

Imunofluorescenčná analýza prítomnosti rôznych typov nervových vlákien vo vzorkách ľudského nádoru močového mechúra

Immunofluorescence Detection of Different Types of Nerve Fibers in Human Bladder Cancer Specimens

Mgr. Filip Blaško, PhD.^{1,2}; RNDr. Ľuba Hunáková, CSc.³; MUDr. Lucia Krivošíková, PhD.⁴; MUDr. Kristína Mikuš Kuracinová, PhD.⁴; MUDr. Andrea Janegová, PhD.; doc. MUDr. Stanislav Žiaran, PhD., MPH, FEBU⁵; prof. MUDr. Boris Mravec, DrSc.^{1,2}; prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.⁴

¹ Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

² Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

³ Imunologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

⁴ Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

⁵ Urologická klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Univerzitnej nemocnice Bratislava

Korešpondujúci autor:

prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.

Ústav patologickej anatómie

Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia

Tel: +421 2 9011 9259

E-mail: pavel.babal@fmed.uniba.sk

Abstrakt

Intratumorálne nervové vlákna podporujú vznik a progresiu nádorov a tiež modulujú protinádorovú imunitu. Viaceré štúdie preukázali vzťah medzi zvýšenou denzitou nervových vlákien a zlou prognózou pacientov. V prípade nádoru močového mechúra je množstvo štúdií zameraných na detekciu intratumorálnych nervových vlákien značne limitované. Preto sme sa zamerali na skúmanie prítomnosti a denzity sympatikových, parasympatikových a senzitivných nervových vlákien vo vzorkách zdravých tkanív močového mechúra (CON; n = 10), neinvazívnych (NMIBC; n = 5) a invazívnych (MIBC; n = 5) nádorov močového mechúra pomocou nepriamej duálnej imunofluorescencie. Semikvantitatívna analýza preukázala vyššiu denzitu PGP9.5+ nervových vlákien v CON pri porovnaní s tkanivami nádorov močového mechúra. Okrem toho, denzita nervových vlákien bola vyššia v tkanivách NMIBC v porovnaní s tkanivami MIBC. Dominantným typom nervových vlákien boli sympatikové (TH+) nervové vlákna, pričom parasympatikové (VACHT+) a senzitivné (CGRP+) nervové vlákna boli prítomné vo výrazne menšom množstve. Naše výsledky naznačujú súvislosť medzi poklesom denzity nervových vlákien, progresiou nádoru a horšou prognózou.

Dominantné zastúpenie sympatikovej inervácie podporuje viaceré predchádzajúce zistenia o stimulačnom vplyve adrenergetickej signalizácie na nádorovú progresiu.

Kľúčové slová: autonómne nervy, imunofluorescencia, nádor močového mechúra, nádorová inervácia, senzitivné nervy.

Abstract

Intratumoral nerve fibers promote tumor development and progression and modulate antitumor immunity. Several studies have demonstrated an association between increased nerve fiber density and poor prognoses in patients. Regarding bladder cancer, the number of studies focused on detecting intratumoral nerve fibers is quite limited. Thus, we investigated the presence and density of sympathetic, parasympathetic, and sensory nerve fibers in healthy bladder tissue (CON; n = 10), non-invasive bladder tumors (NMIBC; n = 5), and invasive bladder tumors (MIBC; n = 5) using indirect dual immunofluorescence. Semiquantitative analysis revealed a higher density of PGP9.5+ nerve fibers in the CON compared to bladder tumor tissues. Furthermore, nerve fiber density was higher in NMIBC tis-

sues than in MIBC tissues. Sympathetic (TH+) nerve fibers were the dominant type, while parasympathetic (VACHT+) and sensory (CGRP+) nerve fibers were present in significantly lower densities. Our results suggest an association between decreased nerve fiber density, tumor progression, and a poorer prognosis. The dominant presence of sympathetic innervation supports previous findings on the stimulatory effect of adrenergic signaling on tumor progression.

Keywords: autonomic nerves; bladder cancer; immunofluorescence; sensory nerves; tumor innervation.

