

## Záverečná karta projektu

Názov projektu **Modulácia bunkových signálnych dráh pre cieleňú nádorovú terapiu** Evidenčné číslo projektu **LPP-0062-09**

Zodpovedný riešiteľ **prof. RNDr. Peter Fedoročko, CSc.**  
Príjemca **Univerzita P.J. Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Univerzita P.J. Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Biofyzikální ústav AV ČR, Brno, Česká republika (prof. A. Kozubík)
2. Oncology Therapeutic Area, Therapeutic Delivery Unit, Quintiles Transnational, Rockville, MD, USA (Dr. A.J. Sytkowski)
3. Laboratory for Cell and Molecular Biology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, USA (Dr. A.J. Sytkowski)

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Solár P., Hrkčová G., Varinská L., Solárová Z., Kriška J., Uhrínová I., Kello M., Mojžiš J., Fedoročko P., Sytkowski A.J., Location and the functionality of erythropoietin receptor(s) in A2780 cells. *Oncology Reports*, 28, 141-146, 2012.
2. Kriška J., Solár P., Varinská L., Solárová Z., Kimáková P., Mojžiš J., Fedoročko P., Sytkowski A.J., Human erythropoietin increases pro-angiogenic potential of A2780 ovarian adenocarcinoma cells under hypoxic conditions. *Oncology Reports* 30:3, 1455-1462, 2013
3. Mikeš J., Koval' J., Jendželovský R., Mikešová L., Fedoročko P.: Procedure for improved cleaning of FACSAria cuvette flow cell. *Cytometry: Part A* 83:6, 523-527, 2013

4. Mikešová L., Mikeš J., Valeková B., Gyurászová K., Čulka L., Vargová J., Koval' J., Fedoročko P.: Conjunction of glutathione level, NAD(P)H/FAD redox potential and hypericin content as a potential factor affecting colon cancer cells-resistance to photodynamic therapy with hypericin. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.04.003>

5.

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Výsledky projektu rozširujú poznanie základného výskumu a ich potencionálne uplatnenie je predovšetkým v oblasti biomedicíny.

### **CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV**

#### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku** (max. 20 riadkov)

Fluorescenčná mikroskopia EpoR-pozitívnych K562 buniek síce potvrdila lokalizáciu erythropoetínového receptora (EpoR) v cytoplazmatickej membráne, no v prípade A2780 buniek až prietokový cytometer odhalil slabý EpoR signál. Na rozdiel od K562 buniek, väčšina EpoR sa nachádza v bunkách A2780 v cytoplazme a to ako intracelulárny membránový proteín. Zaujímavé je, že utíšenie EpoR expresie v bunkách A2780 malo za následok zníženú proliferáciu a zoslabenie Erk1/2 signálu. Okrem toho, kondicionované médium A2780 buniek ovplyvnených erythropoetínom (Epo) malo stimulačný účinok na bunky HUVEC. Tento účinok bol pozorovaný len v prípade, keď boli bunky A2780 inkubované za hypoxických podmienok. Navyše, Epo zvýšil sekréciu IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF a IFN  $\gamma$  bunkami A2780, ktoré rástli v hypoxických podmienok a indukoval výraznú fosforyláciu STAT-5 v bunkách HUVEC.

Výsledok fotodynamické terapie (PDT) môže byť ovplyvnený vznikom rezistencie alebo zmenami v regulácii bunkovej smrti. Na základe našich výsledkov predpokladáme, že intracelulárna hladina hypericínu (HY) a glutatiónu (GSH) spolu s redoxným stavom buniek predstavujú možnú kombináciu parametrov zodpovedných za primárnu cytotoxicitu HY-PDT. O osude nádorových buniek vystavených účinku HY-PDT rozhoduje v prvom rade množstvo vyprodukovaných radikálov (množstvo HY v bunke) a schopnosť buniek poradiť si s týmto oxidačným stresom, využívajúc redoxný potenciál GSH a NAD(P)H. Iniciácia bunkovej smrti je výsledkom tejto rovnováhy. Translokáciu proteínu AIF sme nepotvrdili v žiadnej z testovaných bunkových línií pri použití IC50 dávky HY-PDT, aj keď bunky odpovedali na PDT s rôznou intenzitou. Vo väčšine testovaných bunkových línií je primárnou formou bunkovej smrti „kaspázami sprostredkovaná apoptóza“.

#### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku** (max. 20 riadkov)

Although fluorescent microscopy of EpoR in positive K562 cells showed cytoplasm membrane localization, A2780 cells did not reveal such a locality and only flow cytometer indicated weak EpoR signal. In opposite to K562, most of the EpoR was found in A2780 cells in the cytoplasm, but more widely as an intracellular membrane protein than a soluble one. Interestingly, the silencing of EpoR expression in A2780 cell resulted in proliferation slow-down and in deprivation of Erk1/2 signalization. Furthermore, conditioned media of erythropoietin (Epo) treated A2780 cells had stimulative effect on HUVEC cells. This effect was only seen when A2780 cells were incubated under hypoxic conditions. Moreover, Epo increased the secretion of IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF and IFN  $\gamma$  by A2780 cells that grew in hypoxic conditions and induced significant phosphorylation of STAT-5 in HUVEC cell.

The consequence of photodynamic therapy (PDT) can be affected by the cell resistance or by changes in programmed cell death regulation. Regarding to our results we may presume, that intracellular hypericin (HY) content, reduced glutathione (GSH) level or redox status

(NAD(P)H/oxidized flavins ratio) precisely correlates with the established toxicity of HY-PDT and therefore it indicates mutual interconnection of these parameters. Our results suggest that the response of the cells exposed to HY-PDT is primarily affected by the amount of generated radicals (intracellular HY content) and the ability of the cells to manage the oxidative stress employing reducing potential of GSH and NAD(P)H. The cell death initiation is then the result of this balance. We did not confirm the AIF translocation in the tested cell lines when treated with IC50 dose of HY-PDT, although the tested cell lines responded with different intensity. We may conclude that the "caspase-mediated apoptosis" was the primary mode of cell death induced by HY-PDT in most of the tested cell lines.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

**Zodpovedný riešiteľ**

prof. RNDr. Peter Fedoročko, CSc.

V Košiciach 27. 09. 2013

**Štatutárny zástupca príjemcu**

prof. MUDr. Ladislav Mirossay, DrSc.

V Košiciach 27. 09. 2013

.....  
podpis zodpovedného riešiteľa

.....  
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu