

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Adéla Skořepová

Expres genů spojených s rakovinou a vliv modulátorů
CFTR proteinu na tuto expresi

Expression of cancer-associated genes and the impact of
CFTR protein modulators on this expression

Diplomová práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Radek Indra Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08.12.2024



Adéla Skořepová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Radku Indrovi, PhD. za odborné vedení, poskytnutí cenných odborných rad a informací při zpracování diplomové práce a za jeho čas, lidský přístup a trpělivost.

Současně bych chtěla poděkovat RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za poskytnutí cenných rad v laboratoři, Ondřejovi Vaňkovi za vysvětlení PCR metody a Mgr. Veronice Meskařové za pomoc při izolaci RNA. Ráda bych také poděkovala své rodině a kamarádům, která mě v průběhu této práce podporovala, a bez její pomoci by nebylo možné práci dokončit.

Abstrakt

Cystická fibróza je dědičné genetické onemocnění postihující především dýchací a trávicí soustavu. Je způsobeno mutacemi v genu *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), které vedou k poruše transportu iontů a vody přes buněčné membrány. To způsobuje produkci hustého hlenu, který se hromadí v plicích, pankreatu a dalších orgánech. Tento hlen vede k chronickým infekcím dýchacích cest, poškození plic a zhoršenému trávení. Cystická fibróza v České republice postihuje přibližně 1 z 2500 až 4000 novorozenců. Díky novorozeneckému screeningu, který byl zaveden v roce 2009, je možné onemocnění diagnostikovat již brzy po narození a zahájit včasnou léčbu.

V důsledku pokroku v léčbě cystické fibrózy se za posledních třicet let výrazně prodloužila délka života pacientů. To však souvisí s rostoucím rizikem vzniku rakoviny, které se bude s časem dále zvyšovat. Zvýšené onkologické riziko je spojováno s nedostatkem CFTR proteinu. Dospělí pacienti s cystickou fibrózou jsou nejvíce ohroženi rakovinou v oblasti trávicího traktu, zejména tenkého a tlustého střeva, žlučových cest, jícnu a žaludku. Zvláště pacienti, kteří podstoupili transplantaci plic, mají až třikrát vyšší riziko vzniku rakoviny obecně a sedmáctkrát vyšší riziko rakoviny tlustého střeva než pacienti bez transplantace. Hlavním faktorem tohoto zvýšeného rizika je imunosuprese, která je nezbytná k zabránění odmítnutí transplantovaného orgánu.

Hlavním cílem této práce bylo analyzovat expresi vybraných proteinů ve střevních vzorcích pacientů s cystickou fibrózou a porovnat ji s expresí proteinů v plicích buňkách (buněčné linie NuLi-1 a CUFi-1) mezi zdravými jedinci a pacienty s tímto onemocněním.

Byly zjištěny rozdíly v expresi proteinů mezi buněčnými liniemi NuLi-1 a CUFi-1 v různých časových bodech. Zároveň se ukázaly variace v genové expresi mezi jednotlivými pacienty, které mohou být ovlivněny různými faktory, včetně typu mutace genu *CFTR*, jejího dopadu na funkci *CFTR* proteinu, změnami intracelulárních signálních drah a specifickými podmínkami mikroprostředí organoidů.

Klíčová slova: Rakovina, cystická fibróza, terapie modulátory, *CFTR* gen, kolorektální karcinom, rakovina plic

Abstract

Cystic fibrosis is an inherited genetic disease affecting mainly the respiratory and digestive systems. It is caused by mutations in the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene, which lead to impaired ion and water transport across cell membranes. This causes the production of thick mucus that accumulates in the lungs, pancreas and other organs. This mucus leads to chronic respiratory infections, lung damage and impaired digestion. Cystic fibrosis affects approximately 1 in 2500 to 4000 newborns in the country. Thanks to newborn screening, which was introduced in 2009, it is possible to diagnose the disease early after birth and start early treatment.

As a result of advances in the treatment of cystic fibrosis, the life expectancy of patients has increased significantly over the last 30 years. However, this is associated with an increasing risk of cancer, which will continue to increase with time. Increased cancer risk is associated with CFTR protein deficiency. Adult patients with cystic fibrosis are most at risk of cancer in the digestive tract, particularly the small and large intestine, bile ducts, oesophagus and stomach. In particular, patients who have undergone a lung transplant have up to three times the risk of cancer in general and 17 times the risk of colon cancer than patients without a transplant. A major factor in this increased risk is immunosuppression, which is necessary to prevent rejection of the transplanted organ.

The primary aim of this study was to analyze the expression of selected proteins in intestinal samples from patients with cystic fibrosis and compare it to protein expression in lung cells (NuLi-1 and CUFi-1 cell lines) between healthy individuals and patients with this condition.

Differences in protein expression were observed between the NuLi-1 and CUFi-1 cell lines at various time points. Additionally, variations in gene expression were identified among individual patients, which may be influenced by various factors, including the type of CFTR gene mutation, its impact on CFTR protein function, alterations in intracellular signaling pathways, and the specific microenvironment of the organoids.

Keywords: Cancer, cystic fibrosis, modulator therapy, CFTR gene, colorectal cancer, lung cancer

Obsah

1	ÚVOD	10
2	RAKOVINA	11
3	RŮST NÁDORU	11
3.1	NÁDOROVÁ DIAGNOSTIKA A TERAPIE	11
4	RAKOVINA PLIC	12
5	RAKOVINA TLUSTÉHO STŘEVA A KONEČNÍKU	13
6	ORGANOIDY	14
	EXPERIMENTY	14
7	CYSTICKÁ FIBRÓZA	15
7.1	HISTORIE A VÝVOJ POZNÁNÍ CYSTICKÉ FIBRÓZY	16
7.2	CFTR GEN.....	16
7.3	KONTROLA AKTIVITY NF – KB SKRZE CFTR.....	17
7.3.1	<i>Z genu na protein</i>	18
7.3.2	<i>Komponenty transmembránového regulátoru</i>	19
7.4	FAKTORY UPLATŇUJÍCÍ SE V PATOGENEZI	20
7.4.1	<i>Esenciální mastné kyseliny a jejich deriváty</i>	20
7.4.2	<i>Manózu vázající lektin</i>	20
7.4.3	<i>Alfa₁ – antitrypsin</i>	21
7.4.4	<i>Tumor nekrotizující faktor alfa</i>	22
7.5	KLINICKÉ PROJEVY	23
7.5.1	<i>Respirační onemocnění</i>	24
7.5.2	<i>Onemocnění gastrointestinálního traktu</i>	26
7.5.3	<i>Pohlavní orgány</i>	27
7.5.4	<i>Kardiovaskulární potíže</i>	27
7.5.5	<i>Onemocnění jater a žlučových cest</i>	28
7.5.6	<i>Renální potíže</i>	28
7.5.7	<i>Štítná žláza u pacientů s CF</i>	28
7.5.8	<i>Nervový systém</i>	28
7.6	DIAGNÓZA CYSTICKÉ FIBRÓZY	29
7.6.1	<i>Kritéria</i>	29
7.6.2	<i>Laboratorní vyšetření</i>	29
7.7	KOMPLEXNÍ LÉČBA.....	31
7.7.1	<i>Péče o dobrou průchodnost dýchacích cest: inhalace a následná fyzioterapie</i>	31
7.7.2	<i>Péče o dobrý stav výživy</i>	31
7.7.3	<i>Agresivní antibiotika a protizánětlivá léčba</i>	32
7.7.4	<i>Léčba komplikací spojených s CF</i>	32
7.7.5	<i>Psychosociální podpora</i>	32
7.8	TERAPIE CFTR MODULÁTORY	33
7.8.1	<i>Trikafta</i>	33

7.8.2	<i>Symdeko</i>	35
7.8.3	<i>Orkambi</i>	35
7.8.4	<i>Kalydeco</i>	36
8	RIZIKO RAKOVINY U PACIENTŮ S CF	36
8.1	AKTIVACE NF – kB DRÁHY	37
9	CÍL PRÁCE	40
10	MATERIÁL A METODY	41
10.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	41
10.1.1	<i>Použité přístroje</i>	41
10.2	MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	41
10.2.1	<i>Materiál</i>	41
10.2.2	<i>Chemikálie</i>	42
10.3	METODY	43
10.3.1	<i>Kultivace buněčných linií s modulátory</i>	43
10.3.2	<i>Izolace RNA</i>	43
10.3.3	<i>Stanovení koncentrace a čistoty RNA</i>	44
10.3.4	<i>Horizontální elektroforéza RNA na agarosovém gelu</i>	44
10.3.5	<i>Syntéza cDNA – reverzní transkripce</i>	46
10.3.6	<i>Polymerázová řetězová reakce</i>	47
11	. VÝSLEDKY	51
11.1	HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA RNA NA AGAROSOVÉM GELU	51
11.2	STANOVENÍ ČISTOTY RNA	51
11.3	EXPRESE VYBRANÝCH PROTEINŮ IZOLOVANÝCH Z BUNĚČNÝCH LINIÍ	52
11.4	EXPRESE VYBRANÝCH PROTEINŮ IZOLOVANÝCH Z ORGANOIDŮ	60
12	DISKUZE	64
13	ZÁVĚR	70
	ZDROJE	71

Seznam Zkratek

APC	Gen adematózní polypózy tlustého střeva (z angl. <i>adenomatous polyposis coli</i>)
ATP	Adenosintrifosfát
BCL2	Protoonkogen, který působí proti apoptóze (z angl. <i>B-cell lymphoma</i>)
CDH1	Kadherin-1 (z angl. <i>Cadherin-1</i>)
CBY1	Chibby family member 1
cDNA	Komplementární DNA (z angl. <i>Complementary DNA</i>)
CFTR	Transmembránový regulátor cystické fibrózy (z angl. <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
IL-8	Interleukin 8
iPSC	Indukované pluripotentní kmenové buňky (z angl. <i>Induced pluripotent stem cells</i>)
MBL	Manózu vázající lektin (z angl. <i>Mannose-binding lectin</i>)
miRNA	MikroRNA
NBD	Nukleotid vázající doména (z angl. <i>Nucleotide binding protein</i>)
NPD	Nosní potenciálový rozdíl (z angl. <i>Nasal Potential Difference</i>)
NSCLC	Nemalobuněčný typ karcinomu plic (z angl. <i>Non small cell lung cancer</i>)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PKA	Protein kinasa A
PKC	Protein kinasa C
PKG	Protein kinasa G
R	Hydrofilní regulační doména (z angl. <i>Regular domain</i>)
RB	Retinoblastomový protein (z angl. gene of <i>Retinoblastoma</i>)

RT	Reverzní transkriptasa
SCLC	Malobuněčný typ karcinomu plic (z angl. <i>Small cell lung cancer</i>)
TDC	Buňky tkáňového původu (z angl. <i>Tissue-derived cells</i>)
TBE	Tris-Borát-EDTA
TMD	Transmembránová doména (z angl. <i>Transmembrane domain</i>)
TNFR	Receptor tumor nekrotizujícího faktoru (z angl. <i>Tumor necrosis factor receptor</i>)
TP53	Nádorový protein 53 (z angl. <i>Tumor protein 53</i>)
TRADD	Receptor tumor nekrotizujícího faktoru typu 1 asociovaný proteinem domény DEATH (z angl. <i>Tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein</i>)

1 Úvod

Rakovina je celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. Počet zasažených tímto onemocněním neustále roste, a to především v méně vyspělých zemích, kde není přístup ke včasné kvalitní diagnostice a léčbě. Toto onemocnění se může objevit v téměř každém orgánu nebo tkáni těla. Abnormální buňky začnou nekontrolovaně růst, napadají okolní buňky a šíří se do dalších orgánů (WHO).

Rakovina plic se stává nejčastěji se objevující rakovinou na světě. V České republice je každoročně diagnostikováno přes 6600 pacientů karcinomem plic, z nichž asi 5200 pacientů zemře. U mužů můžeme mezi roky 2013 až 2022 pozorovat pokles incidence (-13,1 %) i mortality (-17,8 %), u žen naopak roste jak incidence (+21,1 %), tak mortalita (+7,6 %). U mužů je incidence i mortalita karcinomu plic vyšší než u žen. Brzká diagnóza v méně pokročilém klinickém stadiu vede k podchycení daného onemocnění. V ČR jsou noví pacienti s karcinomem plic diagnostikováni často až ve třetím klinickém stadiu (67 %), což má negativní dopad na mortalitu v české populaci. V časném stadiu onemocnění, které má nejlepší prognózu, je zachyceno pouze 18 % nádorů (Májek 2022, Čoupková 2024).

Rakovina tlustého střeva a konečníku neboli kolorektální karcinom patří společně s rakovinou plic mezi nejčastější rakoviny. Ročně je v ČR diagnostikováno přes 7700 pacientů s kolorektálním karcinomem a kolem 3400 pacientů na tento zhoubný nádor umírá. Opět můžeme pozorovat rozdíl v incidenci a mortalitě mezi muži a ženami. V tomto případě je opět incidence i mortalita kolorektálního karcinomu vyšší u mužů než u žen. V posledních letech dochází u obou pohlaví ke snížení incidence i mortality (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2022).

„Cystická fibróza je autozomálně recesivně dědičné onemocnění zasahující asi 85 000 pacientů na celém světě.“ V roce 1989 kdy byl identifikován CFTR gen, začalo zaměření na vývoj nových terapií směřující k opravě mutovaného genu. Terapie CF probíhala na základě symptomatické léčby v podobě fyzioterapie, mukolytik, antibiotik, léků s protizánětlivým účinkem a léků vedoucích ke zlepšení stavu výživy pacienta. S postupem času došlo k rozvoji kauzální léčby CF. Hlavní cíl bylo ovlivnit molekulární defekt jako příčinu samotného onemocnění. V současné době máme k dispozici čtyři CFTR modulátory, které účinkují na 90 % pacientů s CF (Doušová 2020).

Je známo, že lidé s CF mají vyšší pravděpodobnost k výskytu některých typů rakoviny. Mezi nejčastěji se objevujícími druhy rakoviny jsou rakovina tlustého střeva a konečníku, slinivky břišní a dýchacích cest. Základní mechanismy, které vedou ke vzniku rakoviny, nejsou zcela objasněny. Uvažuje se nad chronickým zánětem, změnami střevní mikroflóry či genetických faktorech (Parisi 2023).

2 Rakovina

Rakovina je celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. Muži jsou nejčastěji postiženi rakovinou prostaty, plic, průdušek, tlustého střeva a konečníku. U žen je nejčastější výskyt rakoviny prsu, plic, průdušek, tlustého střeva a konečníku, dále v děložním čípku nebo ve štítné žláze. U dětí se nejčastěji rakovina vyskytuje v krvi, mozku či lymfatických uzlinách (Hassanpour a Dehghani 2017).

Rakovina je onemocnění, kde dochází k nekontrolovanému růstu tělesných buněk a šíření do dalších částí těla. Za normálních podmínek buňky rostou a množí se – procesem buněčného dělení. Pokud buňky zestárnou nebo dojde k poškození, odumřou a nastoupí buňky nové. V procesu buněčného dělení může dojít k narušení a poškozené buňky rostou a mohou vytvořit shluk tkáně, tzv. nádor.

Rozlišujeme dva typy nádorů. Zhoubné nádory podléhají procesu metastazování. Šíří se do okolních tkání a mohou cestovat až do vzdálených míst. Nezhoubné nádory se od zhoubných liší tak, že se nešíří do okolních tkání (What Is Cancer? 2007).

3 Růst nádoru

Rakovina vzniká změnami v genech, které následně řídí fungování našich buněk. Mezi genetické změny patří – poškození DNA chemickými látkami (tabákový kouř, alkylační látky, organické sloučeniny těžkých kovů), fyzikálními faktory (ultrafialové záření a ionizující záření), biologickými faktory (onkologické viry) nebo zdědění po rodičích.

Vznik rakoviny postihuje obvykle tři typy genů – protoonkogeny, tumor supresorové geny a geny pro opravu DNA. Protoonkogeny zajišťují normální růst a dělení buněk. Mohou se přeměnit na onkogeny, které podporují růst poškozených buněk. Tumor supresorové geny mají na starosti řízení růstu a dělení buněk. Změnou v těchto genech dochází k nekontrolovanému dělení. „Geny pro opravu DNA se podílejí na opravě poškozené DNA.“ Změnami v těchto genech dochází k dalším mutacím v jiných genech a může docházet ke změnám v chromozomu (např. duplikace a delace) (What Is Cancer? 2007).

3.1 Nádorová diagnostika a terapie

U zhoubných nádorů je potřeba vyšetřit vzorek tkáně – prostřednictvím biopsie nebo krve. Definitivně je nádor potvrzen po vyšetření histologie a cytologie. U solidních nádorů se navíc odebrá okolní tkáň, aby se zjistilo, zda se nádor šíří do okolí. K vyšetření změn buněk a popisu pronikání nádorů do okolních krevních cév a lymfatických cév se využívá tzv. grading. K identifikaci a přesné diagnóze jsou využívány tzv. markery, které jsou pro daný nádor charakteristické. K určování rozsahu onemocnění nám slouží tzv. staging. Klinický staging je založen na základě fyzikálního vyšetření a součástí je zobrazovací metoda (např. RTG či CT) a metoda nukleární medicíny (např. scintigrafie). Patologický staging je založen na chirurgických

postupech. Jde o vyšetření regionálních lymfatických uzlin, vizuální kontrolu přilehlých orgánů a histologické vyšetření postižené tkáně. Personalizovaná léčba je postavena i na základě analýzy genů (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2022).

V současné době dochází ke zlepšení v oblasti nanomedicíny. Důležitá charakteristika nanočástic je jejich biologická vlastnost. Díky malé velikosti a velkému poměru povrchu k objemu, se dokáže navázat, absorbovat a přenášet sloučeniny v podobě molekul léčiv, DNA, RNA, proteinů a sond. Nanočástice tak mohou být využívány pro diagnostiku a léčbu rakoviny (Thakor a Gambhir 2013).

4 Rakovina plic

Rakovina plic patří mezi nejčastěji diagnostikovanou rakovinu a stává se tak hlavní příčinou úmrtní. Mezi nejčastější příčiny se řadí kouření tabáku, který se spojuje s 80 až 90 % všech diagnóz. Oproti tomu existuje i řada pacientů, kteří jsou skupinou nekouřících osob, a přesto lze u nich rakovinou diagnostikovat. Přežití těchto pacientů se během několika desetiletí zlepšilo jen nepatrně (Schabath a Cote 2019). Celková míra přežití u karcinomu plic je přibližně 15 %. Důležitá je včasná diagnostika rakoviny plic, zejména při screeningu vysoce rizikových skupin obyvatelstva (např. kuřáci, expozice výfukovým plynům, ropná pole, toxická pracoviště). V současné době se pro screening používá nízkodávková CT. Její selektivita dosáhla 85 % a specifita 99 % (Nooreldeen a Bach 2021).

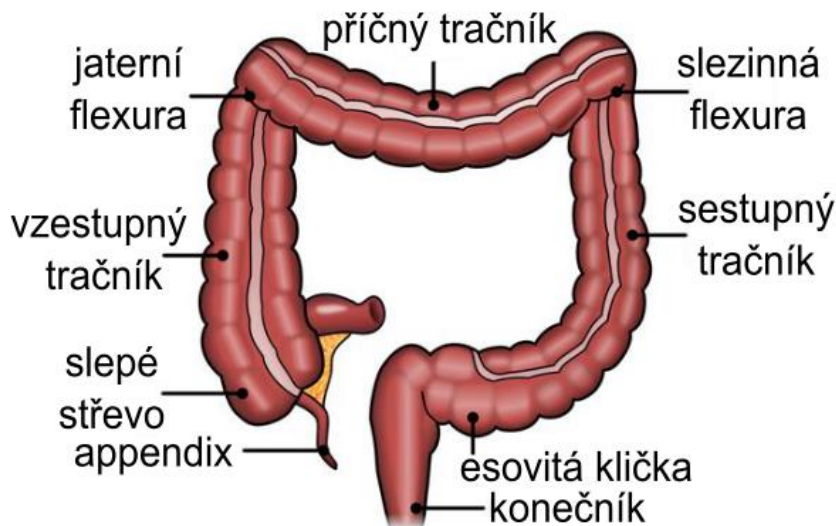
Rozlišujeme různé podtypy karcinomu plic. Je potřeba řešit heterogenitu lidských karcinomů plic, aby byla nastavena účinná léčba. V současnosti se využívají různé potenciální biomarkery. Karcinomy plic rozdělujeme na malobuněčné (SCLC) (z angl. *Small cell lung cancer*) a nemalobuněčné (NSCLC) (z angl. *Non small cell cancer*). Rozdíl je brán z klinického hlediska, z hlediska genetiky a biologie nádoru. SCLC vzniká z centrálního nádoru, který vychází z podkoží dýchacích cest jako per-hilární útvar. Tento druh karcinomu vychází z neuroendokrinních buněk bazálního bronchiálního epitelu. Rozsáhlý karcinom může metastazovat do mozku, jater a kostí, zatímco limitovaný karcinom se soustředí do jednoho bodu. NSCLC se dělí na adenokarcinom, velkobuněčný a dlaždicobuněčný karcinom (Miller 2005, Park 2011, Nooreldeen a Bach 2021).

K patogenezi karcinomu plic přispívají onkogeny – c-myc, K-ras, cyklin D1 a BCL2. U SCLC je pozorována amplifikace c-mys, N-myc a L-myc, zatímco mutace ras se nevyskytuje. Mutace K-ras je přítomna v části lidských adenokarcinomů plic. Tumor supresorové geny jsou spojeny s familiárními nádorovými syndromy. Mezi účastníci se tumor supresorové geny patří – p53, Rb a p16. U SCLC jsou inaktivovány supresory p52 a Rb a u NSCLC je navíc inaktivován nádorový supresor p53 (Minna 2002, Miller 2005).

5 Rakovina tlustého střeva a konečníku

Rakovina tlustého střeva spadá společně s rakovinou plic k nejčastějším nádorům na světě. Každý rok se diagnostikuje přes 250 000 nových případů rakoviny tlustého střeva (Labianca 2010). Poslední roky se pozoruje pokles úmrtnosti, díky účinnosti pokroků v prevenci, screeningu a terapii (Markowitz 2002). Přibližně 25 % případů má původ v rodinné anamnéze, avšak 75 % má sporadickou formu (Zoratto 2014).

Tlusté střevo se skládá ze vzestupného tračnicku, který přechází v tračník příčný (Obrázek 1). Následuje sestupný tračník, který přechází v esovitou kličku a je zakončeno konečníkem. Nádory se často objevují v dolní části tlustého střeva, v oblasti esovité kličky a konečníku (Holubec 2004).



Obrázek č.1 – **Popis jednotlivých částí tlustého střeva** (The Colon: What it is, What it Does)

Tlusté střevo se skládá z epitelových buněk. Při vzniku rakoviny dochází k vícečetnému procesu neoplazie (Markowitz 2002). Dochází ke genetickým a epigenetickým změnám, které se hromadí. Součástí genetických změn je – chromozomální nestabilita (zkr. CIN, z angl. *Chromosomal instability*), mikrosatelitní nestabilita (zkr. MSI, z angl. *Microsatellite instability*) a fenotyp CpG ostrovního metylátoru (zkr. CIMP, z angl. *CpG island methylator phenotype*), zatímco mezi epigenetické události náleží methylace DNA, modifikace histonových proteinů a aberace miRNA (Zoratto 2014).

Rozlišujeme nádory benigní – adenom, maligní – adenokarcinom a nejistý nádor karcinoid. Adenom se nachází v jakékoliv části střeva uvnitř sliznice a působí na okolí jen tlakem svého růstu. Karcinom se často nachází v oblasti esovité kličky a rekta. Proniká dovnitř

do stěny střeva. Karcinom invazivně prorůstá do stěny střeva a vytváří metastázy v lymfatických uzlinách a játrech (Holubec 2004).

Kroky podílející se na tumorigenezi navrhli E.R. Fearon a B. Vogelstein, tzv. model sekvence adenom – karcinom. Prvním krokem je inaktivace genu APC (z angl. *adenomatous polyposis coli*), který způsobuje adenom. Druhým krokem je mutace K-ras, která vede k podpoře růstu adenomu. Dochází ke ztátě heterozygoty, která umožňuje progresi adenomu a nakonec inaktivace nádorového proteinu p53 (zkr. TP53, z angl. *Tumor protein 53*), který vede k přechodu do karcinomu (Zoratto 2014).

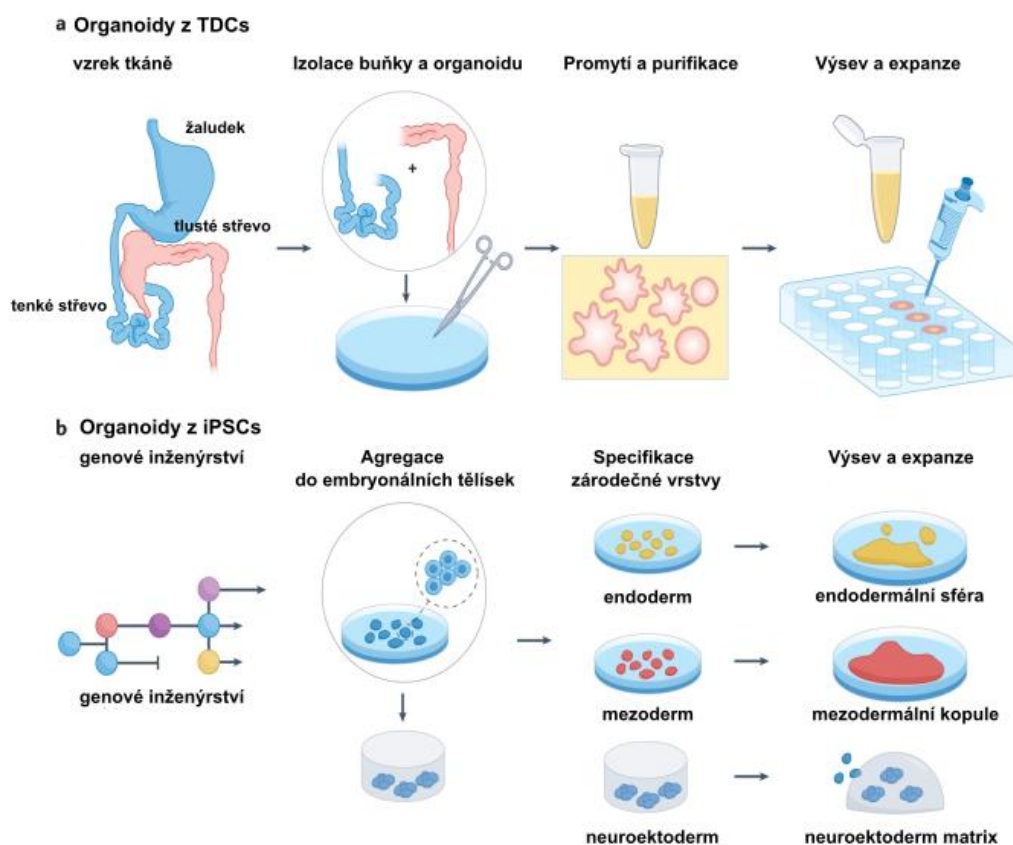
6 Organoidy

Organoidy pocházejí z indukovaných pluripotentních kmenových buněk (zkr. iPSC, z angl. *Induced pluripotent stem cells*) nebo buněk tkáňového původu (zkr. TDC, z angl. *Tissue-derived cells*), včetně normálních kmenových/progenitorových buněk, diferencovaných buněk ze zdravých nebo nemocných tkání (Obrázek 2). Jedná se o jednoduché modely *in vitro* založené na tkáňovém inženýrství, které se snaží napodobit komplexní struktury a funkce odpovídající tkáním *in vivo*. Organoidy lze využít v diagnostice, modelování nemocí, objevování léčiv a personalizované medicíně. Výhodou organoidů oproti zvířecím modelům je jejich lepší přístup pro manipulaci a hloubkové biologické studie (Zhao 2022).

Experimenty

Pro získání organoidů z TDC je potřeba pracovat se vzorky tkáně člověka či zvířete (např. střeva a žaludek). „Vzorky střevní tkáně se otevrou, promyjí a poté rozřezou na malé fragmenty (2-4 mm).“ Důvod rozřezání je zvětšení plochy pro enzymatické štěpení či jinou mechanickou disociaci za účelem izolace jednotlivých střevních kmenových buněk nebo krypt. Po promývání a následných krocích purifikace se sklizené kmenové buňky nebo krypty využijí pro výsev a vytvoření organoidních kultur pro expanzi (Zhao 2022).

Organoidy z iPSC se získávají pomocí genetického inženýrství. „Expandují jako nediferencované klonální populace na napájecích buňkách nebo definovaných substrátech extracelulární matrix, aby se shlukovaly do embryonálních tělísek. iPSC jsou sklizeny jako buněčné agregáty, které zachovávají kontakt mezi buňkami a poskytují buněčné populace s vyšší životaschopností. Tyto agregáty jsou dále indukovány prostřednictvím specifikace zárodečné vrstvy k vytvoření endodermálních koulí, mezodermálních kopulí a neuroektodermální matrix pro další aplikace“ (Zhao 2022).



Obrázek č. 2 – Proces přípravy organoidů vycházející z TDCs a iPSC (Zhao 2022)

7 Cystická fibróza

Cystická fibróza je řazena mezi nejčastější genetické poruchy, která se vyskytuje jednou z 3500 bělošských porodů v USA. Jedná se o autozomální recesivní genetické onemocnění (Liu 2016). Cystická fibróza je způsobena mutací v genu pro transmembránový regulátor cystické fibrózy, což vede k nefunkčnímu proteinu. Výsledkem jsou opakované plicní infekce, záněty a obstrukce průtoku vzduchu. V současné době podstupuje v USA transplantaci přibližně 200–250 jedinců za rok. Díky novodobé léčbě se mnoho pacientů dožije dospělosti, kdy se zvyšuje pravděpodobnost vzniku rakoviny (Maisonneuve 2013). Jedná se především o malignity trávicího traktu, slinivky břišní a žlučníku. U pacientů, kteří podstoupili transplantaci plic, se objevuje rakovina až třikrát více než u pacientů bez CF. Příčinou je imunosuprese podávaná za účelem prevence odmítnutí transplantovaného orgánu (Fink 2017).

7.1 Historie a vývoj poznání cystické fibrózy

První zmínky o nemoci cystické fibrózy pochází ze starověkého folklóru ze severní Evropy. Byl zde záznam, že pokud políbíte dítě se slanou chutí, je zakleté a brzy zemře. Profesor Guido Fanconi dal do souvislosti v roce 1936 celiakii a cystickou fibrózu slinivky břišní s bronchiektáziemi a napsal o tom v práci – „Známá cystická fibromatóza slinivky břišní s bronchiektáziemi“ (Pérez-Frías 2019).

Onemocnění cystická fibróza byla poprvé popsána v roce 1938. Byla spojena s malabsorpcí, poruchou růstu a plicní infekcí. V daném období bylo průměrné dožití 6 měsíců. V roce 1946 zjistili Andersen a Hodges, že je CF způsobena genetickou poruchou, ale až v roce 1989 ve spolupráci doktorů Tsuiho a Collinse byla prokázána zvýšená reabsorpce sodíku a defektní transport chloridů. „V roce 1991 bylo prokázáno, že protein CFTR tvoří chloridový kanál, a že k jeho otevření je třeba hydrolýza ATP. To vedlo k objevu nových diagnostických testů, možností výzkumů a vyhlídky na využití genu k terapii“ (Dave 2021, Pérez-Frías 2019).

7.2 CFTR gen

Příčinou onemocnění je nedostatek CF transmembránového regulátoru. Tento protein, který patří mezi ABC transportéry, má funkci chloridového a aniontového kanálu, a tudíž je zapojen do řady fyziologických procesů (Castellani a Assael 2017).

Nedostatek CFTR se může projevit onemocněním dolních a horních dýchacích cest, střev, slinivky břišní a jater. Důležitou roli hraje u hypotalamu, ledvin a kostí, neboť špatnou funkcí může docházet k růstové retardaci, opoždění puberty, modulaci kostní denzity či náchylnosti k ledvinovým kamenům. U pacientů s CF se považují za sekundární onemocnění plic a střev. Vyšší hladina tohoto proteinu může způsobovat sekreční průjmy a polycystické onemocnění ledvin.

Mutace CFTR lze rozdělit do šesti kategorií podle mechanismu dysfunkce a vlivu na protein. Znalosti těchto skupin umožňuje navržení nových léčebných postupů. Pacienti s určitou reziduální aktivitou proteinu mají mírnější onemocnění než pacienti třídy 1-3, kde dochází k zhoršování respiračních funkcí a závažnějšímu plicnímu onemocnění. „Jednotlivé třídy se však fenotypově značně překrývají a na základě genotypu CFTR nelze předpovědět individuální výsledek. Korelace mezi genotypem a projevy onemocnění je ovlivněna různými faktory“ (Castellani a Assael 2017).

Cystická fibróza (CF) je způsobena různými mutacemi genu CFTR, které vedou k dysfunkci chloridového kanálu. Nejčastější mutací genu CFTR, která způsobuje cystickou fibrózu, je mutace $\Delta F508$ (delece fenylalaninu na pozici 508). Tato mutace se vyskytuje přibližně u 70–80 % pacientů s tímto onemocněním v evropské populaci. Mutace $\Delta F508$ vede k defektnímu skládání CFTR proteinu, což brání jeho transportu na povrch buněk, kde by měl fungovat jako chloridový kanál (Middleton 2019).

Mutace 2789+5G>A a 3659delC patří k méně častým variantám. První mutace ovlivňuje správné sestřihování mRNA, zatímco druhá způsobuje delecii a ztrátu funkce proteinu. Mutace G542X je nonsensová mutace, která vede k předčasnému ukončení translace a produkci nefunkčního proteinu. L000del je delecce tří nukleotidů, která ovlivňuje stabilitu a funkčnost proteinu. D1152H je mírnější mutace spojená s částečně zachovanou funkcí CFTR, což může vést k mírnějším symptomům. N1303K je missense mutace, která ovlivňuje ATPázovou doménu CFTR, což snižuje transportní aktivitu proteinu. Kombinace mutací, například G542X/E1104K nebo 2789+5G>A/3659delC, může vést k různé míře závažnosti onemocnění, v závislosti na tom, jak ovlivňují funkci CFTR proteinu (Fanen 2014).

7.3 Kontrola aktivity NF – kB skrze CFTR

CFTR protein funguje jako chloridový kanál, na který se váže ATP molekula. Kanál se podílí na tvorbě a udržování správného složení a množství tekutiny pokrývající různé slizniční membrány v těle. Mezi často se objevující projevy patří chronická plicní infekce, která vede k zánětlivé reakci v dýchacích cestách u CF, která přetrvává z důvodu přítomnosti bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a může vést až k selhání funkce plic. Bakteriální infekce s daným zánětem souvisí, neboť bakterie uvolňuje lipasu, který působí prostřednictvím receptorů podobných Toll (zkr. TLR, z angl. *Toll-like receptor*). To vede k aktivaci signalizace NFκB. Druhou možností je akumulace vápníku v endoplazmatickém retikulu, kde dochází ke stresu ER, čímž se indukuje aktivace NFκB (Wang 2016).

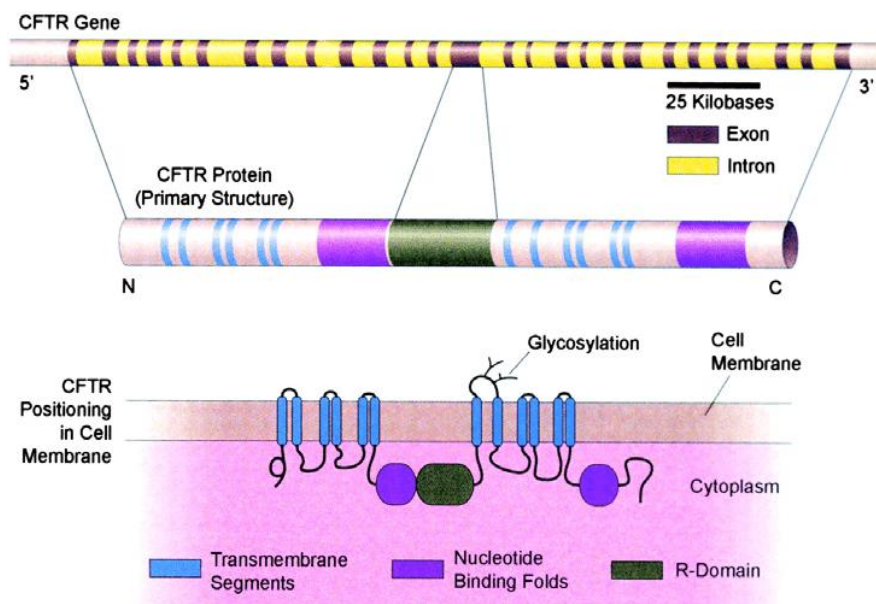
CFTR je součástí imunitních buněk, jako jsou neutrofilů, makrofágy a lymfocyty. Při absenci CFTR proteinu byly zaznamenány funkční změny. Pozoruje se souvislost mezi sníženou funkcí CFTR a sníženou schopností neutrofilů fagocytovat a zabít bakterie. Není-li přítomnost bakteriálních podmětů, epiteliální buňky dýchacích cest pacientů s CF uvolňují prozánětlivé cytokiny – IL-8. „Nicméně je všeobecně přijímáno, že pacienti s CF mají silnější zánětlivou odpověď na bakteriální infekci ve srovnání s pacienty bez CF s podobnými infekcemi (Wang 2016).“

Řada složek imunitního systému hraje roli u CF. Určitá varianta tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNFα), 238 G/Gvs. G/A, je spojena s vyšším přežitím pacientů s CF. Nižší hladiny TNFα mohou být protektivní. „TNFα aktivuje NF-κB vytvořením komplexu zahrnujícího TNFα, TNFR (z angl. *Tumor necrosis factor receptor*) a TRADD (z angl. *Tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein*).“ Funkční vazbu TNFα na receptor stimuluje transkripční faktor NF-κB, P65, což vede k uvolňování cytokinů IL-6 a IL-8 do dýchacích cest pacientů s CF. „Interakcí se svým ligandem vytváří receptor TNFα trimery, které způsobují disociaci inhibičního proteinu SODD (z angl. *Silencer of death domains*) od receptoru TNFα. To umožňuje adaptorovému proteinu TRADD navázat se na smrtící doménu receptoru.“ Po navázání TRADD se tvoří multiproteinový komplex, který způsobí fosforylaci inhibičního proteinu IκBα. Dochází k translokaci NF-κB do jádra, kde stimuluje transkripci cytokinů, jako je IL-8 (Wang 2016).

Digitoxin inhibuje signalizaci $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$ a hyperexpresi IL-8 v epiteliálních buňkách CF plic. Díky působení digitoxinu dochází k interakce mezi TNFR1 a TRADD. TRADD je součástí signální transdukční dráhy, která reguluje aktivitu NF - κB a je spojen s regulací CFTR a protizánětlivého působení. V přítomnosti nefunkčního CFTR v buňkách je účinek $\text{TNF}\alpha$ na aktivitu NF- κB větší. Knockdown TRADD snižuje aktivitu NF- κB a ruší schopnost $\text{TNF}\alpha$ zvyšovat aktivitu NF- κB . TRADD je v epiteliálních buňkách plic CF zvýšený. $\text{TNF}\alpha$ a navazující adaptorový protein TRADD přispívají k dysregulaci vnitřní prozánětlivé signalizace v epiteliálních buňkách CF plic (Wang 2016).

7.3.1 Z genu na protein

Gen CFTR pochází z dlouhého raménka 7 (7q31) (Obrázek 3). Jeho molekulová hmotnost je 250 kb, ale po transkripci má 6,1 kb. Pro transkripci využívá různá místa promotorů a lze regulovat pomocí genové exprese. Existují různě sestříhané formy CFTR. Protein je kódován 1480 aminokyselinami. Skládá se z transmembránové domény obsahující 6 šroubovic (zkr. TMD, z angl. *Transmembrane domain*), nukleotid vázající domény (zkr. NBD, z angl. *Nucleotide binding protein*) a hydrofilní regulační domény (zkr. R, z angl. *Regular domain*).

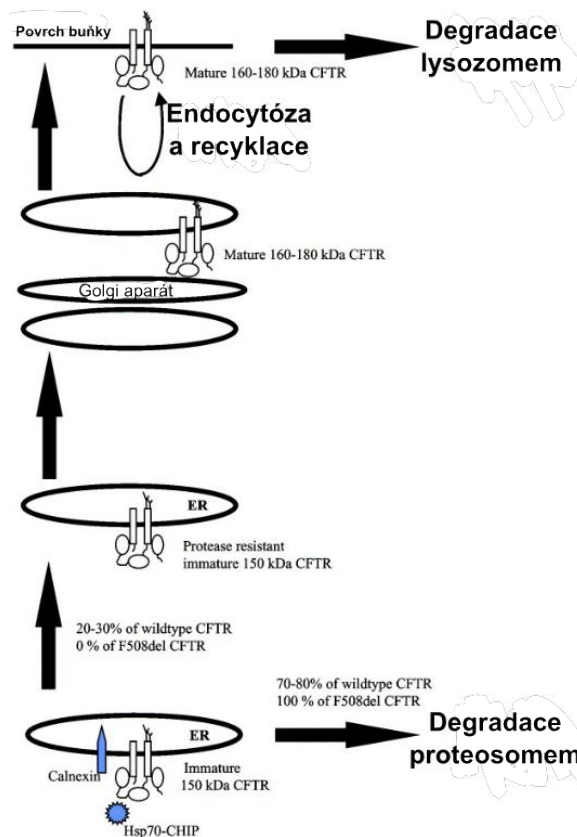


Obrázek č. 3 – Gen regulující transmembránovou vodivost při cystické fibróze (CFTR) a jím kódovaný polypeptid (Daele 2006)

Polypeptid je ko-translančně transportován skrz Sec 61 translocon a je integrován do membrány endoplazmatického retikula. Následně je N-glykosylován na čtvrté extracelulární smyčce. Pomocí chaperonů, calnexin a Hsp70, je protein správně složen. Stává se odolným vůči proteázám a transportuje se do Golgiho aparátu, kde jsou modifikovány glykosilační skupiny. Vzniklá forma se transportuje do buněčných membrán, kde prochází endocytózou přes

vezikuly. C – konec obsahuje tyrosinový internalizační signál, který reguluje endocytózu. Proces je regulován pomocí cAMP, jehož zvýšení vede ke zvýšení proteinu CFTR.

Pouze 25 % produktů je odolných vůči proteázám a je transportováno do Golgiho aparátu. Ostatní produkty podléhají degradaci ubikvitinací pomocí proteosomu v cytoplazmě (Obrázek 4) (Vankeerberghen 2002).



Obrázek č. 4 - **Proces translace/ transkripce a degradace** (Vankeerberghen 2002)

7.3.2 Komponenty transmembránového regulátoru

1. Regulační doména

C – konec regulační domény obsahuje fosforylační místa PKA, PKC, PKG. Stimulace CFTR kanálu je aktivována pomocí PKA místa prostřednictvím cAMP. Dráha PKG je stimulována cGMP a vede k aktivaci CFTR ve střevním epitelu a pankreatu. Dráha PKC je aktivována pomocí PKA.

Konformační změna zvyšuje afinitu NBD1 k ATP. Aminokyseliny 760-783 jsou potřebné k vytvoření uzavřeného chloridového kanálu v nefosforylovaném stavu. Oblasti 817-838 obsahují nabitě zbytky, které jsou nutné ke stimulaci. Nukleotid vázající doména a doména R vzájemně komunikují.

2. Nukletid vázající domény

Obě domény obsahují motivy důležité pro vazbu a hydrolyzu ATP: Walkerův motiv A (GXXGXGKT/S), Walkerův motiv B (R/KX7-8h4D) a linkerovou oblast (LSGGQ) (kde *X* označuje libovolnou aminokyselinu a *h* hydrofobní zbytek). Hydrolyzou ATP na NBD1 dochází k aktivaci kanálu, avšak následnou hydrolyzou ATP na NBD2 se aktivita kanálu ukončí.

3. Transmembránové domény

Transmembránové domény jsou tvořeny šroubovicemi, které vytváří póry. Transmembránové šroubovice TMD1 a TMD2 spolu interagují (Vankeerberghen 2002).

7.4 Faktory uplatňující se v patogenezi

7.4.1 Esenciální mastné kyseliny a jejich deriváty

Biologické účinky mastných kyselin závisí na hladinách MK a na poměru n-3 a n-6 mastných kyselin (Castellani a Assael 2017). Sleduje se souvislost mezi mutací genu CFTR a poruchami v metabolismu esenciálních mastných kyselin. Mezi poruchy náleží zvýšené uvolňování kyseliny arachidonové z fosfolipidů buněčných membrán a nízký stav kyseliny linolové a dokosaheptaenové. Důvodem může být porucha anexinů a ceramidů, které mají dopad na zánět a uvolňování kyseliny arachidonové.

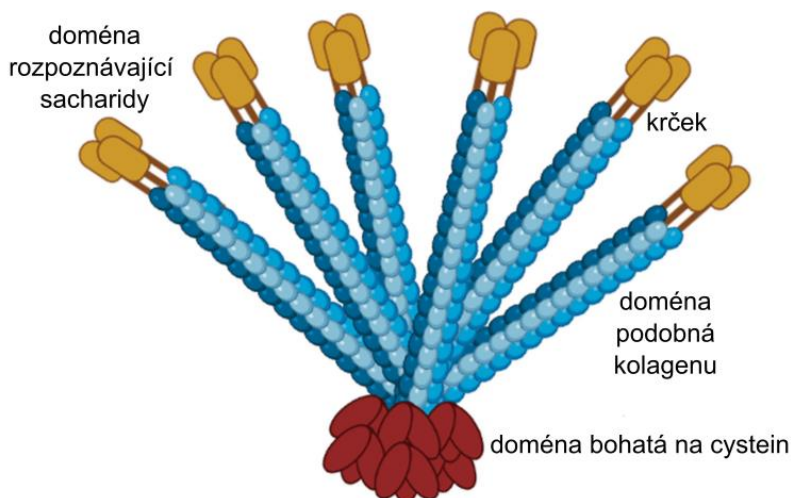
U pacientů s CF pozorujeme změněné hladiny mastných kyselin v plazmě, a to nedostatkem esenciálních mastných kyselin, projevující se snížením plazmatických hladin kyselin linolové a dokosaheptaenové s kompenzačním zvýšením hladin kyseliny eikosatrienové (Freedman Steven D. 2004, Strandvik 2001, Strandvik 2010).

7.4.2 Manózu vázající lektin

Manózu vázající lektin (zkr. MBL, z angl. *Mannose-binding lectin*) je plazmatický lektin, který je důležitou součástí vrozené imunity. Je součástí rodiny proteinů kolektilinů. Struktura obsahuje doménu bohatou na cystein, trojitou šroubovici připomínající kolagen, oblast krčku a doménu rozpoznávající sacharidy, jehož vazbou může být inhibován. Mezi časté sacharidy patří fukóza, glukóza, N-acetylglukosamin nebo manóza, která je typická pro mikrobiální povrchy. MBL může vázat bakterie a neutralizovat je či opsonizovat aktivací komplementu. „Nativní molekula je oligomer, který se skládá ze šesti identických podjednotek, z nichž každá je tvořena třemi polypeptidovými řetězci (Obrázek 5) (Monsigny 2007).

Jednotliví lidé se od sebe liší koncentrací MBL. Nízká koncentrace MBL vede k častějším infekcím, zejména v kombinaci se sekundárním imunodeficitem. Jedná se u rizikový faktor i kojenců a u osob podstupující chemoterapii či imunosupresi po transplantaci. Má významný vliv na revmatoidní artritidu a cystickou fibrózu (Kilpatrick 2002, Turner 2003). Purifikovaný lektin lze podávat chronicky nemocným pacientům a zároveň je účinný jako léčebný prostředek u pacientů s CF (Garred 2002).

MBL se v dýchacích cestách vyskytuje výrazněji při závažnějším zánětu, který je vyvolán bakterií *Burkholderia cepacia*. Dochází k navázání na tuto bakterii a probíhá zahájení aktivace komplementu. Důsledkem je přímé zničení mikroba či jeho fagocytóza (Davies 2004).



Obrázek č. 5 – Struktura hexameru proteinu manózu vázajícího lektinu (Idowu 2021)

7.4.3 Alfa₁ – antitrypsin

Alfa₁ – antitrypsin jako inhibitor serinových proteináz, chrání plicе před proteolytickým napadením. Je to protein řadící se do nadrodiny serpinů. Gen kódující alfa₁ – antitrypsin leží na dlouhém raménku lidského chromozomu 14 (14q32.1). Bodovou mutací v genu pro alfa₁ – antitrypsin vede k jeho nedostatku v plazmě, čímž dochází k chronické obstrukční plicní nemoci. Alfa₁ – antitrypsin je produkován hepatocyty, monocyty, makrofágy, plicními alveolárními buňkami a střevním epitelem. Jedná se o glykoprotein skládající se ze tří postranních sacharidových řetězců. S molekulovou hmotností 52 kDa je tvořen z devíti alfa-šroubovic, tří beta-listů a smyčky reaktivního centra (Obrázek 6). Toto reaktivní centrum vytváří s proteinázou kovalentní vazbu a následně se zasouvá do středu beta-listu, čímž vzniká neaktivní proteináza (Mackiewicz 1993, Karatas a Bouchecareilh 2020).

„Cystická fibróza je charakterizována nadbytkem volných proteináz, které ničí plicní tkáň.“ Avšak bylo zjištěno, že nedostatek alfa₁ – antitrypsinu je u pacientů s CF spojen s méně závažným plicním onemocněním (Mahadeva 2001).



Obrázek č. 6 – **Struktura proteinu alfa1 – antitrypsinu** pocházející z *homo sapiens* (Patschull 2011)

7.4.4 Tumor nekrotizující faktor alfa

Tumor nekrotizující faktor alfa je součástí rodiny cytokinů a má různé pleiotropní účinky na různé typy buněk. Je popsán jako hlavní regulátor zánětlivých reakcí, který se podílí na patogenezi některých zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Na počátku je produkován s 233 aminokyselinami jako dlouhý transmembránový protein, který se formuje do homotrimerů. Skládá se ze dvou antiparalelních beta – vrstev s antiparalelními beta – řetězci (Obrázek 7). Je produkován aktivovanými makrofágy, T-lymfocyty a přirozenými zabíječskými buňkami (Jang 2021, Steen 2011).

Zvýšená koncentrace tumor nekrotizujícího faktoru představuje znak zánětlivé reakce na chronickou infekci bakterií *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s CF. Může být faktorem, který vede k progresivní destrukci plic (Norman 1991).

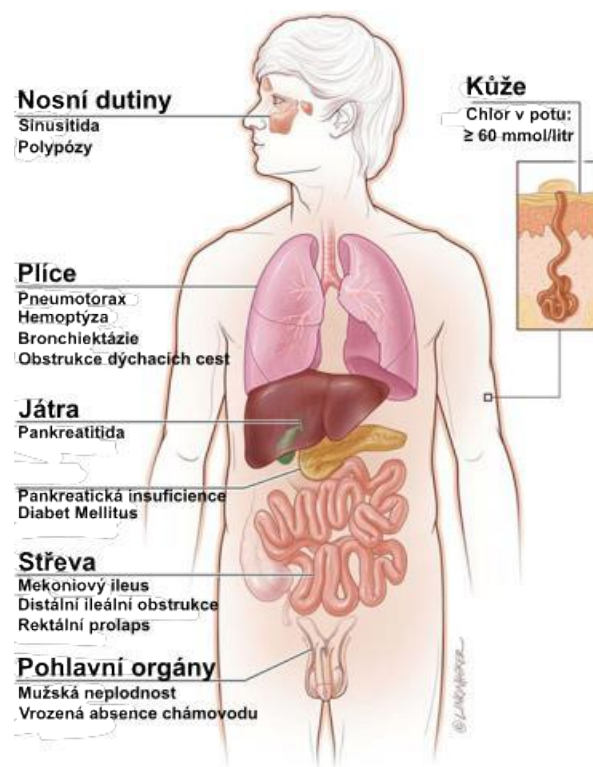
Nadměrná produkce tumor nekrotizujícího faktoru je vyvažována syntézou protizánětlivého cytokininu IL-10, který snižuje produkci mnoha aktivačních a regulačních mediátorů. Klidový stav imunitního systému je vykreslován převahou TNF, zatímco poruchy imunitního systému se vyznačují převýšením IL-10 (Shmarina 2001).



Obrázek č. 7 – **Struktura tumor nekrotizujícího faktoru alfa** pocházející z *Homo sapiens* (Reed 1997)

7.5 Klinické projevy

Průběh onemocnění se u pacientů s cystickou fibrózou liší a může začít několik měsíců po narození či desítky let po narození. Pacienti vykazují mírné či atypické příznaky. Klinické projevy u pacientů s CF zahrnují opakované sinusové a plicní infekce, průjemy a malnutrice (obrázek 8). Porucha chloridového kanálu vede k tvorbě hlenu v plicích, slinivce břišní, játrech, střevech, reprodukčním traktu a dochází ke zvýšení obsahu soli v sekretech potních žláz. Onemocnění plic patří mezi hlavní příčinu onemocnění CF (Chen 2021, Dickinson a Collaco 2021).



Obrázek č 8. – Klinické projevy cystické fibrózy (Dickinson a Collaco 2021)

7.5.1 Respirační onemocnění

Typickým respiračním projevem je produktivní kašel, hyperinflace plicních polí viditelné na rentgenovém snímku hrudníku a plicní funkční testy, které odpovídají obstrukčnímu onemocnění dýchacích cest. Často se objevují infekce s hromaděním zánětlivých buněk, které uvolňují svůj obsah a poškozují stěny průdušek, což vede k bronchiektáziím. Dýchací cesty jsou často osidlovány bakteriemi, které se podílejí na vzniku zánětu. Tento zánět může vést k bronchitidě či zápalu plic. Součástí vyskytujících se bakterií je *Pseudomonas aeruginosa*, *Stafylokokus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidas*, *Burkholderia cepacia*, dále mykobakterie zejména *Mycobacterium avium complex* a *Mycobacterium abscessus* a vláknité houby *Aspergillus fumigatus* (Katkin 2023).

7.5.1.1 Onemocnění vedlejších nosních dutin

Defektní protein CFTR se nachází v epitelu vedlejších nosních dutin, proto je onemocnění vedlejších nosních dutin u pacientů s CF běžné. Mezi nejčastější projevy patří chronické ucívání nosu, bolesti hlavy, chronická postnazální kapénka a porucha spánku. Infekce vedlejších nosních dutin může vést k exacerbaci vedlejších dýchacích cest (Katkin 2023, Dickinson a Collaco 2021).

7.5.1.2 Plicní exacerbace

Plicní exacerbace neboli epizodické akutní zhoršení příznaků je charakterizované zesílenými respiračními příznaky, zahrnující kašel, produkci hlenu, pokles plicních funkcí, dále

únnavou, sníženou chutí k jídlu a úbytkem hmotnosti. K léčbě se využívají antibiotika, která se starají o čistotu dýchacích cest vůči hlenu (Dickinson a Collaco 2021).

7.5.1.3 Polypózy

Nosní polypózy jsou způsobeny chronickou rinosinuitidou. Výskyt je variabilnější a vyskytuje se u pacientů z 10 až 32 %. „Klinické projevy nosních/sinusových polypů sahají od asymptomatického nálezu při fyzikálním vyšetření až po mírné nebo závažné příznaky zahrnující rinoreu, ucpaní nosu, nosní obstrukci, postnazální kapání, chrápání, obstrukční spánkovou apnoe, hyponazální řeč, epistaxi, hyposmii/anosmii, ageusii, bolest obličeje nebo hlavy, bolest nad horními zuby, pocit tlaku nad čelem a obličejem, dvojité vidění a rozšíření nosní pyramidy.“ K odstraňování hlenu se využívají výplachy nosu fyziologickým roztokem, ke snížení zánětu nosní steroidy. Při opakujících se problémech je možné využít chirurgickou léčbu (Katkin 2023, Dickinson a Collaco 2021).

7.5.1.4 Bronchiektázie

Bronchiektázie je chronické onemocnění s abnormálním rozšířením dýchacích cest. To má za následky těžší pohyb vzduchu do plic a z plic a tím odstraňování hlenu z průdušek.

7.5.1.5 Atelektázy

Atelektázy přísluší mezi časté komplikace CF a vyskytuje se přibližně u 4-11 % pacientů. Dochází k poškození horního laloku v důsledku ucpaní hlenem. K odstranění komplikací dochází díky odstranění impaktovaného sputa (Ng 2014).

7.5.1.6 Pneumotorax

Pneumotorax je stav, kdy vysoký alveolární tlak vytlačuje vzduch do intersticiálního prostoru s nižším tlakem, který uniká do pleurálního prostoru. Často dochází ke zhroucení části nebo celé plic. Pacienti pociťují náhlou bolest na hrudi a dušnost. Prevalence výskytu je u jedinců s CF 3,4 %. Diagnostickým vyšetřením je rentgenové vyšetření hrudníku, u těžkého plicního onemocnění je potřeba využít počítačovou tomografii. U lehkého pneumotoraxu se léčí aspirací jehlou u těžších se vyžaduje zavedení hrudní sondy s následnou hospitalizací (Chalmers 2021, Dickinson a Collaco 2021).

7.5.1.7 Respirační selhání

Cystickou fibrózou se může plicní tkáň natolik poškodit, že funkce plic se postupně zhoršuje až nakonec může dojít k ohrožení života (Chalmers 2021).

7.5.1.8 Hemoptýza

Vykašlávání krve je často následkem poškození dýchacích cest a vzniklé infekce. Mnohdy se jedná o malé množství krve, které však může být na životě ohrožující (Chalmers 2021). U 3 % pacientů s CF se hemoptýza vyskytuje. Často přispívá nedostatek vitamínu K v důsledku malabsorbce nebo jaterního onemocnění. K léčbě středně těžké hemoptýzy lze využít

antibiotika, u masivní hemoptýzy je potřeba zahrnout vhodnou stabilizaci a opatření k uvolnění dýchacích cest (Dickinson a Collaco 2021).

7.5.2 Onemocnění gastrointestinálního traktu

7.5.2.1 Pankreatická insuficience

Insuficiencí exokrinní slinivky jsou postiženy přibližně dvě třetiny pacientů trpící cystickou fibrózou, s tím že 20 až 25 % se vyvine během několika prvních let života. Řada z nich vykazuje malabsorpci tuků do jednoho roka života. Onemocnění slinivky má tendenci progrese. V dospělosti se může objevovat pankreatická insuficience. Mezi příznaky patří steatorea, která se projevuje objemnou, zapáchající a někdy i mastnou stolicí a nízkým nárůstem hmotnosti, kvůli malabsorpci tuků a bílkovin. Další příznaky mohou být způsobené nedostatkem rozpustných vitamínů v tucích, např. nedostatek vitamínu K se může projevovat v koagulopatii a nedostatek vitamínu D křivící. Jedinci, kteří si zachovávají dostatečnou funkci pankreatu po celé dětství, jsou ohroženi pankreatitidou. Pokud se u kojenců neléčí pankreatická insuficience, mohou se vyskytnout otoky, hypoproteinémie, ztráta elektrolytů a anémie v důsledku malabsorpce makro – a mikronutrientů. 10 až 20 % novorozenců trpí mekoniovým ileem, který se projevuje obstrukcí střeva mekoniem (Chen 2021, Katkin 2023).

7.5.2.2 Mekoniový ileus a distální ileální obstrukce

U novorozenců s mekoniovým ileusem dochází k obstrukci střeva mekoniem. Tímto problémem trpí přibližně 10 až 20 % novorozenců s CF a u nedonošených dětí je výskyt mekoniového ilea i vyšší než u novorozenců bez CF.

Distální střevní obstrukční syndrom se vyskytuje u dětí i u dospělých. Objevuje se částečná nebo úplná obstrukce tenkého střeva v důsledku impakce viskózní stolice v distálním střevě. U pacientů s těžkými genotypy CFTR se vyskytují bolesti břicha, pokročilá plicní onemocnění, někdy i pankreatická insuficience. Rizikovými faktory mohou být – dehydratace, změny stravy, suboptimální vstřebávání tuků, přemnožení bakterií či zácpa. Pokud se onemocnění rozezná včas lze onemocnění zvládnout medikamentózně. Při závažnějším stavu je nutný chirurgický zákrok, který však může být komplikován recidivujícími symptomy způsobenými adhezemi. K diagnóze postačí rentgenové vyšetření břicha, anamnéza nebo fyzikální vyšetření. K léčbě lehčího průběhu lze využít rehydrataci a osmotickou projímavou terapii. Pro závažné případy se vyžaduje hospitalizace, intravenózní podání tekutin, úplný střevní klid a použití velkých objemů polyetylglykolu. Úplná obstrukce střev vyžaduje klystýr s megluminem diatrizoátu sodného (Gastrografin) a retrográdním výplachem a vizualizací terminálního ilea zkušeným radiologem (Katkin 2023, Dickinson a Collaco 2021).

7.5.2.3 Diabetes

Poškozením slinivky břišní hustým sekretem, který vzniká v důsledku obstrukčního syndromu vede u pacientů s CF k diabetu mellitu. Exokrinní pankreatickou insuficiencí dochází

k dysfunkci endokrinního pankreatu, což vede k intoleranci glukózy a diabetu. Vyskytuje se u 20 % dospívajících a u 50 % dospělých jedinců s CF. Často se objevuje fokální biliární cirhóza způsobená žlučí, která může způsobit zvýšenou hladinu alkalické fosfatázy v séru a lobulární hepatomegalii. Méně typické jsou pak periportální fibróza, cirhóza, symptomatická portální hypertenze a krvácení z varixů, které jsou spojeny s progresivním onemocněním jater. Screening se provádí prostřednictvím 2hodinového orálního glukózového tolerančního testu. Léčba zahrnuje kontrolu glykémie pomocí inzulínové terapie (Chen 2021, Dickinson a Collaco 2021).

7.5.2.4 Pankreatitida

Přibližně 10 % pacientů s CF trpí pankreatitidou. Jedná se o progresivní poškození pankreatu vlivem defektní duktulární a acinární pankreatické sekrece (Katkin 2023).

7.5.3 Pohlavní orgány

Více než 95 % mužů s CF je neplodných kvůli poruchám transportu spermií, ačkoli spermatogeneze není ovlivněna. Mužům často chybí chámovody, které jsou odrazem kritické role CFTR v organogenezi. Mikrochirurgická aspirace spermií z nadvarlete a intracytoplazmatická injekce spermií mohou postiženým mužům umožnit stát se biologickými otci. Ženy trpící CF jsou méně plodné než zdravé ženy, a to z důvodu podvýživy a produkce abnormálně houževnatého cervikálního hlenu. Ženy trpící CF přesto mohou otěhotnět. Hodnota FEV1 (forced expiratory volume in one second) musí překonat 50 až 60 % predikované hodnoty, pakliže mluvíme o příznivém stavu mezi matkou a plodem (Chen 2021).

7.5.4 Kardiovaskulární potíže

7.5.4.1 Recidivující žilní trombóza

Je pozorována souvislost mezi pacienty s CF a recidivující žilní trombózou. Z počtu 120 dětí a mladých dospělých majících akutní žilní tromboembolii se rekurentní trombóza vyskytla u 19 z nich. Šest z nich mělo CF a 5 z 6 bylo infikováno bakterií *Burkholderia*. Rizikovým faktorem se nejen stává CF, ale i potřeba centrálního žilního katétru (Chen 2021).

7.5.4.2 Anémie

Důvodem vzniku anémie je: nedostatek železa způsobený dysregulací metabolismu železa, anémie chronického zánětu, způsobená chronickým a akutním plicním onemocněním, ztráta krve v důsledku hemoptýzy nebo jícnovým či žaludečním varixem a v neposlední řadě selhání ledvin nebo útlum kostní dřeně u pacientů po transplantaci. Přibližně 10 % dětí s CF jsou ohroženi anémií a s rostoucím věkem a klesající plicní funkcí se objevuje častěji (Katkin 2023).

7.5.5 Onemocnění jater a žlučových cest

Přibližně 3 % pacientů s CF podléhá skrze onemocnění jater. Často se objevuje fokální biliární cirhóza způsobená žlučí, která může způsobit zvýšenou hladinu alkalické fosfatázy v séru a lobulární hepatomegalii. Méně typické jsou pak periportální fibróza, cirhóza, symptomatická portální hypertenze a krvácení z varixů, které jsou spojeny s progresivním onemocněním jater. Cholelitiáza, která vzniká důsledkem nadměrných ztrát žlučových kyselin stolicí s následnou produkcí litogenní žluči, je hlášena u 12 % pacientů. Projevuje se problémy v pravém horním kvadrantu nebo v epigastriu, nevolností či zvracením. Žlučové kameny jsou transportovány do žlučovodů, kde ho ucpávají. U screeningu jsou pozorovány zvýšené hodnoty sérového bilirubinu, alkalické fosfatázy a aminotransferáz a je využito ultrazvukové vyšetření a/nebo vyšetření gastroenterologem (Dickinson a Collaco 202, Chen 2021).

7.5.6 Renální potíže

Rektální prolaps se dříve vyskytoval až u 20 % dospělých jedinců a u dětí se vyskytoval vzácněji. Díky častější diagnostice a suboptimální léčbě pankreatickou enzymoterapií došlo ke zlepšení tohoto onemocnění.

7.5.6.1 Nefrolitiáza a nefrokalcinóza

Tato onemocnění se často objevují u pacientů s CF. Důvodem může být v prvním případě enterální hyperoxalurie, a to v důsledku malabsorpce tuků v důsledku snížené sekrece pankreatických enzymů. V druhém případě hypocitriurie, v důsledku chronické metabolické acidózy (Katkin 2023).

7.5.7 Štítná žláza u pacientů s CF

V epitelu štítné žlázy byl nalezen defektní protein CFTR. Porucha štítné žlázy se vyskytuje u pacientů s cystickou fibrózou zřídka. V 70. letech byl hlášen rozvoj strumy a hypotyreózy u pacientů s CF. Příčina se přisuzovala nadbytku jódu nebo nedostatku seleničitanu (Lee 2016, Volta 2005).

7.5.8 Nervový systém

7.5.8.1 Výživa a růst

U 2 až 9 % pacientů s CF se projevuje artropatie, která se projevuje krátkými epizodami bolesti a otoky kloubů. Pacienti s CF mají sníženou hustotu kostní hmoty z důvodu sníženého obsahu kostních minerálů a malabsorbci vitamínů rozpustných v tucích, jako je vitamin D a K, což vede ke zvýšenému výskytu zlomenin a kyfoskolióz. Prevence zahrnuje rovnováhu ve stravě a cvičení s vlastní vahou. Pro rizikové pacienty se využívá screening duální rentgenové absorpciometrie. Běžně jsou pozorovány paličkovité prsty na ruce, které se vyskytují u pacientů s dlouhotrvajícím CF onemocněním, zatímco hypertrofická osteoartropatie je

pozorována jen zřídka. Je to syndrom, který je charakterizován abnormální proliferací kůže a kostní tkáně v distálních částech končetin (Dickinson a Collaco 2021, Chen 2021).

7.5.8.2 Deprese

Život s chronickým onemocněním není jednoduchý, a proto se jedinci s CF uchylují k depresím. Přibližně 15 % pacientů trpí úzkostnou poruchou nebo depresí, a 41 % jedinců s CF uvádí obě tyto poruchy. 12leté děti s cystickou fibrózou podstupují screening na deprese a úzkosti pomocí dotazníku PHQ-9, respektive GAD-7. Včasná léčba pomáhá udržovat celkové zdraví a kvalitu života (Dickinson a Collaco 2021).

7.5.8.3 Akvagenní vrásnění

Akvagenní vrásnění dlaní se projevuje papuly, edémem, pruritusem a bolestí. Objevují se po několika minutách ponoření do vody.

7.6 Diagnóza cystické fibrózy

7.6.1 Kritéria

Pro správnou diagnózu musí být splněny obě kritéria:

- 1) Klinické příznaky odpovídající CF alespoň v jednom orgánovém systému nebo pozitivní výsledek novorozeneckého screeningu CF nebo sourozence s CF
- 2) Důkaz dysfunkce regulátoru transmembránového vedení cystické fibrózy: Zvýšená hladina chloridů v potu ≥ 60 mmol/l nebo přítomnost dvou mutací v genu CFTR způsobujících onemocnění (jedna z každé rodičovské alely) nebo abnormální výsledek rozdílu nosního potenciálu (NPD) (Chen 2021).

7.6.2 Laboratorní vyšetření

Mezi nejčastější vyšetření o prokázání dysfunkce CFTR náleží vyšetření chloridů v potu, molekulární vyšetření mutací genu CFTR nebo měření NPD.

7.6.2.1 Chloridový test

Chloridový test je měřen z potu a patří mezi první a nejdůležitější měření. Odběry se provádí pomocí pilokarpinové iontoforézy a chemického stanovení koncentrace chloridů. Pilokarpin se nanese na kůži, čímž se začne tvořit pot. Na kůži se položí malý sběrný systém, který se zakryje plastovou folií. Dochází ke sběru potu, ve dvou exemplářích pro zajištění kvality. Test probíhá přibližně hodinu. Interpretovaná data můžeme rozdělit to těchto skupin:

1) Normální

Hodnota chloridu v potu je ≤ 29 mmol/l. Tento výsledek je dostatečný k vyloučení pacientů bez CF. Přibližně 1 % pacientů s CF se silnými příznaky musí podstoupit opakované vyšetření chloridu v potu nebo mutaci v DNA. V případě novorozenců, u nichž se vyskytují dvě mutace genu CFTR, je potřeba provést sekvenování CFTR genů v DNA obou rodičů, neboť koncentrace chloridu v potu bývá normální.

2) Střední

Střední hodnota chloridu v potu je 30 až 59 mmol/l. Tento výsledek uvažuje o možnosti CF a vyzývá k dalšímu vyhodnocení opakovaním testu a sekvenováním CFTR. U asymptomatických kojenců by měl být test na chloridy opakován ve věku jednoho až dvou měsíců a následně v intervalu 6 až 12 měsíců, dokud není diagnóza jasná. U symptomatických kojenců by měl být testován do prvních dvou týdnů.

3) Abnormální

Abnormální hodnota v potu je ≥ 60 mmol/l. Pokus se provádí dvakrát, v případě potvrzení této hodnoty, je pacient uznán jako pacient s CF (Chen 2021).

Testování by měli podstoupit tito pacienti:

- Kojenci s pozitivním výsledkem novorozeneckého screeningu CF (provést po dvou týdnech věku a >2 kg, pokud jsou asymptomatictí).
- Kojenci s příznaky naznačujícími CF (např. mekoniový ileus).
- Starší děti a dospělí s příznaky naznačujícími CF (např. mužská neplodnost, chronické respirační infekce nebo chronický zánět vedlejších nosních dutin) (Chen 2021)

7.6.2.2 Molekulární diagnostika

Molekulární diagnostika je součástí standartního vyšetření novorozeneckého screeningu. Při zjištění dvou mutací způsobující CF je po pozitivním potním testu diagnóza CF potvrzena. Pokud však není zjištěna mutace, je třeba potní testy opakovat.

Genetický screening se provádí v rámci 23 nejčastějších mutací s využitím panelů. Některé panely mohou být méně citlivé u některých etnických skupin. Panel americké akademie lékařské genetiky identifikuje přibližně 97 % mutací (Chen 2021).

7.6.2.3 Měření NPD

Měření NPD se provádí u pacientů s neprůkaznými výsledky testování chloridů v potu. Slouží jako jednoznačná diagnóza, jsou-li u pacientů klinické příznaky. Měření se provádí pomocí elektrod, které jsou umístěny do nosní dutiny. Měří se napětí v bazálním stavu, po nosní perfuzi amiloridem, který blokuje transport sodíku. Izoproterenol stimuluje transport chloridů závislý na CFTR. „Pacienti s dysfunkcí CFTR mají velký rozdíl potenciálů v bazálním stavu,

větší pokles než kontroly po amiloridu a minimální odpověď na perfuzi s nízkým obsahem chloridu a izoproterenolu“ (Chen 2021).

7.7 Komplexní léčba

Je důležité stanovit diagnózu a zahájit léčbu dříve, než se objeví závažné komplikace. V případě výskytu zánětů dýchacích cest, je již pozdě. V komplexní léčbě cystické fibrózy jsou zahrnuty – péče o dobrou průchodnost dýchacích cest inhalacemi a následnou fyzioterapií (dechová fyzioterapie a pohybové aktivity), péče o dobrý stav výživy, tj. vysokokalorická strava a užívání trávicích enzymů v kapslích, potlačení infekce a zánětu agresivní protizánětlivou antibiotickou léčbou a léčba komplikací (Skalická 2014).

7.7.1 Péče o dobrou průchodnost dýchacích cest: inhalace a následná fyzioterapie

Cílem dechové fyzioterapie je vyčistit dýchací cesty od naředěného hlenu. „Po inhalaci roztoku amiloridu nebo hypertonické soli následuje dechová fyzioterapie bezprostředně, po inhalaci rhDNAzy se doporučuje důkladné cvičení za 1–2 hodiny, po které DNAza zapůsobí. Pokud je indikována inhalace antibiotika (tobra – mycinu nebo colistinu), provádí se až na závěr, do odhleněných dýchacích cest.“

Léčba inhalací se provádí jednou za 3 dny 10-15 minut speciálním inhalátorem, který tvoří částice do 5 mikrol. Jeden z přípravných roztoků amilorid rozpuštěný ve fyziologickém roztoku, pomáhá s narušenou funkcí chloridového kanálu. Dalším roztokem může být hypertonický 3-7% roztok NaCl, který ředí sputum a zároveň má baktericidní účinky. Amilorid nemá žádné vedlejší účinky, na rozdíl od roztoku NaCl, který může vyvolat bronchospasmus, a proto je potřeba použít před jeho použitím inhalační beta-2- mimetikum. V přítomnosti hnisavého sputa je účinná rekombinantní lidská DNAasa. Ta štěpí uvolněnou DNA z rozpadlých polymorfonukleárů a tím zkapalňuje hlen. Antibiotika tobramycin se využívá při kolonizaci dýchacích cest bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (Skalická 2014).

7.7.2 Péče o dobrý stav výživy

Důležitým poznatkem je, že při podávání výživné stravy pacientovi, se lépe udrží i dobrá funkce plic. „Nemocní CF s insuficiencí zevně sekretobrické funkce pankreatu musí užívat před každým jídlem substituci pankreatických enzymů ve formě acidorezistentních minimikropelet v želatinových kapslích v dávce 10 000 j. lipázy/ kg/den.“ Strava bývá u pacientů vysokokalorická, neboť musíme počítat s nedostatečnou resorbí a zvýšeným výdajem energie při práci dýchacích svalů a expektoraci (Skalická 2014).

7.7.3 Agresivní antibiotika a protizánětlivá léčba

Léčba antibiotiky se nasazuje při prvních známkách infekce. Při akutních případech se podávají antibiotika širokospektrá, s protistafylokokovým účinkem.

Při napadení plic bakterií *Pseudomonas aeruginosa* je nutná cílená antibiotická léčba. V prvních týdnech léčby se podává ve vysokých dávkách perorální ciprofloxacin 30 mg/kg/den, na 3 týdny v kombinaci s inhalací tobramycinu ve 28denních cyklech nebo každodenního kolistinu, po 3 měsíce. V případě nepřekonání infekce se podává léčba intravenózně, nejčastěji betalaktamy v kombinaci s aminoglykosidy. Léčba obvykle trvá 14 dní, v cyklech opakujících se každé 3 měsíce. Pokud se jedná o infekci vyvolanou bakterií *Burkholderia cepacia*, je potřeba podávat trojkombinace antibiotik, neboť je téměř na antibiotika rezistentní.

Často se vyskytují i infekce mykotické – *Candida spp.* a *Aspergillus fumigatus*. V těchto případech je potřeba zahájit léčbu antimykotiky od flukonazolu přes itrakonazol až po vorikonazol. Důležitá je i léčba protizánětlivá s využitím azitromycinu či vysoké dávky ibuprofenu (Skalická 2014).

7.7.4 Léčba komplikací spojených s CF

Mezi nejčastější komplikace spojené s CF patří cirhóza jater, diabetes mellitus, osteoporóza a další. „Důsledkem postižení pankreatu je nedostatečné uvolňování inzulínu a postupný rozvoj porušené glukózoové tolerance.“ Cukrovka spojená s CF se projevuje vyšší morbiditou a mortalitou, což se projevuje horším stavem výživy a těžším postižením plic. Při léčbě diabetu se neomezuje dieta, neboť pacienti s tímto typem cukrovky, musí stále dodržovat vysokokalorické stravování. Důležitá je léčba inzulinem (Skalická 2014).

Při poškození jater, je potřeba zahájit léčbu podáváním ursodeoxycholové kyseliny ke zlepšení cholerázy.

U pacientů, u kterých se objevuje osteoporóza je potřeba pravidelná substituce vitamínu D, v některých případech i substituce kalcia a ve výjimečných případech i podávání bisfosfonátů.

Nastane-li propad zdravotního stavu pacienta, je potřeba hospitalizace, podávat vysoké dávky ATB do žíly, případně využít kyslíkovou léčbu. Při úplném zhoršení stavu je potřeba podstoupit transplantaci plic, která je jedinou léčebnou možností v konečném stádiu progredujícího plicního onemocnění. Rizikem se stává kolonizace plic *Burkholderia cenocepacia*, která představuje značný problém a komplikace, proto se v tomto případě transplantace nekoná (Skalická 2014).

7.7.5 Psychosociální podpora

O pomoc dětem i dospělým s CF se stará občanské sdružení – Klub nemocných cystickou fibrózou. Zajišťují především, sociální služby, psychologickou i materiální a finanční podporu,

informují laickou i odbornou veřejnost o tomto onemocnění. Je součástí České asociace vzácných onemocnění (Skalická 2014).

7.8 Terapie CFTR modulátory

CFTR protein má funkci chloridového kanálu a jeho mutací způsobuje poruchu transportu iontů. Následkem je zvýšení viskozity hlenu. Klinický obraz u pacientů s CF ukazuje na plicní onemocnění, dysfunkce horních cest dýchacích, exokrinní pankreatická insuficience a také poruchy gastrointestinálního a reprodukčního systému. „V horních dýchacích cestách vede snížená mukociliární clearance a hyperviskozní hlen k retenci hlenu a chronickému zánětu, který způsobuje chronickou rinosinuitidu“ (Bode 2023).

Díky vysokoúčinné farmakologické léčbě modulátory CFTR, je léčba pacientů s CF stále dostupnější. Jedná se o perorální léky, které byly objeveny skrze vysoce výkonné screeningové kampaně s použitím buněčných modelů transportu chloridů. První klinicky dostupným modulátorem byl ivacaftor, který byl využit k potenciaci aktivity CFTR u CFTR gating mutací (G551D), následně u dalších CFTR mutací se zachovalou povrchovou expresí. Samotný ivacaftor je vhodný jen pro malou část pacientů. „Avšak nejčastější mutace CFTR, F508del, vyžadovala jak korektor ke zvýšení exprese CFTR na buněčném povrchu, tak CFTR potenciátor ke zvýšení aktivity zachráněného kanálu.“ Přípravky s dvojitým účinkem ((lumacaftor/ivacaftor a tezacaftor/ivacaftor) vykazují krátkodobější účinek, což je pravděpodobně způsobeno částečnou korekcí špatně složeného proteinu. Proto byly vyvinuty trojitě sloučeniny obsahující dva různé korektory (elexacaftor a tezacaftor), které se zaměřují na různé oblasti chybně složeného proteinu. Tyto modulátory jsou momentálně těžko použitelné u mladších dětí a lidí s velmi vzácnou mutací. V těchto případech jsou léčebné postupy založené na genech nebo mRNA (Dave 2021, Nichols 2021).

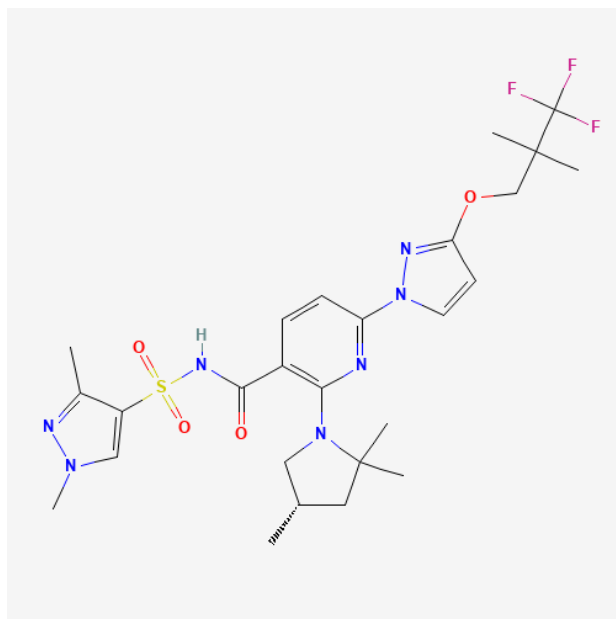
V terapii rozlišujeme pojmy korektor a potenciátor. „Korektor zlepšuje zpracování mutantního CFTR a zvyšuje množství CFTR proteinu na buněčné membráně.“ Potenciátor se váže na CFTR protein a udržuje chloridový kanál v otevřeném stavu. Tyto dvě látky dohromady představují CFTR modulátor, který zvyšuje množství a kvalitu proteinu (Dave 2021, Southern 2023).

V současné době existují čtyři typy modulátorů, které fungují pouze u lidí s určitými mutacemi. Modulátory jsou vyvinuty, tak aby korigovaly chybně fungující protein tvořený genem CFTR (Cystic Fibrosis Foundation).

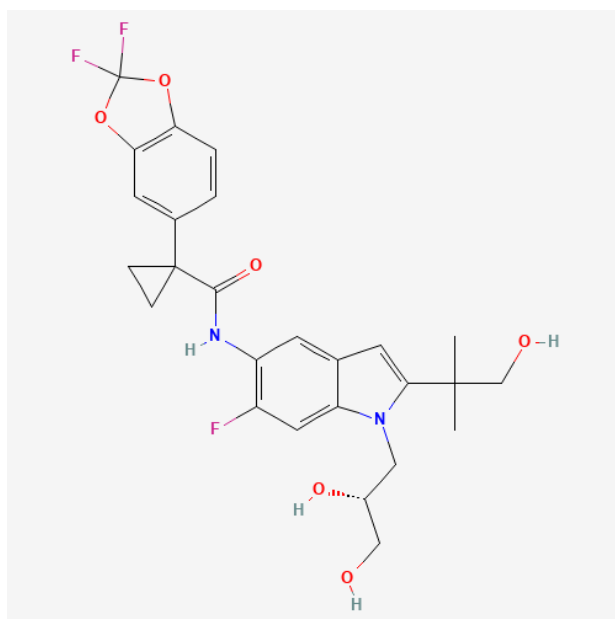
7.8.1 Trikafta

Modulátor Trikafta je kombinací korektorů elexacaftor (Obrázek 9) a tezacaftor (Obrázek 10) a potenciátoru ivacaftoru (Obrázek 11). Korektory pomáhají opravovat chyby v CFTR proteinu, což vede k vytvoření správného tvaru a zajištění transportu na povrch buněk. „Potenciátor se váže na defektní protein na povrchu buňky a otevírá chloridový kanál (drží

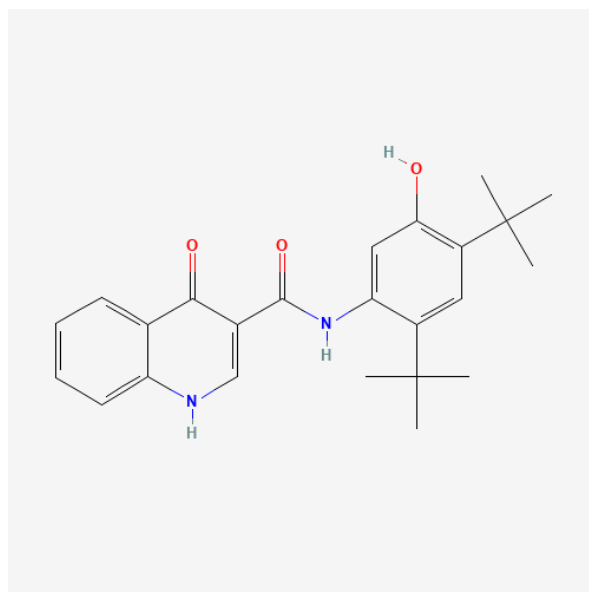
otevřenou bránu), aby jím mohly proudit chloridy.“ Přípravek je žádoucí pro osoby ve věku 2 let a starší, kteří mají alespoň jednu kopii mutace F508del nebo alespoň jednu kopii ze 177 specifikovaných mutací (Cystic Fibrosis Foundation).



Obrázek č. 9 – **Elexakaftor** (Elexacaftor PubChem)



Obrázek č. 10 – **Tezakaftor** (Tezacaftor Pubchem)



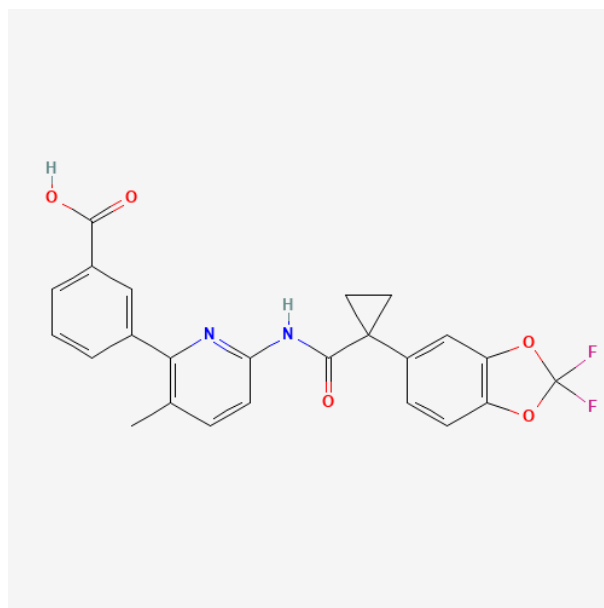
Obrázek č. 11 – **Ivakaftor** (Ivacaftor PubChem)

7.8.2 Symdeko

Modulátor se skládá z korektoru – tezacaftor, který zajišťuje správný tvar CFTR proteinu a pomáhá mu dostat se na povrch buňky a zůstat tam déle a potenciátoru Ivacaftoru, který se váže na poškozený protein a otvírá chloridový kanál. Léčba je určena pro osoby ve věku 6 let a starší se dvěma kopiemi mutace F508del a s jednou kopií jedné ze 154 uvedených mutací. (“CFTR Modulator Therapies | Cystic Fibrosis Foundation,” n.d.)

7.8.3 Orkambi

Modulátor se skládá z kolektoru – lumakaftor (Obrázek 12), vytváří správný tvar CFTR proteinu a pomáhá mu dopravit se na povrch buněk. Na druhou stranu potenciátor, ivakaftor, umožňuje udržet bránu na proteinu CFTR otevřenou, čímž umožní průtok dostatečného množství chloridů ke zmírnění příznaků CF. Přípravek je schválen pro osoby ve věku 1 roku a starší, kteří mají dvě kopie mutace F508del, což je nejčastější mutace CF. (“CFTR Modulator Therapies | Cystic Fibrosis Foundation,” n.d.)



Obrázek č. 12 – **Lumakaftor** (Lumacaftor Pubchem)

7.8.4 Kalydeco

Přípravek Kalydeco obsahuje poteciátor, ivacaftor, který se váže na defektní protein a otvírá chloridové kanály. To směřuje k lepšímu proudění chloridů a vede to regulaci množství tekutiny na povrchu buňky (Cystic Fibrosis Foundation).

8 Riziko rakoviny u pacientů s CF

U pacientů s CF je gen pro CFTR pozměněn. U zdravých pacientů tento gen pomáhá regulovat pohyb látek do buněk a z buněk. Mutace v genu vede k nefunkčnímu transportu chloridových iontů, což má za následek charakteristické příznaky u CF. Důsledkem dochází ke změnám v buněčné homeostáze, což je spojeno se změnami v regulaci buněčného pH a metabolismu. To má významný vliv na růst a přežití nádorových buněk, což vede k vyšší pravděpodobnosti vzniku rakoviny. CF je charakterizována genetickým, molekulárním aspektem a zároveň chronickým zánětem a dysregulací imunitní reakce. Chronický zánět zajišťuje protinádorové mikroprostředí, podporuje iniciaci a progresi nádorových onemocnění. Sledujeme zvýšenou produkci protizánětlivých cytokinů a chemokinů (Parisi 2023).

CFTR se podílí na regulaci epiteliálně-mezenchymálního přechodu, což vede k metastazování rakoviny. Dochází ke ztrátě vlastností epitelových buněk a buňky získávají vlastnosti mezenchymálního typu, což umožňuje lepší pronikání do okolí na dlouhé vzdálenosti. Jak už bylo řečeno, dysfunkce CFTR genu, vede nejen z narušení transportů iontů, ale i ke změnám signalizace vápníku a aktivitě signálních drah, jako je transformující růstový faktor beta (TGF- β) a Wnt/ β -katenin, které hrají klíčovou roli v regulaci EMT. Signální dráha fosfoinositid 3-kináza (PI3K)/Akt a mitogenem aktivovaná proteinkináza je modulována, díky

dysfunkci CFTR. Tyto dráhy jsou klíčové pro růst a přežití buněk. CFTR může interagovat s dalšími proteiny, které jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu a apoptózy. Změny v molekulárních interakcích a signálních drahách vedou k nekontrolované buněčné proliferaci a rezistenci vůči mechanismu buněčné smrti (Parisi 2023).

CFTR ovlivňuje příjem, vyplavování intracelulárních léčiv, v závislosti na aktivitě CFTR, která ovlivňuje odpověď nádorových buněk na chemoterapeutika. „Rezistence na léky zprostředkovaná CFTR může ovlivnit účinnost léčby rakoviny a představovat problém při dosahování úspěšných výsledků (Parisi 2023).“

Nejčastěji objevujícími se rakoviny spojeny s CF jsou rakovina tlustého střeva, konečníku, slinivky břišní a dýchacích cest (Parisi 2023).

8.1 Aktivace NF – κB dráhy

„Zánět s aberantní aktivací dráhy NF-κB je charakteristickým znakem cystické fibrózy (CF)“. Studie ukazují, že dráha NF-κB/COX-2/PGE2 je aktivována, zatímco dráha β-kateninu je potlačena ve střevě CF myši a v buňkách s vyřazeným CFTR. Aktivace dráhy β-kateninu inhibitory GSK3 potlačuje dráhu NF-κB/COX-2/PGE2 indukovanou mutací/knockdownem CFTR ve střevě myši ΔF508 a v buňkách CFTR-knockdown. Naproti tomu potlačení signalizace β-kateninu indukuje jadernou translokaci NF-κB. Kromě toho CFTR ko-lokalizuje a interaguje s β-kateninem, zatímco mutace CFTR narušuje interakci mezi NF-κB a β-kateninem v myším střevě. Souhrnně tyto výsledky naznačují, že CFTR stabilizuje β-katenin a brání jeho degradaci, jejíž porucha vede k aktivaci zánětlivé kaskády zprostředkované NF-κB. (Liu 2016).

Pacienti s CF často trpí chronickým zánětem v různých orgánech a v tkáních, včetně gastrointestinálního traktu. U pacientů s CF jsou zaznamenány zvýšené hladiny cytokinů, a mediátorů, jako jsou interleukiny, tumornekrotizující faktor-α (TNF-α) a prostaglandin E2 (PGE2). To naznačuje zvýšenou propustnost střevního epitelu a zánět. Mutace CFTR vede k přehnaným zánětlivým reakcím, které nesouvisí s bakteriální infekcí „Zánět, který je CF plicním onemocněním vlastní, je spojován s aberantně aktivovanými zánětlivými reakcemi zprostředkovanými NF-κB“. „Studie prokázaly, že CFTR funguje jako negativní regulátor COX-2/PGE2-zprostředkované prozánětlivé odpovědi v buňkách epitelu dýchacích cest a prostaty, jejíž defekt vede k nadměrné aktivaci NF-κB a nadměrné produkci PGE2“. Defekt CFTR vede k přehnané NF-κB-zprostředkované prozánětlivé odpovědi, která nesouvisí s bakteriální infekcí (Liu 2016).

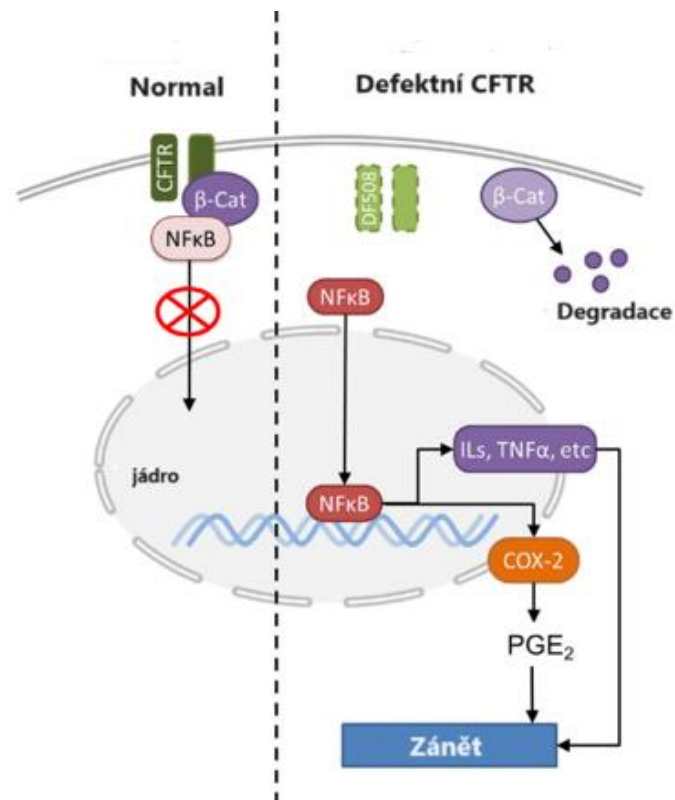
Kontrola aktivity kmenových buněk, buněčné proliferace a přežívání buněk gastrointestinálního epitelu se účastní signální kaskáda Wnt/β-katenin. V cytoplazmě dochází k interakci mezi β-katenin a NF-κB, což vede ke snížení jaderné translokace NF-κB a transkripční aktivaci ve střevních epiteliálních buňkách a rakovinných buňkách. Byla zjištěna protizánětlivá role dráhy Wnt/β-katenin ve střevních epiteliálních buňkách v reakci na bakteriální infekci. „CFTR reguluje aktivitu NF-κB prostřednictvím dráhy β-kateninu, jejíž

dysfunkce může vést k aberantní aktivaci NF- κ B/COX-2/PGE2 kaskády a přehnané zánětlivé reakci pozorované ve střevě CF“ (Liu 2016).

Nadměrnou aktivaci zánětlivé kaskády zprostředkované NF- κ B vede k zánětlivé reakci ve střevě CF. CFTR a dráha NF- κ B jsou spojeny prostřednictvím signální dráhy β -kateninu. Infiltrace neutrofilů a makrofágů ve střevních buňkách vede k zánětlivým projevům. Stimulací LPS vede defekt CFTR v apikální membráně epitelálních buněk dýchacích cest k nadměrné fosforylaci I κ B. Následuje destrukci komplexu I κ B-NF- κ B a jaderné translokaci NF- κ B (Liu 2016).

Klíčová složka degradačního komplexu β -kateninu, GSK-3 β , určuje osud β -kateninu. Aktivitu β -kateninu je zachráněna a potlačuje se aktivita NF- κ B/COX-2/PGE2 vyvolanou dysfunkcí CFTR. „ β -katenin může sloužit jako inhibitor zánětlivé reakce zprostředkované NF- κ B.“ CFTR vytváří komplex s β -kateninem a NF- κ B, který zajišťuje regulaci jaderné translokace NF- κ B, a tím i zánětlivou odpověď zprostředkovanou NF- κ B. „Jako transkripční aktivátor Wnt signalizace hraje β -katenin ústřední roli ve vývoji a homeostáze střeva.“ Mutace CFTR nebo jeho down regulace snižuje jadernou translokaci a aktivitu β -kateninu. Funkcí CFTR je stabilizace β -kateninu a zabránění jeho degradace. CFTR vytvoří komplex s β -kateninem a NF- κ B. „Defekt CFTR vede ke snížení vazby β -kateninu a NF- κ B, což vysvětluje zvýšení jaderné translokace NF- κ B.“ β -katenin může stabilizovat NF- κ B a inhibovat jadernou translokaci NF- κ B prostřednictvím fyzické interakce, která je nezávislá na I κ B- α ve střevních epitelálních buňkách. Snížená interakce mezi β -kateninem a NF- κ B je jednoduše způsobena zrychlenou degradací (Liu 2016).

Hlavním faktorem při vzniku a progresi rakoviny tlustého střeva je chronický zánět. Mutace CFTR zvyšuje multiplicitu střevních nádorů a dochází k aberantní exprese β -kateninu. Regulace aktivity NF- κ B interakcí mezi CFTR a β -kateninem má vliv na vznik rakoviny trávicího traktu a dalších chronických střevních zánětlivých onemocnění, jako je Crohnova choroba a chronické zánětlivé střevní onemocnění (IBD) (Liu 2016).



Obrázek č. 13 – Porovnání mechanismu CFTR u zdravé pacienta a defektní CFTR, která vede k hyperaktivace NF-κB-Cox2-PGE₂ dráhy (Liu 2016)

9 Cíl práce

Cílem práce bylo porovnat expresi vybraných proteinů ve střevech od pacientů s CF a zároveň porovnat expresi proteinů v buňkách plic (buněčné linie NuLi-1 a CUFi-1) mezi zdravým jedincem a pacientem trpícím cystickou fibrózou, za účelem analyzovat predispozici k rakovině plic a střev u pacientů s cystickou fibrózou.

Dílčí kroky předcházející tuto analýzu byly:

- Izolace RNA z buněčných linií NuLi-1 a CUFi-1 a organoidů z pacientů CF
- Zjištění přítomnosti RNA za účelem následujících procesů s využitím horizontální agarová elektroforéza
- Stanovení čistoty RNA s následným provedením reverzní transkriptasy
- Stanovení exprese genů GAPDH, APC, CDH1, NF-kB a CBY1 pro buněčné linie NuLi-1 a CUFi-1 i pro organoidy pomocí polymerázové řetězové reakce

10 Materiál a metody

10.1 Použité přístroje

10.1.1 Použité přístroje

Allegra X-30R centrifuga	Beckman Coulter
Centrifuga 5418	Eppendorf, CZ a SK
Centrifuga 5430	Eppendorf, CZ a SK
CFX Connect Real time systém	Bio-RAD, USA
Digestoř	Labox, Jirny
Dark Reader Transilluminator DR-45M	Akribis Scientific supplies, UK
DS-11+ Spektrofotometr	DeNovix, US
Horizontální elektroforéza (multiSUB choice)	Schoeller Pharma, Česká republika
Lab Dancer S040	VWR, Korea
MiniStar whiteline	VWR, Korea
Napájecí zdroj PowerPac	Biorad, USA
Stolní mixér Tefal PerfectMix+ BL811D38	Tefal, Francie
Stolní centrifuga	Labnet, Korea
Techgene FTGene2D Thermal cycler	Techne, UK

10.2 Materiál a chemikálie

10.2.1 Materiál

Buněčné linie NuLi-1 a CuFI-1	ATCC®, USA
Erlenmayerova baňka	P-LAB, Česká republika
Homogenizátor Potter-Elvehjem	P-LAB, Česká republika
Kádinka	P-LAB, Česká republika
Mikrozkumavky Eppendorf	Thermo Scientific, USA
Mikropipeta	Steinberg, Německo
Odměrný válec	P-LAB, Česká republika
Organoidy	Nemocnice Motol, Česká republika
PCR mikrodestička	BioTech, Česká republika
Pinzeta	P-LAB, Česká republika
Pipety 10 uL, 100 uL s filtrem (Maximum recovery)	Baria, Česká republika

Research® plus pipety
Stojánky na zkumavky
Těsnicí uzavírací víčka pro PCR destičku
Zkumavka centrifugační se šroubovacím víčkem

Eppendorf, CZ a SK
Schoeller, Česká republika
P-LAB, Česká republika
P-LAB, Česká republika

10.2.2 Chemikálie

Akrylamid, bis-akrylamid
Chloroform
EDTA
Ethanol
FastStart essential DNA Probes master
High Capacity cDNA reverse transcription Kit
Isopropylalkohol
Kyselina Boritá
Master mix, x2 SYBR
PrimePCR GAPDH
PrimePCR CBY1
PrimePCR APC
PrimePCR NFkB2
PrimePCR CDH1
SYBR™ Green II RNA Gel Stain
Tri reagent
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water

Sigma-Aldrich, USA
Lach-Ner, ČR
Lach-Ner, Česká republika
Lach-Ner, ČR
Roche, Austria
Thermo Scientific, USA
Lach-Ner, ČR
Lach-Ner, Česká republika
Top-BIO, Česká republika
Bio-RAD, USA
Bio-RAD, USA
Bio-RAD, USA
Bio-RAD, USA
Bio-RAD, USA
Thermo Scientific
Zymo Research, USA
P-LAB, Česká republika
Thermo Scientific,

10.3 Metody

10.3.1 Kultivace buněčných linií s modulátory

V rámci experimentu byly inkubovány buněčné linie NuLi a CuFi. Buňky s označením NuLi představují izolované buňky z plic od zdravého jedince. Buňky CuFi představují buňky izolované z plic pacienta s cystickou fibrosou.

První mikrotitrační destička obsahující z poloviny buněčné linie NuLi a z poloviny buněčné linie CuFi byla inkubována s danými modulátory (Ivakaftor, Tezacaftor, Elexacaftor) po dobu 24 hodin. Do jedné jamky bylo nanášeno 0,5 ml média (BEGM). Byla přidána určitá koncentrace modulátoru (1 μ M Ivakaftor, 2 μ M Elexacaftor, 3 μ M Tezacaftor). Na jednu jamku bylo nasazeno 500 tis buněk. Totéž bylo provedeno pro druhou mikrotitrační destičku, která však byla inkubována s danými modulátory po dobu 72 hodin. Obě destičky obsahovaly kontrolu, kde modulátor pipetován nebyl.

Kultivace byla provedena na katedře Biochemie UK Mgr. Radkem Indrou, Ph.D.

10.3.2 Izolace RNA

Než začneme pracovat předchladíme si centrifugu na 4 °C. Celá izolace probíhá v digestoři. Pracovní plocha je vydezinfikována ethanolem nebo RNAasa away. Pracovní prostor a nástroje jsou vysvíceny UV zářením. Pracujeme v rukavicích.

Postup:

Připravíme si dvě sady mikrozkušavek Ependorf podle množství vzorků, které si popíšeme. Vzorky z mrazáku vložíme na suchý led. Ke vzorkům je přidán 1ml triazolu a jsou opět vloženy na led, aby nedošlo k degradaci RNA. Necháme 5 minut stát. Ke vzorkům následně přidáme 200 μ l chloroformu. Promícháme pomocí pipety. Vzorky necháme stát 4 min při laboratorní teplotě a následně dáme centrifugovat (15 000 rpm, 15 min, 4 °C). Po centrifugaci se vytvoří 3 fáze – vodní fáze obsahující RNA, interfáze, kde jsou vysrážené proteiny a spodní organická fáze. Pokud by se fáze zbarvená růžově objevila nahoře, RNA je příliš těžká a nachází se v dolní fázi. V tomto případě je potřeba přidat více triazolu, aby se čirá fáze nacházela nahoře. Horní fázi odebereme do druhé sady mikrozkušavek. Ke vzorkům přidáme stejné množství izopropanolu jako je fáze (v poměru 1:1). Vzorky vložíme do mrazáku -20 °C (přes noc).

Druhý den opět předchladíme centrifugu na 4°C. Vzorky vytáhneme z mrazáku a dáme na centrifugu (12 000 rpm, 30 min, 4 °C). Na dně mikrozkušavky se vytvoří peleta. Pipetou odsajeme veškerou organickou fázi a necháme pouze peletu. K peletě přidáme 1 ml 70 % ethanolu, aby došlo ke zvýraznění pelety. Vzorky dáme centrifugovat (12 000 rpm, 10 min, 4

°C). Pipetou odebereme ethanol. Mikrozkušavky necháme otevřené, aby se peleta vysušila. Nakonec přidáme 20 µl RNA free water.

10.3.3 Stanovení koncentrace a čistoty RNA

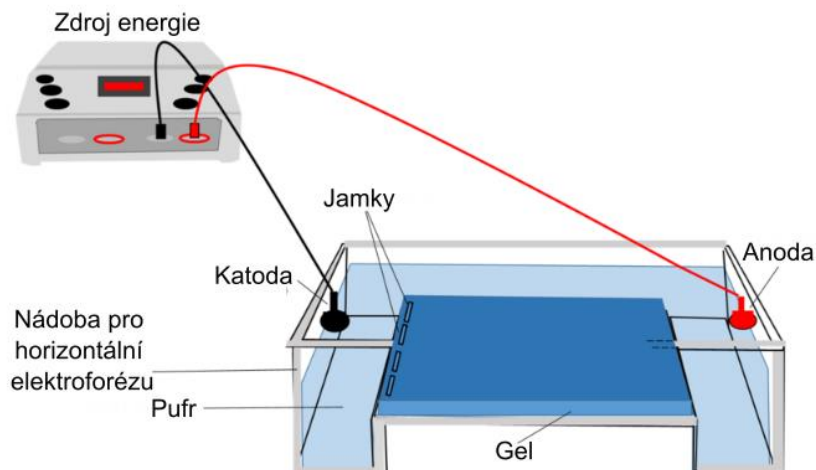
Byly připraveny vzorky k přístroji (DS-11⁺ Spektrofotometr). Stanovení čistoty a koncentrace bylo určeno pomocí programu Nanodrop200. Koncentrace RNA ve vzorku musí být <1000 ng/µl. Pokud je koncentrace vyšší, je potřeba vzorek naředit. Nejprve byl proměřen blank – vzorek pouze RNA free water. Následovalo stanovení čistoty a koncentrace RNA. Pipetou bylo naneso 1 µl vzorku na spektrofotometr. Cílem stanovení je proměření absorbance při vlnové délce 260 nm, které odpovídá absorpčnímu maximu nukleových kyselin a při vlnové délce 280 nm, kde nejvíce absorbují proteiny. Vlnová délka 320 nm slouží jako pozadí. Čistota se měří – 260/280 a 260/230. Hodnoty 260/230 pro „čistou“ nukleovou kyselinu jsou často vyšší než příslušné hodnoty 260/280. Očekávané hodnoty 260/230 se běžně pohybují v rozmezí 2,0-2,2. Pokud je poměr výrazně nižší než očekávaný, může to znamenat přítomnost nežádoucích organických sloučenin (Trizol, fenol, Guanidin HCL a guanidinthiokyanát), které absorbují při vlnové délce 230 nm. Poměr vlnových délek 260/280 nám pomáhá určit, zda je RNA kontaminovaná bílkovinami. Hodnota čistoty by se měla pohybovat v rozmezí 1,8-2. Je-li hodnota pod 1,8 může být vzorek kontaminován bílkovinami nebo fenoly.

10.3.4 Horizontální elektroforéza RNA na agarosovém gelu

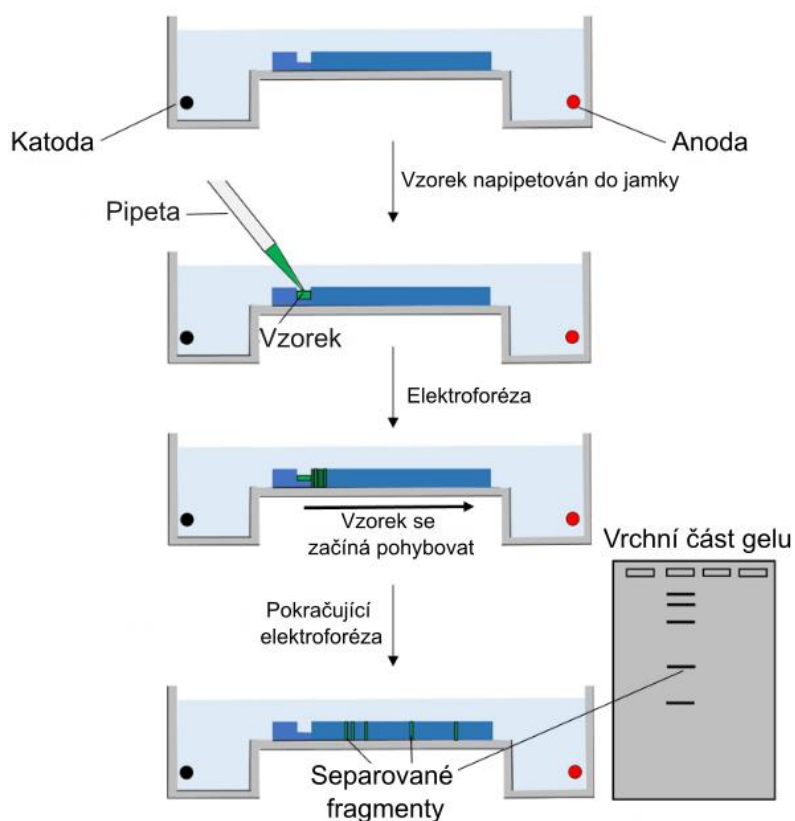
Princip

Elektroforéza na agarosovém gelu je běžná používaná technika v molekulární biologii pro separaci nukleových kyselin, jako je DNA nebo RNA, na základě jejich velikosti. Tato metoda je základem pro širokou škálu aplikací, včetně analýzy DNA fragmentů, genotypování a ověřování výsledků PCR.

Tento proces využívá elektrického pole k pohybu negativně nabitých molekul (např. DNA) skrze gel (obrázek 14), který působí jako síto, jež zpomaluje větší fragmenty více než menší. Agarosový gel je připravený z polysacharidu agarózy, který poskytuje stabilní a snadno manipulovatelný materiál pro separaci. Po elektroforéze je možné fragmenty vizualizovat pomocí barviv, jako je ethidium bromid nebo SYBR Green, pod UV světlem (Green 2012).



Obrázek č. 14 – **Technické uspořádání aparatury pro horizontální elektroforézu.** Zdroj energie poskytuje energii v podmínkách konstantního proudu či napětí. Pufr nese proud, ustanovuje pH a určuje výsledný náboj rozpuštěné látky. Agarový gel slouží jako nosič.



Obrázek č. 15 – **Mechanismus horizontální elektroforézy** (Priyashantha a Umashankar 2021)

Roztok:

1. Pufir 5x TBE: 44 mM Tris, 445 mM kyselina boritá, 10 mM EDTA, pH 8-8,3
2. Syber green II (40 ml H₂O + 10 ml TBE + x mikrolitru barviva)

Postup:

Nádobí bylo omyto 10 % peroxidem vodíkem a zabaleno do alobalu. Následovalo 6hodinové sušení při teplotě 180 °C. Ze zásobního roztoku 5x TBE byl připraven 0,5x TBE. Ten byl následně využit na přípravu 40 ml 1 % agarosového gelu. Směs byla vložena do mikrovlnné trouby, kde byla zahřívána, dokud se agarósa zcela nerozpustila. Následně byla směs chlazená pod proudem studené vody a poté nalita na připravenou formu. Byly vloženy hřebeny dle potřeby a gel byl ponechán 30 minut, aby ztuhl. Po uplynutí času, byly hřebeny odebrány a gel byl vložen do aparatury na elektroforézu. Celá aparatura byla vyplněna 0,5x TBE pufrem do výše rysky.

Vzorky byly připraveny následovně – 3 µl ze zásobního roztoku + 3 µl (x2) gel loading dye. Do jamek bylo pipetováno 6 µl markeru a vzorky o objemu 6 µl. Celý aparát byl připojen ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala po dobu 45 minut při napětí 110 V. Gel byl vložen do barvicí lázně obsahující barvivo syber green II. Gel s barvicí lázní byl vložen na třepačku po dobu 30 minut. Následně byl vizualizován v temné komoře pomocí Dark readeru.

10.3.5 Syntéza cDNA – reverzní transkripce

Princip

Reverzní transkriptasa se účastní tvorby komplementárního DNA (cDNA) z RNA templátu. Reverzní transkriptasa (RT) využívá RNA templát a primer komplementární k RNA k syntéze prvního vlákna cDNA, které lze použít přímo jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Kombinace reverzní transkripce a PCR (RT-PCR) umožňuje detekovat RNA s nízkou koncentrací ve vzorku a produkci odpovídající cDNA, čímž usnadňuje klonování genů s nízkým počtem kopií (Ng 2015).

Roztok:

MiX na jeden vzorek – 4,2 µl RNasa free H₂O, 2 µl 10x RT buffer, 2 µl 10x RT random primers, 0,8 25x dNTP Mix (100 mM), 1 µl RNasa inhibitor. Je potřeba zajistit, aby v každém vzorku bylo 1µg RNA. Nutné vypočítat kolik je to µl. Celkový objem vzorku byl 10 µl. V = 10 µl – V RNA (1µg). Objem vzorku doplnit RNA free vodou.

Postup:

Před použitím flow boxu celý, pracovní plochu vydezinfikujeme ethanolem. Vložíme všechny potřebné pomůcky a necháme vysvítit UV zářením. Připravíme si suchý a normální led do polystyrenových krabiček. Dopředu si připravíme MIX podle množství vzorků (+ aspoň 2 vzorky rezerva).

Vzorky RNA vložíme na suchý led. Připravíme si vzorky s celkovým objemem 10 μ l obsahující RNA a kontrolu bez RNA 10 μ l H₂O a vložíme na led. Promícháme poklepem, vložíme na 1 minutu na mikrocentrifugu a vložíme na led. Ke každému vzorku přidáme 10 μ l MIXu. Všechny zamícháme pipetou, vložíme na mikrocentrifugu a vložíme na led. Z každého vzorku i z kontroly odebereme 2 μ l do 200 μ l mikrozkuhavky a dáme na led. Slouží jako negativní kontrola. Do vzorků pipetujeme 1 μ l reverzní transkriptasy. Opět promícháme poklepem, vložíme na mikrocentrifugu a dáme na led. Všechny vzorky, včetně negativních kontrol přemístíme do thermocykleru. První cyklus 25 °C 10 min, druhý cyklus 37 °C 120 min, třetí cyklus 85 °C 5 min (tabulka 1) a čtvrtý cyklus 4 °, který však není pro transkripci důležitý a je možné ho kdykoliv ukončit. Poslední krok slouží pouze k uchování vzorků v chladu. Vytvořené produkty uchováváme v mrazáku při teplotě -80 °C.

10 min	Nasednutí náhodných primerů	25 °C
120 min	Prodloužení řetězce cDNA	37 °C
5 min	Inaktivace reverzní transkriptasy	85 °C

Tabulka 1. – **Reakční podmínky** pro reverzní transkripci

10.3.6 Polymerázová řetězová reakce

Princip:

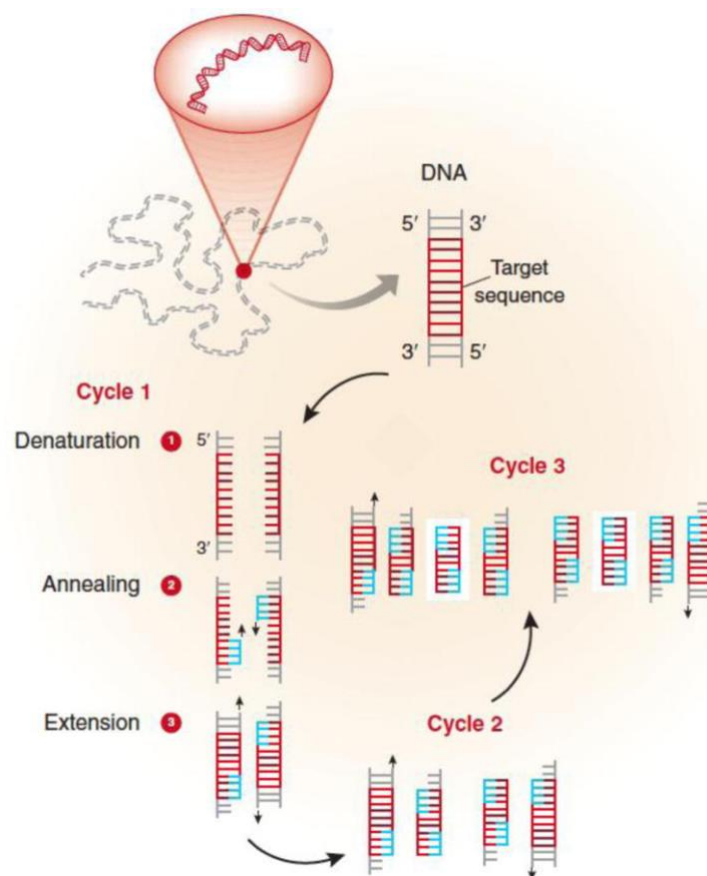
PCR (polymerázová řetězová reakce) zajišťuje amplifikaci specifického fragmentu DNA. Důležité je přítomnost templátové DNA, nukleotidů a DNA polymerázy, která zajišťuje spojování jednotlivých nukleotidů. DNA polymeráza se váže na primer a dochází k amplifikaci příslušné DNA.

Cykly amplifikace probíhají v termocykleru, kde dochází ke snižování či zvyšování teploty v přesných krocích. V prvním kroku se roztok zahřeje na bod tání dvou komplementárních řetězců DNA (kolem 95 °C), čímž dojde k oddělení řetězců a vytvoří se jedno vláknová DNA, tzv. denaturace (Obrázek 16). V druhém kroku teplota klesne na 50-60 °C, aby došlo ke specifickému navázání primerů, tzv. hybridizace. Tato fáze je u PCR velmi kritická. Při nízké teplotě, nasedá komplementární primer jen z části a vytvoří se nespecifický produkt. Při vyšší teplotě budou primery málo hybridizovat a produktu se vytvoří málo. V třetím kroku se teplota opět zvyšuje na 65-75 °C a to umožňuje DNA polymerase přikládat nukleotidy

na 3' -konec primeru a syntetizovat nový komplementární řetězec s templátem. Pro proběhnutí cyklu se množství DNA zdvojnásobí (Garibyan a Avashia 2013, Zhang 2019).