1. Úvod

Nádor močového mechúra (BC) predstavuje celosvetovo deviaty najčastejšie diagnostikovaný typ nádorovej choroby, ktorej prevalencia a s ňou asociovaná mortalita sa neustále zvyšujú (1). Na základe miery invázie steny močového mechúra rozlišujeme dva typy nádoru močového mechúra: a) neinvazívny urotelový nádor močového mechúra (NMIBC), ktorý je lokalizovaný v sliznici a podslizničnom tkanive, pričom nepreniká do svalovej vrstvy; b) invazívny nádor močového mechúra (MIBC), ktorý vstupuje do povrchových a hlbokých svalových vrstiev steny močového mechúra (1). Nervové zásobenie močového mechúra sprostredkujú senzitívne (aferentné) a autonómne (sympatikové, parasympatikové) nervové vlákna (2). Sympatikové nervové vlákna (T10-L2) vstupujú do tkaniva močového mechúra prostredníctvom horného a dolného hypogastrického plexu a hypogastrických nervov, pričom parasympatikové nervové vlákna (S2-S4) vytvárajú pelvické splanchnické nervy, inervujúce tkanivo močového mechúra. Senzitívne (aferentné) nervové vlákna sprostredkujú prenos nociceptívnych a mechanoreceptívnych signálov cez hypogastrické a pelvické splanchnické nervy do centrálneho nervového systému (2).

Nádorové tkanivá sú v závislosti od svojej lokalizácie inervované sympatikovými, parasympatikovými a senzitivnými periférnymi nervovými vláknami, ktoré sprostredkujú priamy vplyv centrálneho nervového systému na moduláciu nádorovej progresie a protinádorovej imunitnej odpovede (3, 4). Vplyv nervových vlákien na nádory je sprostredkovaný pomocou uvoľňovania neurotransmiterov a neuromodulátorov z nervových zakončení v tkanive nádorov a ich následnej väzby na receptory buniek nádorového mikroprostredia, alebo tiež pomocou priamej tvorby pseudo-synaptických spojení s nádorovými bunkami (5, 6). Výsledkom je modulácia proliferácie, migrácie a apoptózy nádorových buniek, neoangiogenézy, tvorby metastáz a tiež aktivity imunitných buniek (3, 4, 6). Tieto skutočnosti podporujú výsledky viacerých štúdií, kde bola preukázaná súvislosť medzi zvýšeným množstvom intra-tumorálnych nervových vlákien a nepriaznivou prognózou nádorovej choroby. Sú však dostupné aj štúdie, ktoré preukázali naopak súvislosť medzi nízkou denzitou inervácie a progresiou nádorovej choroby. Preto je množstvo (denzita) nervových vlákien v nádoroch považovaná za významný diagnostický a prognostický faktor pri viacerých typoch nádorov (3, 6 – 8).

