L., Yeh Y.C., Chou T.Y., Chen M.Y., Human Costars Family Protein ABRACL Modulates Actin Dynamics and Cell Migration and Associates with Tumorigenic Growth Int. J. Mol. Sci., 2021, 22, 4, 2037
8. <https://www.healthline.com/health/benign#types>
9. <https://www.uniprot.org>
10. Johnson D.S., Chen Y.H., Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. Curr Opin Pharmacol. 2012, 12, 458-463
11. Koh, CH., Lee, S., Kwak, M. et al. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. Exp Mol Med 55, 2023, 2287-2299
12. Li J., Chen H., Actin-binding Rho activating C-terminal like (ABRACL) transcriptionally regulated by MYB proto-oncogene like 2 (MYBL2) promotes the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. Bioengineered. 2022, 13, 4, 9019-9031
13. Lim J.A., Juhnn Y.S., Isoproterenol increases histone deacetylase 6 expression and cell migration by inhibiting ERK signaling via PKA and Epac pathways in human lung cancer cells. Exp Mol Med. 2016, 48, 204
14. Lu L., Wang J., Wu Y., Wan P., Yang G., Rap1A promotes ovarian cancer metastasis via activation of ERK/p38 and notch signaling. Cancer Med., 2016, 5, 3544-3554
15. Martin, M. D. & Badovinac, V. P. Defining memory CD8 T cell. Front. Immunol. 9, 2018, 2692
16. McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. Annu. Rev. Immunol. 37, 2019, 457-495
17. Merih G., Aysegul A.S., Benign Breast Diseases: Classification, Diagnosis, and Management, The Oncologist, 2006, Volume 11, Issue 5, 435-449
18. Militello R., Colombo MI. Small GTPases as regulators of cell division. Commun Integr Biol. 2013, 6, 25460
19. Román M., Louro J., Posso M., Vidal C., Bargalló X., Vázquez I., Quintana M.J., Alcántara R., Saladié F., Del Riego J., Peñalva L., Sala M., Castells X., On Behalf Of The Bele And Iris Study Groups. Long-Term Risk of Breast Cancer after Diagnosis of Benign Breast Disease by Screening Mammography. Int J Environ Res Public Health., 2022, 19, 5, 2625
20. Santen R.J. Benign Breast Disease in Women, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278994/>
21. Sayyah J., Bartakova A., Nogal N., Quilliam L.A., Stupack D.G., Brown J.H., The Ras-related protein, Rap1A, mediates thrombin-stimulated, integrin-dependent glioblastoma cell proliferation and tumor growth. J Biol Chem., 2014, 289, 17689-17698
22. Stylianopoulou E., Kalamakis G., Pitsiani M., Fysekis I., Ypsilantis P., Simopoulos C., Skavdis G., Grigoriou M.E., HSPC280, a winged helix protein expressed in the subventricular zone of the developing ganglionic eminences, inhibits neuronal differentiation Histochem. Cell Biol., 2016, 145, 2, 175-184
23. Ura, B., Monasta L., Arrigoni G., Franchin C., Radillo O., Peterlunger I., Ricci G., Scrimin F., A proteomic approach for the identification of biomarkers in endometrial cancer uterine aspirate Oncotarget, 2017, 8, 65, 109536-109545
24. Wang D., Liu H.Q., Ren C., Wang L., High Expression of ABRACL Is Associated with Tumorigenesis and Affects Clinical Outcome in Gastric Cancer Genet. Test. Mol. Biomarkers, 2019, 23, 2, 91-97
25. Wang Q., Jiang S., Wu Y., Zhang Y., Huang M., Qiu Y., Luo X. Prognostic and clinicopathological role of RACK1 for cancer patients: a systematic review and meta-analysis. Bioscience Reports, 2023, PeerJ, DOI 10.7717/peerj.15873
26. Wherry, E. J. T cell exhaustion. Nat. Immunol. 12, 2011, 492-499
27. Zhang X, Li Q, Zhang Q, Wei D, Liu R, et al. The multifaceted role of RAP1 in cancer progression. Cellular Signalling, 2021, 81, 109976 DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.109976
28. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. Immunity 35, 2011, 161-168