Vyhodnocení výsledků polymerázové řetězové reakce závisí na použité metodě. U konvenční PCR jsou amplifikované fragmenty DNA analyzovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu, kde je velikost fragmentů určena srovnáním s molekulární hmotnostní značkou. U kvantitativní PCR je průběh reakce sledován v reálném čase díky fluorescenčním barvivům nebo sondám. Hlavním parametrem hodnocení je tzv. prahový cyklus (Ct), který označuje bod, kdy fluorescence přesáhne detekční limit. Ct hodnota je úměrná původní koncentraci cílové DNA ve vzorku, což umožňuje kvantifikaci (Kubista 2006).

SYBR Green (CyberGreen) je fluorescenční barvivo často používané v qPCR. Váže se nespecificky na dvouřetězcovou DNA a po navázání zvyšuje fluorescenci, což umožňuje monitorovat amplifikaci DNA během každého cyklu (Kubista 2006).



Obrátek č. 16 – **Polymerázová řetězová reakce** (Garibyan a Avashia 2013)

Roztok:

Na 1 vzorek bylo potřeba:

- 10 µl master mixu – FastStart Essential DNA Probes Master
- 4 µl H₂O – FastStart Essential DNA Probes Master H₂O
- 1 µl primeru – (GAPDH/CDH1/CBY1/APC/NFKB2)

Postup:

V první řadě byly vzorky cDNA a negativní kontroly (neobsahují RNA) 10x zředěny RNase free vodou. Vzorky byly připraveny smícháním 8 µl cDNA a 72 µl H₂O. Jejich kontroly byly smíchány z 2 µl roztoku s 18 µl H₂O. Byl připraven „premix“.

Do jamky mikrotitrační destičky byly pipetovány vzorky. K 15 µl premixu bylo přidáno 5 µl vzorku cDNA a jako slepý vzorek byla místo cDNA použita RNase free voda. Vzorky byly pipetovány v dupletech. Následně byla mikrotitrační destička zalepena fólií, aby nedošlo ke kontaminaci. Byla provedena centrifugace 30 sekund při 300 rpm. Destička byla vložena do Real-time PCR cycleru (tabulka 2), kde byla proměřena fluorescence. K vyhodnocení výsledků byl použit program RotorGene5.

Program	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95	10 minut	50 cyklů
2	95	15 sekund	
3	60	60 sekund	

Tabulka č. 2 – **Reakční podmínky PCR**

Na experiment byly získány také organoidy z tlustého střeva pacientů trpící onemocněním cystické fibrózy (tabulka 3). Organoidy byly podrobeny pokusům jako izolace RNA s následnou syntézou cNDA a nakonec byla provedena polymerasová řetězová reakce.

Pacient 1	2789+5G >A/3659delC
Pacient 2	G542X/L000del
Pacient 3	D1152H
Pacient 4	N1303K
Pacient 5	G542X/L000del
Pacient 6	2789+5G A/3659delC
Pacient 7	G542X/E1104K
Pacient 8	F508del
Pacient 9	G542X/L000del
Pacient 10	F508del

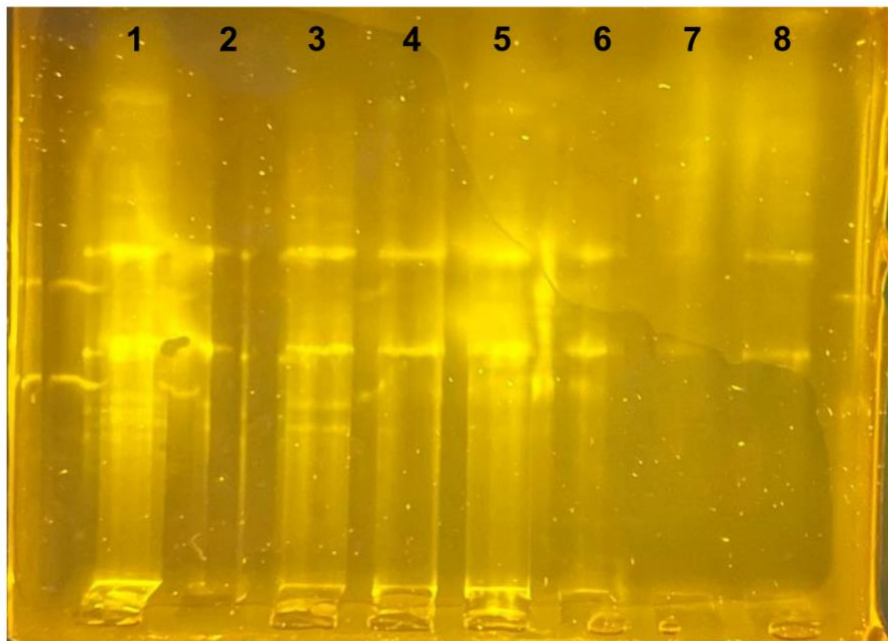
Tabulka č. 3 – **Mutace u pacientů, jejichž organoidy byly použity pro stanovení genové exprese.**

11. Výsledky

11.1 Horizontální elektroforéza RNA na agarosovém gelu

Pomocí metody horizontální elektroforézy byl získán gel, který byl vložen do barvicí lázně obsahující barvivo syber green II. Následně byl gel vizualizován v temné komoře pomocí Dark readeru. Příklad této elektroforézy je zobrazen na obrázku (obrázek 17).

Popis metody a daných vzorků lze nalézt na straně 46, kde je přesně popsáno, jaké množství bylo pipetováno.



Obrázek č. 17 – **Ověření fragmentů RNA** pomocí horizontální elektroforézy

První dráha obsahuje M_r standard o známých molekulových hmotnostech jednotlivých proužků. Dráhy 2-8 obsahuje vzorky obsahující RNA.

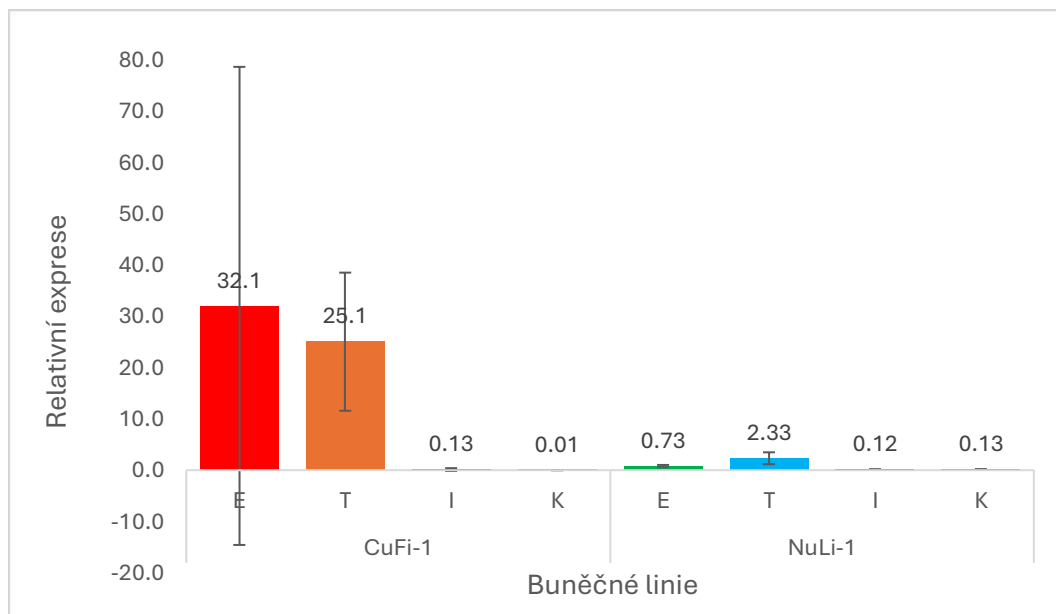
Přítomnost jasných proužků ve dvou řadách ve všech vzorcích potvrzuje dobrou kvalitu izolované RNA. To znamená, že RNA byla správně extrahována a není výrazně degradovaná. Dané vzorky byly využity pro další analýzy, pro reverzní transkripci (RT) a následné kvantitativní PCR (qPCR).

11.2 Stanovení čistoty RNA

Hodnoty čistoty RNA, vyjádřené poměry 230/260 a 260/280, se u všech analyzovaných vzorků pohybovaly přibližně kolem hodnoty 2, což odpovídá požadovaným standardům pro čistotu RNA.

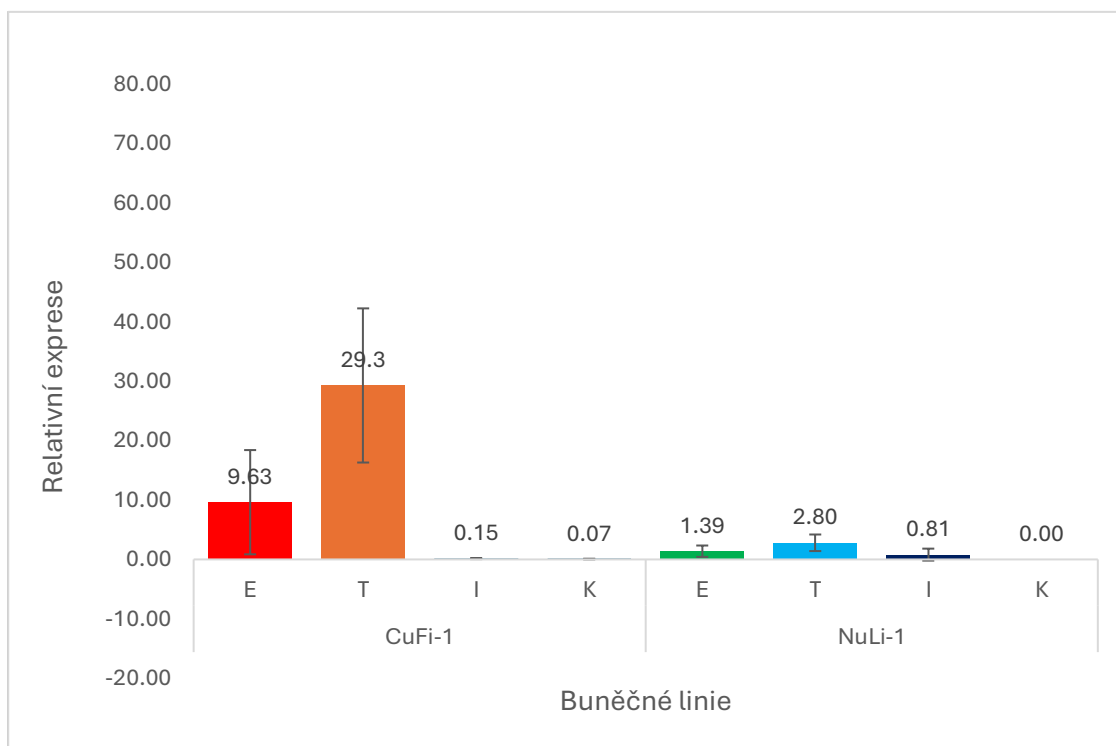
11.3 Expresa vybraných proteinů izolovaných z buněčných linií

Stanovení exprese jednotlivých genů probíhalo prostřednictvím metody PCR (viz 10.3.6.). Buněčné linie s označením NuLi-1 představují izolované buňky z plic od zdravého jedince. Buňky CuFi-1 představují buňky izolované z plic pacienta s cystickou fibrózou. Část buněčných linií bylo inkubováno s modulátory po dobu 24 hodin a část po dobu 72 hodin. Obě buněčné linie byly inkubovány po dobu 24 i 72 hodin i bez přítomnosti modulátorů.



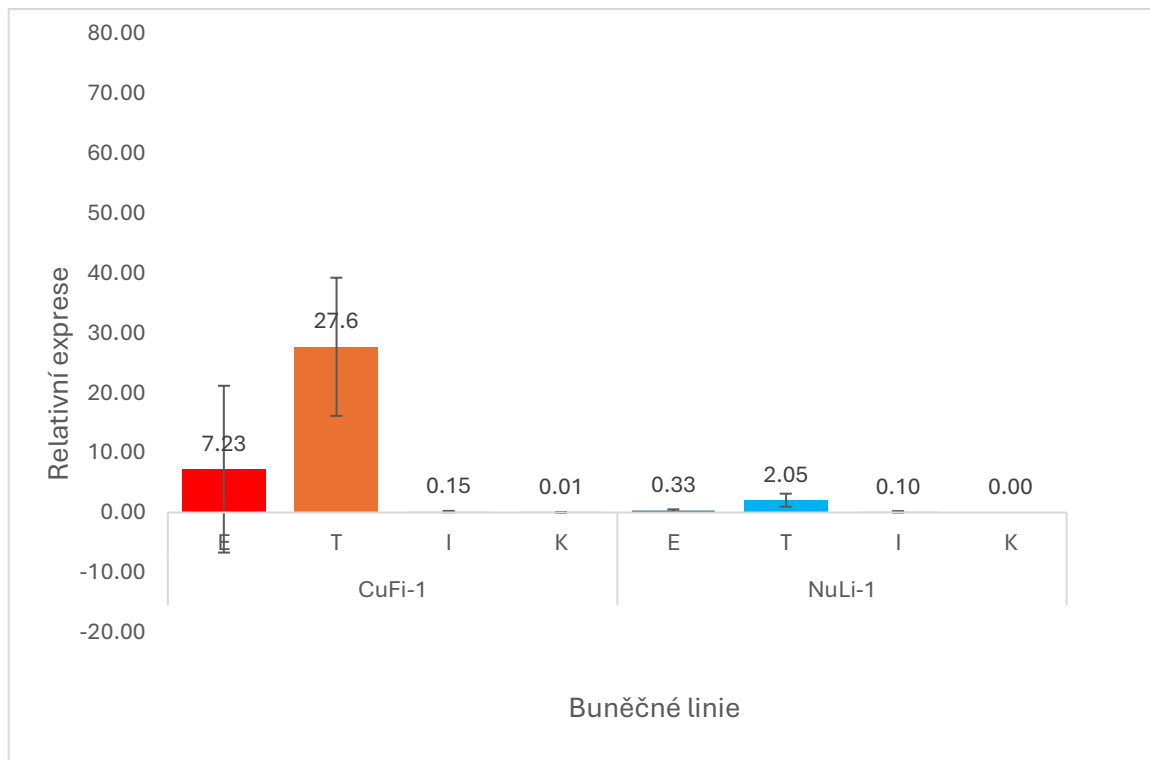
Obrázek č. 18 – **Relativní genová exprese NFkB pro buněčné linie inkubované s modulátory 24 hodin.** Osa y relativní exprese vztažena k referenčnímu genu GAPDH. Osa x reprezentuje buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 inkubovány s danými modulátory (E – elexakaftor, T – tezakaftor, I – ivakaftor, K – bez modulátoru). Číselné hodnoty představují násobky změny exprese. Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze šesti měření.

V rámci exprese genu NFkB v buněčné linii NuLi-1 pozorujeme nízkou expresi tohoto genu (obrázek 18). V přítomnosti modulátorů elexakaftoru a tezakaftoru dochází k zvýšení exprese, přičemž nejvyšší exprese je v přítomnosti tezakaftoru. Třetí testovaný modulátor nemá na hladinu exprese genu NFkB v buňkách NuLi-1 vliv. V případě buněčné linie CuFi-1 je exprese daného genu bez přítomnosti modulátorů opět velmi nízká, dokonce nižší než v buněčné linii NuLi-1. V přítomnosti modulátorů je pozorována vyšší exprese. V přítomnosti ivakaftoru se exprese shoduje s expresí genu v buněčné linii NuLi-1. Elexakaftor a tezakaftor vykazují podstatně vyšší expresi, i když v případě elexakaftoru je vysoká exprese spojena s výraznou variabilitou.



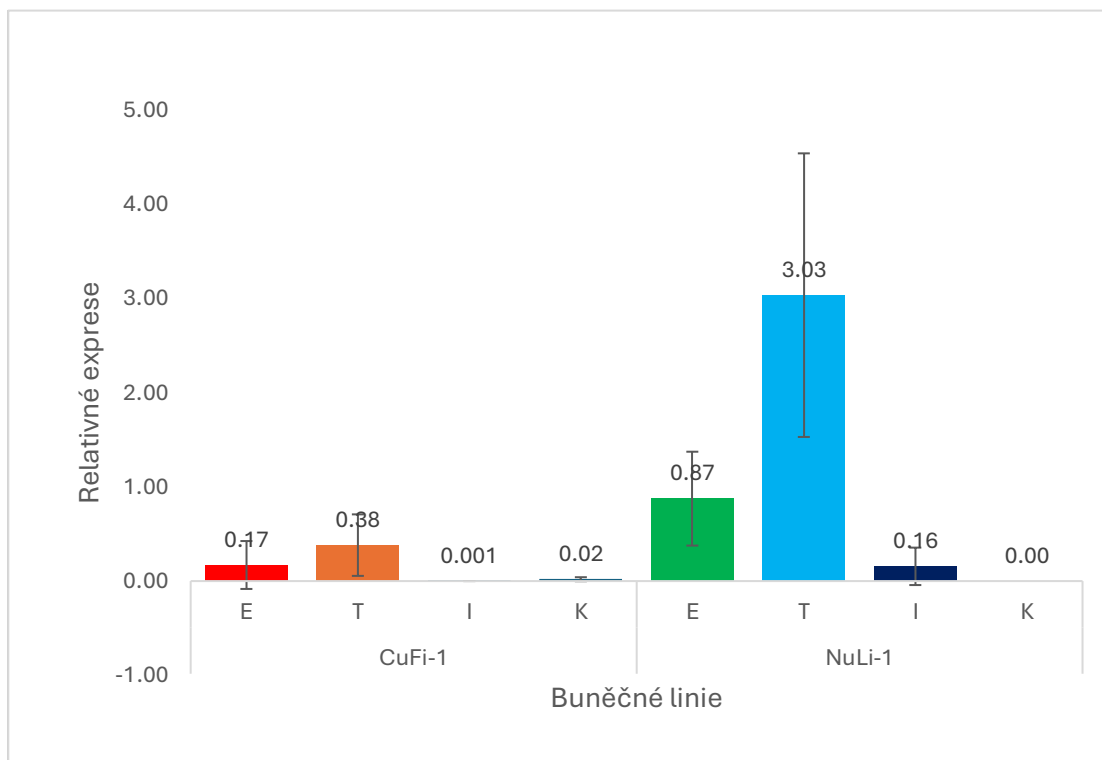
Obrázek č. 19 – **Relativní genová exprese CDH1 pro buněčné linie inkubovány s modulátory 24 hodin.** Osa y relativní exprese vztažena k referenčnímu genu GAPDH. Osa x reprezentuje buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 inkubovány s danými modulátory (E – elexakaftor, T – tezakaftor, I – ivakaftor, K – bez modulátoru). Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze šesti měření.

V buněčné linii NuLi-1 byla zjištěna nízká exprese genu CDH1 (obrázek 19). Přidáním modulátorů, konkrétně elexakaftoru a tezakaftoru, vedlo k nárůstu exprese, přičemž nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v přítomnosti tezakaftoru. Třetí modulátor měl na hladinu exprese genu CDH1 v buněčné linii NuLi-1 méně významný vliv. U buněčné linie CuFi-1 byla exprese tohoto genu bez přítomnosti modulátorů nízká, avšak vyšší než u linie NuLi-1. Absence exprese může indikovat minimální nebo zcela potlačenou aktivitu genu CDH1. Při aplikaci modulátorů bylo pozorováno zvýšení exprese; ivakaftor vykazoval vyšší účinek na buňky NuLi-1 než na CuFi-1. Modulátory elexakaftor a tezakaftor vykazovaly podstatné zvýšení exprese u linie CuFi-1, přičemž tezakaftor měl nejvýraznější efekt.