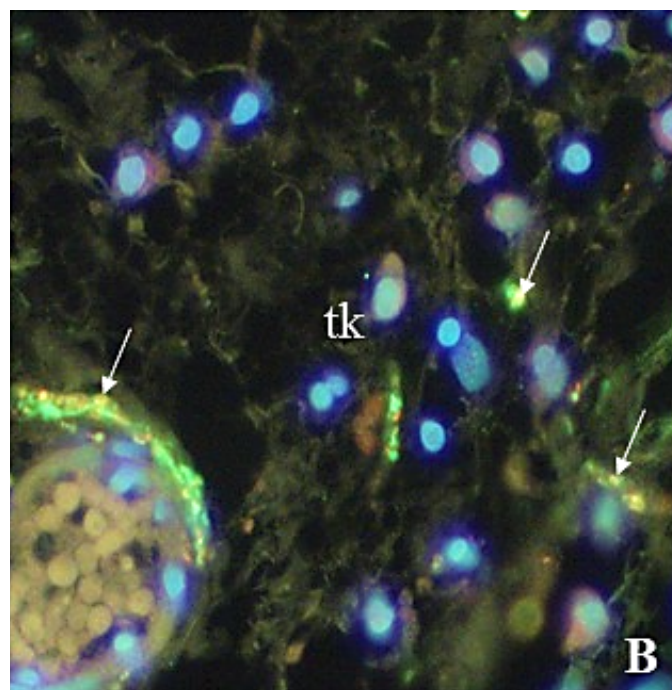
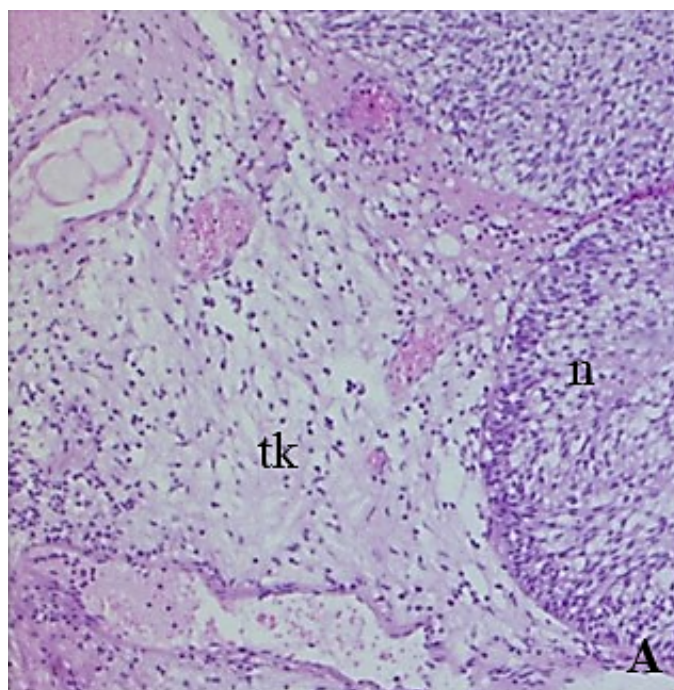
Medzi hlavné metodické postupy umožňujúce štúdium nádorovej inervácie patria imunohistochemia a imunofluorescencia, využívajúce protilátky proti špecifickým neuronálnym proteínovým antigénom prítomným v tkanivách nádorov. Spomedzi širokého spektra monoklonálnych a polyklonálnych protilátok sú najčastejšie používané protilátky proti všeobecným neuronálnym markerom, ako sú proteínový génový product 9.5 (PGP9.5) alebo proteín S100, ako aj protilátky proti špecifickým markerom jednotlivých typov nervových vlákien (napr. tyrozínhydroxyláza – TH alebo neuropeptid Y – NPY pre detekciu sympatikových vlákien; vezikulárny acetylcholinový transportér – VACHT pre detekciu parasympatikových vlákien; substancia P – SP alebo kalcitonínu-génovo príbuzný peptid – CGRP pre detekciu senzitivných vlákien). V tejto súvislosti viaceré práce preukázali zvýšenú denzitu sympatikových nervových vlákien a ich stimulačný vplyv na progresiu nádoru prsníka, prostaty, pečene, pankreasu, kolorekta, nádory hlavy a krku, nádor pažeráka alebo nádor pľúc (4, 6, 9). V prípade parasympatikových vlákien bola preukázaná ich zvýšená denzita a stimulačný vplyv na nádorovú progresiu prevažne pri nádoroch gastrointestinálneho traktu, čo pravdepodobne reflektuje ich fyziologickú funkčnú špecializáciu (10, 11). Mimo tráviaceho traktu bol opísaný stimulačný vplyv parasympatikových vlákien na progresiu a tvorbu metastáz pri nádore prostaty, pečene a pľúc (4, 6). V prípade senzitivných nervových vlákien, ktoré sú bohato zastúpené vo všetkých tkanivách, nie sú údaje o ich vplyve také jednoznačné a vykazujú značnú mieru variability naprieč rôznymi nádorovými diagnózami. Avšak ich stimulačný vplyv bol opísaný pri viacerých typoch nádorov vrátane nádoru prsníka, nádore pankreasu, melanóme a tiež nádoroch hlavy a krku (5, 9).

V prípade karcinómu močového mechúra sú informácie o inervácii tohto typu nádoru veľmi limitované, keďže detailné imunohistochemické a imunofluorescenčné štúdie prakticky neboli doteraz publikované. Jedinou doteraz publikovanou prácou je štúdia, ktorú uskutočnili Seifert et al. (12), kde bola s použitím neuronálneho markera PGP9.5 preukázaná prítomnosť nepravidelne rozmiestnených tenkých zväzkov nervových vlákien v stróme a ojedinele aj v epiteli nádoru močového mechúra, ktoré vykazovali nízku pozitivitu aj na marker parasympatikových nervových vlákien. Cieľom našej štúdie preto bolo preskúmať prítomnosť a denzitu sympatikových, parasympatikových a senzitivných nervových vlákien v ľudskom nádore močového mechúra a tiež posúdiť ich súvislosť s prognózou nádorovej choroby.

2. Materiál a metódy

2.1. Pacienti a vzorky tkanív

V rámci tejto štúdie bolo použitých 10 vzoriek zdravých tkanív močového mechúra (CON) a 10 vzoriek tkanív nádorov močového mechúra, ktoré boli získané od pacientov prostredníctvom transuretrálnej resekcie na Urologickej klinike Univerzitnej nemocnice Bratislava. Na základe patologického štádia boli vzorky nádorov močového mechúra rozdelené na dve skupiny – 5 vzoriek neinvazívnych nádorov močového mechúra (*non-muscle invasive bladder*



Obrázok 1: Detekcia nervových vlákien v neinvazívnom nádore močového mechúra. A: Hematoxylín a eozín, zväčšenie 100×; B: Nepriama duálna imuno fluorescencia, jadrá podfarbené pomocou DAPI na modro, zväčšenie 400×. Nádor (n), podslizničné tkanivo (tk), zeleno sa farbja nervové vlákna (pozitívne na PGP9.5), červeno sa farbja sympatikové nervové vlákna (pozitívne na tyrozínhydroxylázu, TH). Prítomnosť konkrétneho typu nervových vlákien je determinovaná prekryvom všeobecného neuronálneho markeru (PGP9.5, zelená farba) so špecifickým markerom konkrétneho typu nervových vlákien (TH, červená farba), čoho výsledkom je žlté zafarbenie (šípka).

cancer – NMIBC; pTa-pT1) a 5 vzoriek invazívnych nádorov do svaloviny močového mechúra (*muscle-invasive bladder cancer* – MIBC; $\geq$ pT2). Diagnostika tkanivových vzoriek bola uskutočnená dvomi nezávislými patológmi v súlade s kritériami Svetovej zdravotníckej organizácie z roku 2022 (13).

2.2. Histologické spracovanie vzoriek, nepriama duálna imuno fluorescencia

Vzorky tkanív boli spracované štandardným histologickým postupom vrátane fixácie v 10 % neutrálnom formalíne (BD Bamed, Česká republika), zalievania do parafrínových bločkov, prípravy rezov na rotačnom microtome Hyrax M40 (Zeiss, Nemecko) s prednastavenou hrúbkou rezov na 4 μ m, farbenia hematoxylínom a eozínom, a tiež hodnotenia pod svetelným mikroskopom.

Pre nepriame duálne imuno fluorescenčné farbenia boli tkanivové rezy najskôr deparafinizované a rehydratované a následne boli antigénové epitopy demaskované pomocou revitalizácie v prístroji Dako PT-Link (Dako, Glostrup, Dánsko) v 10 mmol/l citrátového pufru (pH 6) pri teplote 96 °C po dobu 30 min. Po premytí vo fosfátovom tlmivom roztoku – PBS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) boli rezy tkanív inkubované počas noci vo vlhkej komôrke pri 4 °C s prvou primárnou protilátkou: králičia polyklonálna protilátka proti tyrozínhydroxyláze – TH (1 : 200; Merck, Darmstadt, Nemecko) pre detekciu sympatikových nervo-

vých vlákien; králičia polyklonálna protilátka proti vezikulárnemu acetylcholínovému transportéru – VACHT (1 : 200; Synaptic Systems, Göttingen, Nemecko) pre detekciu parasympatikových nervových vlákien; alebo králičia polyklonálna protilátka proti kalcitonínu géno- príbuznému peptide – CGRP (1 : 200; Abcam, Cambridge, Spojené kráľovstvo) pre detekciu senzitívnych nervových vlákien. Na druhý deň po premytí v PBS boli rezy tkanív inkubované s prvou sekundárnou fluorescenčnou protilátkou, Alexa Fluor 594 (1 : 200; kozia anti-rabbit; Vector Laboratories, Newark, USA), vo vlhkej komôrke pri izbovej teplote po dobu 30 min. Po inkubácii a premytí v PBS boli tkanivové rezy inkubované s druhou primárnou protilátkou proti všeobecnému neuronálnemu markeru, proteínovému génovému produktu 9.5 – PGP9.5 (1 : 500; myšacia monoklonálna; Abcam) vo vlhkej komôrke pri izbovej teplote po dobu 1 hod. Všetky primárne protilátky boli riedené v antigénovom riediacom roztoku (Agilent Technologies). Po uplynutí inkubácie a premytí v PBS boli rezy tkanív inkubované s druhou sekundárnou fluorescenčnou protilátkou, Alexa Fluor 488 (1 : 200; konská anti-mouse; Vector Laboratories) vo vlhkej komôrke pri izbovej teplote po dobu 30 min. Nakoniec boli tkanivové rezy premyté v PBS, prekryté krycím sklíčkom s montovacím médiom s obsahom 4,6-diamidino-2-fenylindolu – DAPI (Vector Laboratories) a hodnotené pod fluorescenčným mikroskopom Eclipse 80i microscope (Nikon, Tokio, Japonsko).

2.3. Semikvantitatívna analýza denzity nervových vlákien

Celková denzita nervového zásobenia bola hodnotená pod fluorescenčným mikroskopom s objektívom 40× (1 mm²), pričom množstvo nervov bolo semikvantitatívne zadefinované ako nízke (ojedinele sa vyskytujúce nervy), stredné (jeden nerv zachytený v 1 – 3 zorných poliach) a vysoké (niekoľko nervov v jednom zornom poli) na základe imuno fluorescenčnej (zelenej) pozitivity na neuronálny marker PGP9.5. Zastúpenie konkrétneho typu nervových vlákien v jednotlivých tkanivách bolo hodnotené ako žiadne (0 % pozitivita), ojedinelé (ojedinele sa vyskytujúce nervové vlákno/nervové vlákna), nízke (< 5 %), stredné (5 – 10 %) a vysoké (> 10 %) na základe miest prekryvu imuno fluorescenčnej (zelenej) pozitivity na všeobecný neuronálny marker PGP9.5 a imuno fluorescenčnej (červenej) pozitivity na TH (sympatikové nervové vlákna), VACHT (parasymphatikové nervové vlákna) a CGRP (senzitivne nervové vlákna).

3. Výsledky

Semikvantitatívna analýza PGP9.5 pozitivity preukázala vysokú denzitu nervových vlákien v tkanivách CON. Celkové zastúpenie nervových vlákien bolo pritom v CON vyššie ako v tkanivách nádorov močového mechúra. V prípade tkanív nádorov močového mechúra sme zaznamenali vyššiu denzitu nervových vlákien v tkanivách NMIBC v porovnaní s tkanivami MIBC, čo naznačuje vzťah medzi poklesom denzity inervácie, progresiou nádorov a horšou prognózou nádorovej choroby. Z hľadiska fenotypu nervových vlákien naše výsledky preukázali dominantné zastúpenie sympatikových (TH+) nervových vlákien (Obrázok 1), pričom parasymphatikové (VACHT+) a senzitivne (CGRP+) nervové vlákna boli prítomné vo výrazne menšom množstve. V tkanivách NMIBC a CON sme zaznamenali vysokú denzitu sympatikových nervových vlákien, pričom v tkanivách MIBC sme zaznamenali len nízke zastúpenie sympatikových vlákien. V prípade parasymphatikových nervových vlákien takmer všetky vzorky tkanív vykazovali 0 % alebo len nízku úroveň pozitivity na marker VACHT. Podobne aj pozitivita na senzitivne vlákna bola prevažne nízka vo všetkých vzorkách tkanív.

4. Diskusia

V súčasnosti je inervácia nádorových tkanív prostredníctvom sympatikových, parasymphatikových a senzitivných nervových vlákien považovaná za významnú modulačnú charakteristiku proliferácie, metastatického šírenia nádorových buniek a protinádorovej imunity (3, 6). V tejto súvislosti viaceré práce preukázali stimulačný vplyv nervových vlákien na progresiu nádorov, ktorý sprostredkujú signálne dráhy neurotransmiterov a neuromodulátorov, uvoľňovaných z intratumorálnych nervových zakončení alebo presynaptických častí pseudo-synaptických spojení s nádorovými bunkami (5, 10). Tieto skutočnosti navyše podporujú aj zistenia, že nádorové bunky produkujú a uvoľňujú neurotrofických faktorov, molekúl navigujúcich axóny a exozómov obsahujúcich molekuly navigujúce axóny alebo mikroRNA stimulujú vrastanie a ďalší rast nervových vlákien v nádorovom mikroprostredí, čím sa zvyšuje

je nervové zásobenie tkaniva nádoru, ktoré následne môže stimulovať progresiu nádoru (3, 6, 10, 11).

V prípade nádoru močového mechúra preukázali doteraz publikované práce zamerané na hodnotenie vplyvu intratumorálnych nervových vlákien na progresiu nádoru vplyv α - a β -adrenergickej a muskarínovej acetylcholinovej signalizácie v sprostredkovaní vplyvu autonómnych nervových vlákien (14). Tieto práce boli prevažne zamerané na význam farmakologického vyradenia adrenergickej a muskarínovej signalizácie, pričom pozornosť nebola prakticky vôbec venovaná hodnoteniu prítomnosti a denzity nervových vlákien v mikroprostredí nádoru močového mechúra (12, 14).

V našej štúdii sme sa preto zamerali na imuno fluorescenčné hodnotenie prítomnosti a denzity autonómnych a senzitivných nervových vlákien vo vzorkách CON a nádorov močového mechúra. Preukázali sme vysokú hustotu PGP9.5+ nervových vlákien v CON, pričom v tkanivách nádorov bola denzita nervových vlákien nižšia a pozorovali sme pokles v množstve detegovaných nervových vlákien v smere od NMIBC po MIBC vzorky. Tieto výsledky naznačujú asociáciu medzi poklesom množstva nervových vlákien a progresiou nádoru. Naše výsledky sú pritom do značnej miery v súlade so štúdiou, ktorú uskutočnili Seifert et al. (12), kde preukázali v ľudských vzorkách nádoru močového mechúra malé množstvo nepravidelne distribuovaných tenkých nervových zväzkov a tiež veľké množstvo PGP9.5+ hrubých nervových vlákien v hlbšie uložených vrstvách steny močového mechúra (12). Okrem toho sú nami získané dáta v súlade aj s našimi predchádzajúcimi výsledkami z imuno fluorescenčnej analýzy vzoriek nádoru prostaty. V nami realizovanej štúdii sme preukázali vysokú denzitu inervácie v zdravom tkanive prostaty a vo vzorkách benígnej hyperplázie prostaty, pričom v nádorových vzorkách bola denzita inervácie signifikantne nižšia, a zároveň sa znižovala so zvyšujúcim sa Gleasonovým skóre nádorových vzoriek (15). Podobne aj ďalšie práce preukázali zníženie denzity inervácie vo vzorkách ľudského nádoru prostaty (6, 16). Naopak, štúdia, ktorú uskutočnili Lu et al. (14), preukázala v ľudských vzorkách NMIBC a MIBC zvýšenú expresiu postsynaptických proteínov a vysokú denzitu nervových vlákien, čo súviselo s narušením protinádorovej imunity (14). Na základe týchto skutočností predpokladáme, že pri nádore močového mechúra je podobne ako pri nádore prostaty významný vplyv nervových vlákien v počiatočných štádiách nádorovej progresie. Ďalším možným vysvetlením môže byť skutočnosť, že rast nervových vlákien môže byť výrazne pomalší v porovnaní s rastom tkaniva nádoru, a preto sa zdá, že sa denzita inervácie s výraznejšie sa zväčšujúcim objemom nádoru znižuje. Avšak na overenie tohto predpokladu bude potrebné uskutočniť komplexnú štúdiu zameranú na detekciu nádorovej inervácie a jej súvislosti so zmenami v génových expresiách a proteínových hladinách faktorov asociovaných s vplyvom nervových vlákien na nádor a nádorovou progresiou v rôznych štádiách a podtypoch nádoru močového mechúra.

Z hľadiska zastúpenia jednotlivých typov nervových vlákien sme preukázali dominantné zastúpenie sympatikových (TH+) nervových vlákien, pričom ich vysokú denzitu

sme zaznamenali v tkanivách CON a NMIBC a, naopak, nízku denzitu v tkanivách MIBC. Denzita parasimpatikových (VACHT+) a senzitivných (CGRP+) nervových vlákien bola podstatne nižšia v porovnaní so sympatikovými nervovými vláknami, pričom všetky nami analyzované tkanivá vykazovali iba nízku alebo 0 % pozitivitu na jednotlivé markery týchto vlákien. Stimulačný vplyv sympatikových nervových vlákien na rast myšacieho nádoru močového mechúra preukázali vo svojej štúdii Zhou et al. (17), kde vystavenie zvierat rôznym psychosociálnym stresorom viedlo k zvýšeniu hmotnosti nádorov, zvýšeniu sérových hladín adrenalinu a kortizolu, zvýšeniu expresie vaskulárneho endotelového rastového faktoru (VEGF) a Ki-67 a tiež k zníženiu expresie kaspázy-3. Klinická štúdia, ktorú uskutočnili Udumyan et al. (18), preukázala, že užívanie antagonistov β -adrenergických receptorov bolo spojené s nižšou mortalitou pacientov s nádorom močového mechúra. Naše výsledky a výsledky spomenutých prác poukazujú na význam sympatikových nervových vlákien v progresii nádoru močového mechúra. Okrem toho dominantné zastúpenie sympatikovej inervácie a jej stimulačný vplyv na nádorový rast bol preukázaný aj pri iných typoch nádorov vrátane nádoru prsníka, pankreasu, prostaty a ďalších, čo podporuje význam obmedzenia adrenergickej signalizácie v terapii nádoru močového mechúra (4, 6, 9). Podobne s nami preukázanou nízkou denzitou parasimpatikových vlákien v nádore močového mechúra preukázali Seifert et al. (12) veľmi nízku denzitu nepravidelne distribuovaných parasimpatikových vlákien v stróme a epiteli vzoriek nádorov močového mechúra. Okrem toho Wei et al. (19) preukázali nižšiu expresiu muskarínových receptorov typu 3 (M3R) v tkanivách MIBC v porovnaní so zdravým okolitým tkanivom, čo naznačuje protinádorové pôsobenie M3R signalizácie pri nádore močového mechúra, ktorej posilnenie by mohlo byť novým prístupom v terapii nádoru močového mechúra. Na objasnenie vplyvu muskarínovej signalizácie na progresiu nádoru močového mechúra bude potrebné uskutočniť ďalšie štúdie. Vplyv parasimpatikových vlákien vykazuje naprieč rôznymi typmi nádorov rozdielne účinky, pričom najvýznamnejší sa zdá vplyv na nádory gastrointestinálneho traktu (8, 11). Štúdie zamerané na sledovanie vplyvu senzitivných vlákien pri nádore močového mechúra chýbajú, avšak štúdie uskutočnené na iných typoch nádorov, podobne ako v prípade parasimpatikových vlákien, vykazujú značnú mieru variability. Významným sa zdá predovšetkým vplyv senzitivných nervových vlákien na nádory prsníka, hlavy a krku, pankreasu a melanóm (5, 9, 20).

Záver

Výsledky viacerých štúdií preukázali pri rôznych typoch nádorov významný vplyv intratumorálnych autonómnych a senzitivných nervových vlákien na nádorový rast prostredníctvom uvoľňovania neurotransmiterov zo zakončení týchto nervov a aktivácii postreceptorových signálnych dráh. Vysoká denzita nervových vlákien je vo všeobecnosti spájaná s horšou prognózou nádorovej choroby, a to najmä v prípade sympatikových nervových vlákien. Naopak informácie o vplyve parasimpatikových a senzitivných nervových vlákien nie sú konzistentné a vykazujú vysokú mieru

variability naprieč rôznymi nádorovými diagnózami. V prípade nádoru močového mechúra je dostupné len limitované množstvo štúdií o vplyve intratumorálnych nervových vlákien na nádorovú progresiu, ktoré zväčša poukazujú na význam α - a β -adrenergickej signalizácie. Detailné histologické štúdie zamerané na detekciu prítomnosti a denzity jednotlivých typov nervových vlákien v nádoroch močového mechúra prakticky chýbajú. Naše výsledky preukázali vyššiu denzitu nervových vlákien v CON v porovnaní s tkanivami nádorov močového mechúra. Okrem toho sme preukázali vyššiu denzitu nervových vlákien v tkanivách NMIBC ako v tkanivách MIBC, čo naznačuje súvislosť medzi poklesom denzity inervácie a progresiou nádoru. Z hľadiska fenotypového zastúpenia nervových vlákien boli dominantným typom nervových vlákien sympatikové nervové vlákna, predovšetkým v tkanivách CON a NMIBC, pričom parasimpatikové a senzitivné nervové vlákna boli prítomné vo výrazne menšom počte vo všetkých vzorkách. Tieto výsledky podporujú predchádzajúce zistenia o význame sympatikových vlákien a adrenergickej signalizácie pri progresii nádoru močového mechúra. Avšak pred využitím týchto poznatkov v klinickej praxi bude potrebné uskutočniť viaceré detailné histologické štúdie doplnené o molekulárne analýzy pre identifikáciu a následnú cieleňú inhibíciu mechanizmov sprostredkujúcich stimulačný vplyv nervových vlákien na nádor močového mechúra.

Podakovanie

Táto práca bola podporená EU NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti Slovenskej republiky (číslo projektu: 09I03-03-V03-00046).

Literatúra

1. Leslie SW, Soon-Sutton TL, and Aeddula NR. Bladder Cancer. 2024, Florida, US: StatPearls Publishing.
2. Jefferson FA, Okhunov Z, Veneziano D, Rivas JG, Meneses AD, Cacciamani GE, Socarras MR, Wikenhiezer J, and Landman J. Precise characterization of urinary tract innervation using three-dimensional reconstruction: A contemporary review. *Actas Urol Esp (Engl Ed)* 2019. 43(8): p. 397-403.
3. Dwivedi S, Bautista M, Shrestha S, Elhasasna H, Chaphekar T, Vi-zeacoumar FS, and Krishnan A. Sympathetic signaling facilitates progression of neuroendocrine prostate cancer. *Cell Death Dis-cov* 2021. 7(1): p. 364.
4. Zhang L, Wu LL, Huan HB, Chen XJ, Wen XD, Yang DP, and Xia F. Sympathetic and parasympathetic innervation in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* 2017. 64(6): p. 840-846.
5. Ren L, Liu C, Cifcibasi K, Ballmann M, Rammes G, Mota Reyes C, Tokalov S, Klingl A, Grunert J, Goyal K, Neckel PH, Mattheus U, Schoeps B, Yildizhan SE, Sezerman OU, Cevik NC, Sever EA, Karakas D, Safak O, Steiger K, Muckenhuber A, Gorgulu K, Chen Z, Zhang J, Ye L, Maula Ali MI, Tiwari VK, Romanyuk N, Giesert F, Saur D, Rad R, Schmid RM, Algul H, Kruger A, Friess H, Ceyhan GO, Istvanffy R, and Demir IE. Sensory neurons drive pancreatic cancer progression through glutamatergic neuron-cancer pseudo-synapses. *Cancer Cell* 2025.
6. Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, and Frenette PS. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* 2013. 341(6142): p. 1236361.
7. Ali SR, Jordan M, Nagarajan P, and Amit M. Nerve Density and Neuronal Biomarkers in Cancer. *Cancers (Basel)* 2022. 14(19).
8. Zhou H, Shi B, Jia Y, Qiu G, Yang W, Li J, Zhao Z, Lv J, Zhang Y, and Li Z. Expression and significance of autonomic nerves and alpha9 nicotinic acetylcholine receptor in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 2018. 17(6): p. 8423-8431.
9. Kappos EA, Engels PE, Tremp M, Sieber PK, von Felten S, Madduri S, Meyer Zu Schwabedissen M, Fischmann A, Schaefer DJ, and Kalbermatten DF. Denervation leads to volume regression in breast cancer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2018. 71(6): p. 833-839.
10. Wang H, Huo R, He K, Li W, Gao Y, He W, Yu M, Jiang SH, and Xue J. Increased nerve density adversely affects outcome in colorectal cancer and denervation suppresses tumor growth. *J Transl Med* 2025. 23(1): p. 112.
11. Zhao CM, Hayakawa Y, Kodama Y, Muthupalani S, Westphalen CB, Andersen GT, Flatberg A, Johannessen H, Friedman RA, Renz BW, Sandvik AK, Beisvag V, Tomita H, Hara A, Quante M, Li Z, Gershon MD, Kaneko K, Fox JG, Wang TC, and Chen D. Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Sci Transl Med* 2014. 6(250): p. 250ra115.
12. Seifert P, Benedic M, and Effert P. Nerve fibers in tumors of the human urinary bladder. *Virchows Arch* 2002. 440(3): p. 291-297.
13. Board WCoTE. Urinary and Male Genital Tumours (WHO Classification of Tumours). 5th ed. 2022, Lyon, France: World Health Organization. 590.
14. Lu X, Shui KM, Ji H, Chen JY, Yan C, Li P, and Xu T. Nerve infiltration of bladder cancer predicts response to immunotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2025. 761: p. 151687.
15. Blasko F, Krivosikova L, Babal P, Breza J, Trebaticky B, Kuruc R, Mravec B, and Janega P. Innervation density and types of nerves in prostate cancer. *Neoplasma* 2023. 70(6): p. 787-795.
16. Sigorski D, Gulczynski J, Sejda A, Rogowski W, and Izyc-ka-Swieszewska E. Investigation of Neural Microenvironment in Prostate Cancer in Context of Neural Density, Perineural Invasion, and Neuroendocrine Profile of Tumors. *Front Oncol* 2021. 11: p. 710899.
17. Zhou Q, Ding W, Qian Z, Jiang G, Sun C, and Xu K. Chronic Unpredictable Mild Stress Accelerates the Growth of Bladder Cancer in a Xenograft Mouse Model. *Psychol Res Behav Manag* 2020. 13: p. 1289-1297.
18. Udumyan R, Botteri E, Jerlstrom T, Montgomery S, Smedby KE, and Fall K. Beta-blocker use and urothelial bladder cancer survival: a Swedish register-based cohort study. *Acta Oncol* 2022. 61(8): p. 922-930.
19. Wei W, Wang M, Li Y, Meng Q, Tang Y, Lu H, Yu W, Cheng Q, Li Y, Xu L, Jian S, Wu Y, Yi X, and Xie K. Muscarinic cholinergic signaling and overactive bladder-like symptoms associated with invasive bladder cancer. *Oncol Lett* 2018. 16(1): p. 775-784.
20. Keskinov AA, Tapias V, Watkins SC, Ma Y, Shurin MR, and Shurin GV. Impact of the Sensory Neurons on Melanoma Growth In Vivo. *PLoS One* 2016. 11(5): p. e0156095.