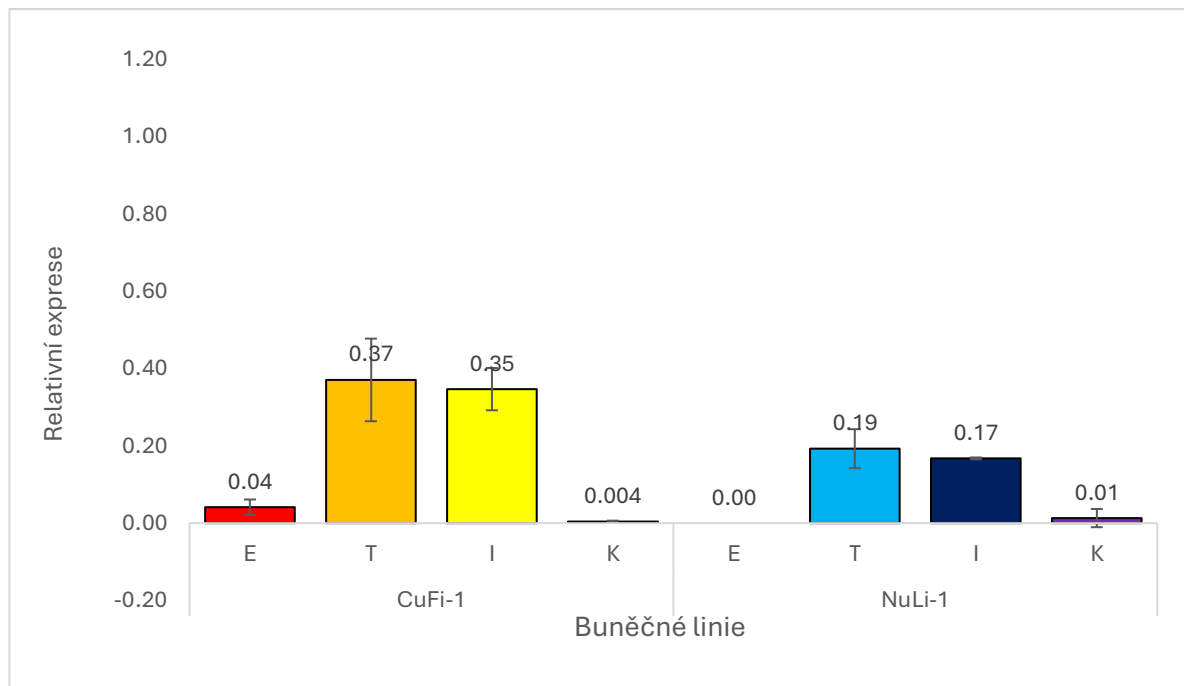
Obrázek č. 20 – **Relativní genová exprese CBY1 pro buněčné linie inkubovány s modulátory 24 hodin.** Osa y relativní exprese vztažena k referenčnímu genu GAPDH. Osa x reprezentuje buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 inkubovány s danými modulátory (E – elexakaftor, T – tezakaftor, I – ivakaftor, K – bez modulátoru). Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze šesti měření.

V buněčné linie NuLi-1 byla zaznamenána nízká exprese genu CBY1 (obrázek 20), přičemž výrazně vyšší exprese byla pozorována po aplikaci modulátoru tezakaftoru. Na rozdíl od něj modulátory elexakaftor a ivakaftor měly méně významný vliv na hladinu exprese tohoto genu v NuLi-1. Obě testované buněčné linie vykazovaly nízkou expresi genu CBY1 v nepřítomnosti modulátorů. U buněčné linie CuFi-1 vedlo použití modulátorů – elexakaftor a tezakaftor k výrazně vyšší expresi, přičemž největší účinek měl tezakaftor, zatímco ivakaftor neměl na hladinu exprese pozoruhodný vliv.



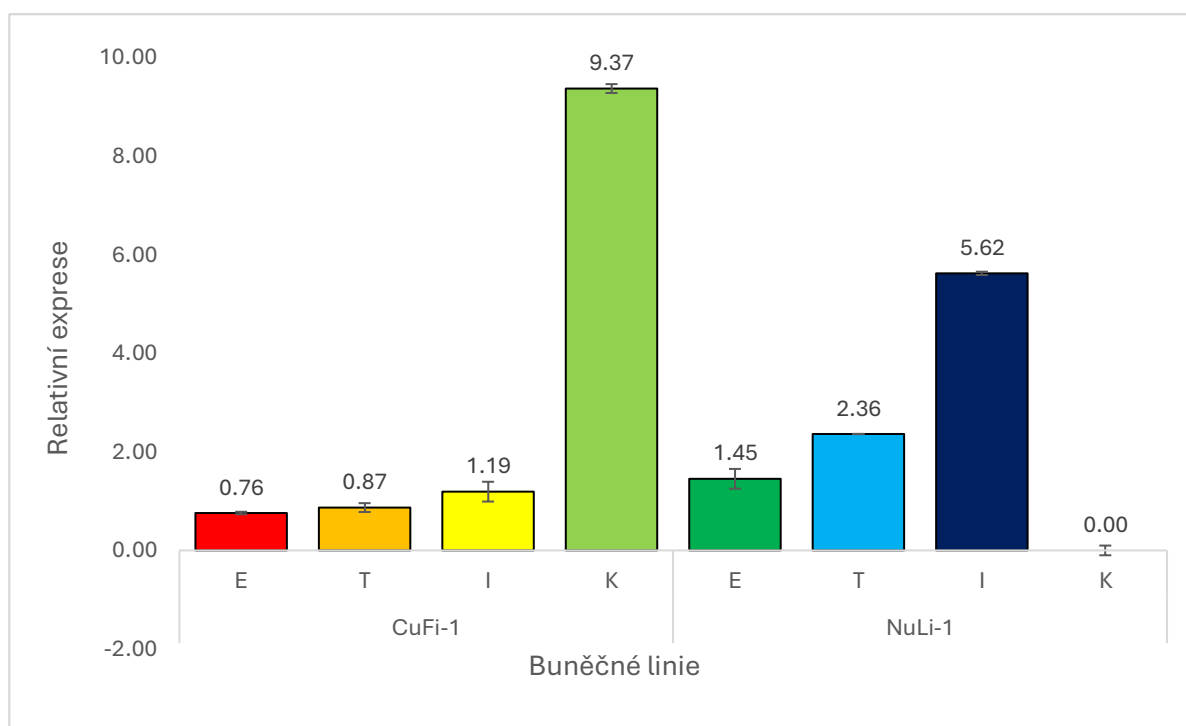
Obrázek č. 21 – **Relativní genová exprese APC pro buněčné linie inkubovány s modulátory 24 hodin.** Osa y relativní exprese vztažena k referenčnímu genu GAPDH. Osa x reprezentuje buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 inkubovány s danými modulátory (E – elexakaftor, T – tezakaftor, I – ivakaftor, K – bez modulátoru). Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze šesti měření.

V rámci exprese genu APC v buněčné linii NuLi-1 pozorujeme vyšší expresi tohoto genu (obrázek 21). V přítomnosti modulátorů elexakaftoru a tezakaftoru dochází ke zvýšení exprese, přičemž nejvyšší exprese je v přítomnosti tezakaftoru. V přítomnosti modulátoru ivakaftoru je exprese genu v buněčné linii NuLi-1 nižší. V případě exprese daného genu bez přítomnosti modulátoru je exprese u obou buněčných linií téměř nulová. V buněčné linii CuFi-1 vykazují modulátory elexakaftor a tezakaftor podstatně vyšší expresi než v přítomnosti modulátoru ivakaftoru. Expresse u buněčné linie CuFi-1 v přítomnosti modulátoru tezakaftor je vyšší než u ostatních modulátorů, avšak nižší než u buněčné linie NuLi-1.



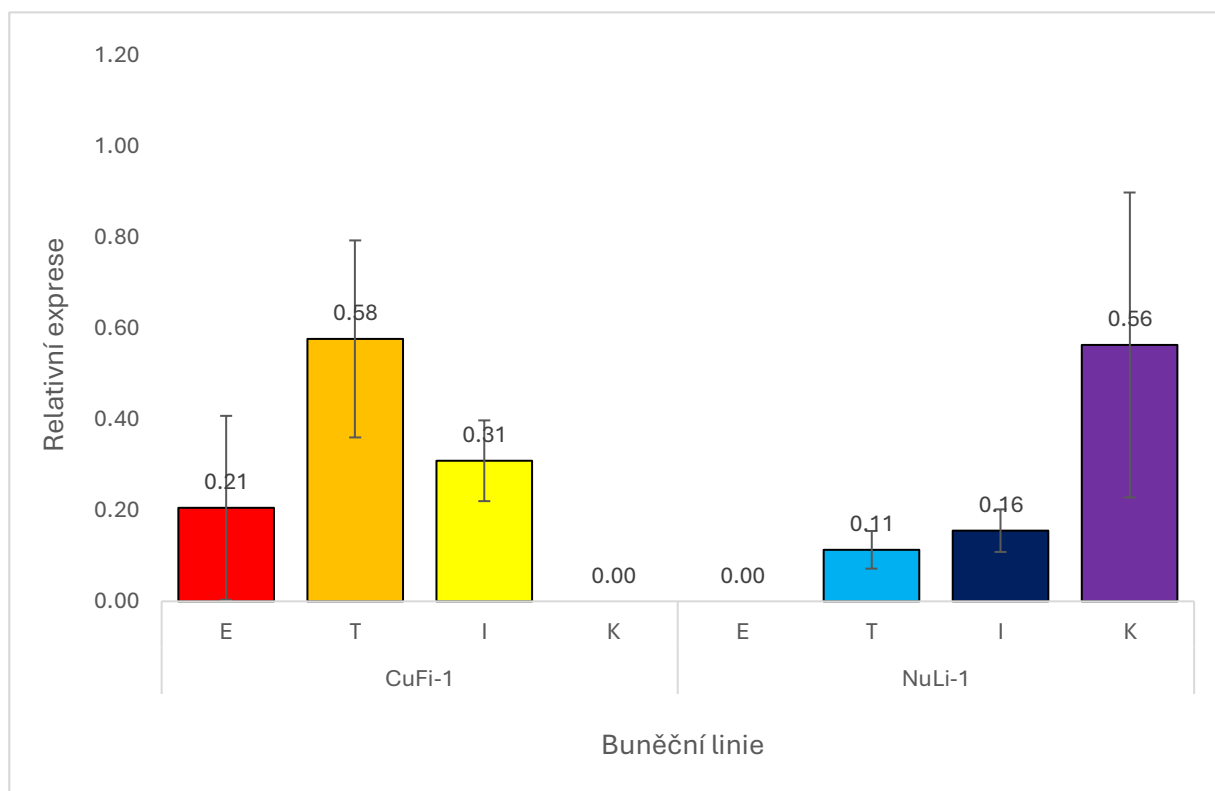
Obrázek č. 22 – **Relativní genová exprese NFkB pro buněčné linie inkubovány s modulátory 72 hodin.** Osa y relativní exprese vztažena k referenčnímu genu GAPDH. Osa x reprezentuje buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 inkubovány s danými modulátory (E – elexakaftor, T – tezakaftor, I – ivakaftor, K – bez modulátoru). Číselné hodnoty představují násobky změny exprese. Výsledná data představují průměry a směrodatné odchytky ze šesti měření.

V buněčné linii CuFi-1 byla zaznamenána vyšší exprese genu NFkB (obrázek 22). Exprese genu v přítomnosti modulátorů tezakaftor a ivakaftor je vyšší než v přítomnosti elexakaftoru, kde byla exprese velmi nízká. Bez přítomnosti modulátorů byla exprese genu u obou buněčných linií téměř nulová. U buněčné linie NuLi-1 pozorujeme nižší expresi genu NFkB oproti buněčné linii CuFi-1. Exprese genu v přítomnosti elexakaftoru je u buněčné linie CuFi-1 nulová, zatímco u modulátorů tezakaftor a ivakaftoru je pozorována exprese vyšší. Modulátory tezakaftor a ivakaftor dosahují u obou buněčných linií expresi genu NFkB téměř totožnou.



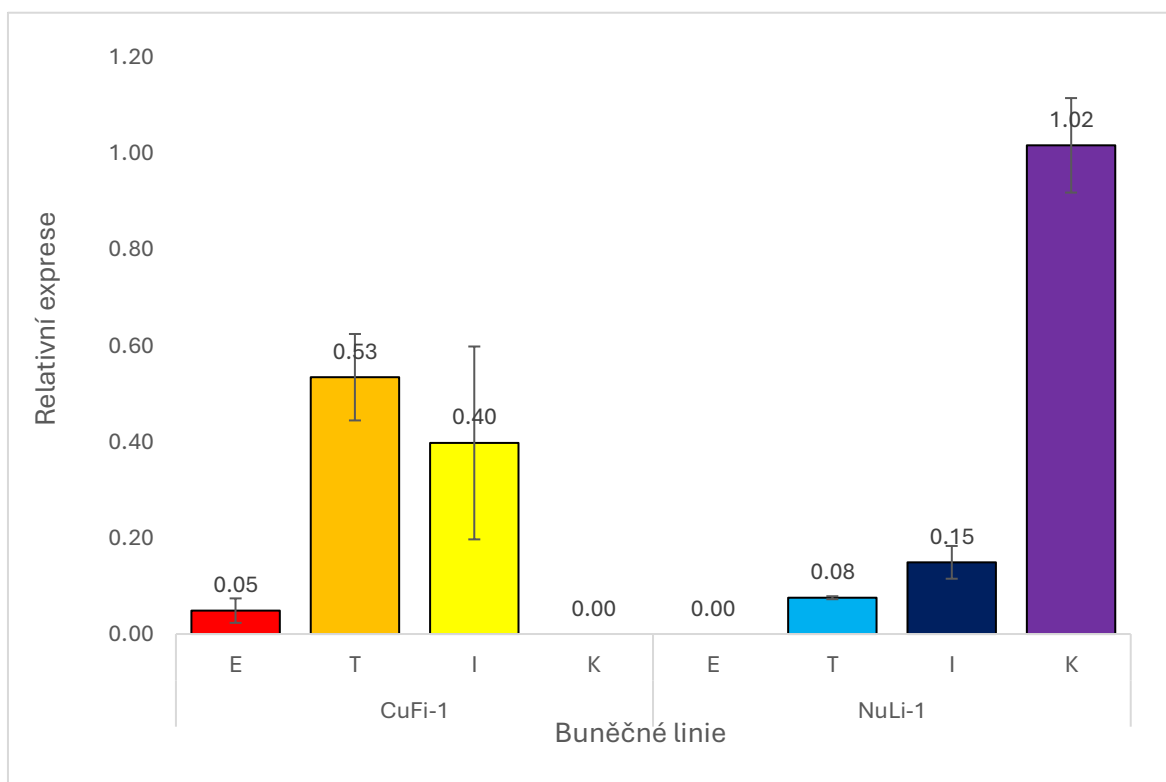
Obrázek č. 23 – **Relativní genová exprese CDH1 pro buněčné linie inkubovány s modulátory 72 hodin.** Osa x reprezentuje buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 inkubovány s danými modulátory (E – elexakaftor, T – tezakaftor, I – ivakaftor, K – bez modulátoru). Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze šesti měření.

V rámci exprese genu CDH1 v buněčné linii NuLi-1 v přítomnosti modulátorů pozorujeme vyšší expresi tohoto genu (obrázek 23). Vyšší exprese byla zaznamenána v buněčné linii CuFi-1 v přítomnosti modulátoru ivakaftoru. Všechny tři modulátory vykazují v buněčné linii NuLi-1 vyšší expresi daného genu než v linii CuFi-1. Bez přítomnosti modulátorů byla exprese genu nulová, oproti buněčné linii CuFi-1, kde je exprese genu dokonce vyšší než v buněčné linii NuLi-1 v přítomnosti modulátorů. V buněčné linii CuFi-1 v přítomnosti ivakaftor je exprese genu opět vyšší než v přítomnosti elexakaftoru či tezakaftoru.



Obrázek č. 24 – **Relativní genová exprese CBY1 pro buněčné linie inkubovány s modulátory 72 hodin.** Osa x reprezentuje buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 inkubovány s danými modulátory (E – elexakaftor, T – tezakaftor, I – ivakaftor, K – bez modulátoru). Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze šesti měření.

Vyšší exprese genu CBY1 byla zaznamenána u buněčné linie CuFi-1 (obrázek 24). V přítomnosti všech tří modulátorů elexakaftoru, tezakaftoru a ivakaftoru dochází ke zvýšení exprese, přičemž nejvyšší exprese je v přítomnosti tezakaftoru. V případě buněčné linie CuFi-1 je exprese daného genu bez přítomnosti modulátorů nulová. V buněčných liniích NuLi-1 bez přítomnosti modulátorů vykazuje nejvyšší expresi v rámci dané buněčné linie a srovnatelnou expresi s buněčnými liniemi CuFi-1 v přítomnosti modulátoru tezakaftor. U buněčné linie NuLi-1 v přítomnosti modulátorů tezakaftor a ivakaftor je pozorována vyšší exprese. V přítomnosti modulátorů elexakaftor zaznamenáváme expresi genu v buněčné linii NuLi-1 nulovou.

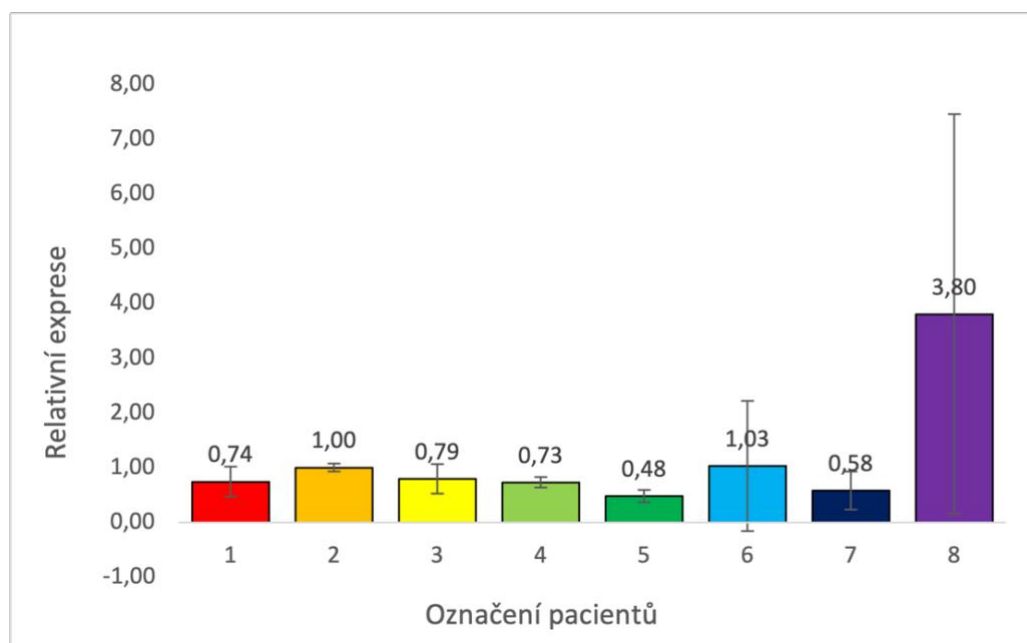


Obrázek č. 25 – **Relativní genová exprese APC pro buněčné linie inkubovány s modulátory 72 hodin.** Osa x reprezentuje buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 inkubovány s danými modulátory (E – elexakaftor, T – tezakaftor, I – ivakaftor, K – bez modulátoru). Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze šesti měření.

V rámci exprese genu APC v buněčné linii NuLi-1 pozorujeme vyšší expresi bez přítomnosti modulátorů (obrázek 25). Exprese genu je vyšší než v přítomnosti modulátorů a vyšší než v buněčných liniích CuFi-1. V přítomnosti modulátorů tezakaftoru a ivakaftoru je exprese vyšší, přičemž nejvyšší exprese je v přítomnosti ivakaftoru. Třetí testovaný modulátor elexakaftor nemá na hladinu exprese genu APC v buňkách NuLi-1 vliv. V případě buněčné linie CuFi-1 je exprese daného genu bez přítomnosti modulátorů nulová. V buněčné linii CuFi-1 v přítomnosti modulátorů je pozorována vyšší exprese. V přítomnosti tezakaftoru je zaznamenána vyšší exprese než u modulátoru ivakaftoru. V přítomnosti elexakaftoru pozorujeme nízkou expresi daného genu.

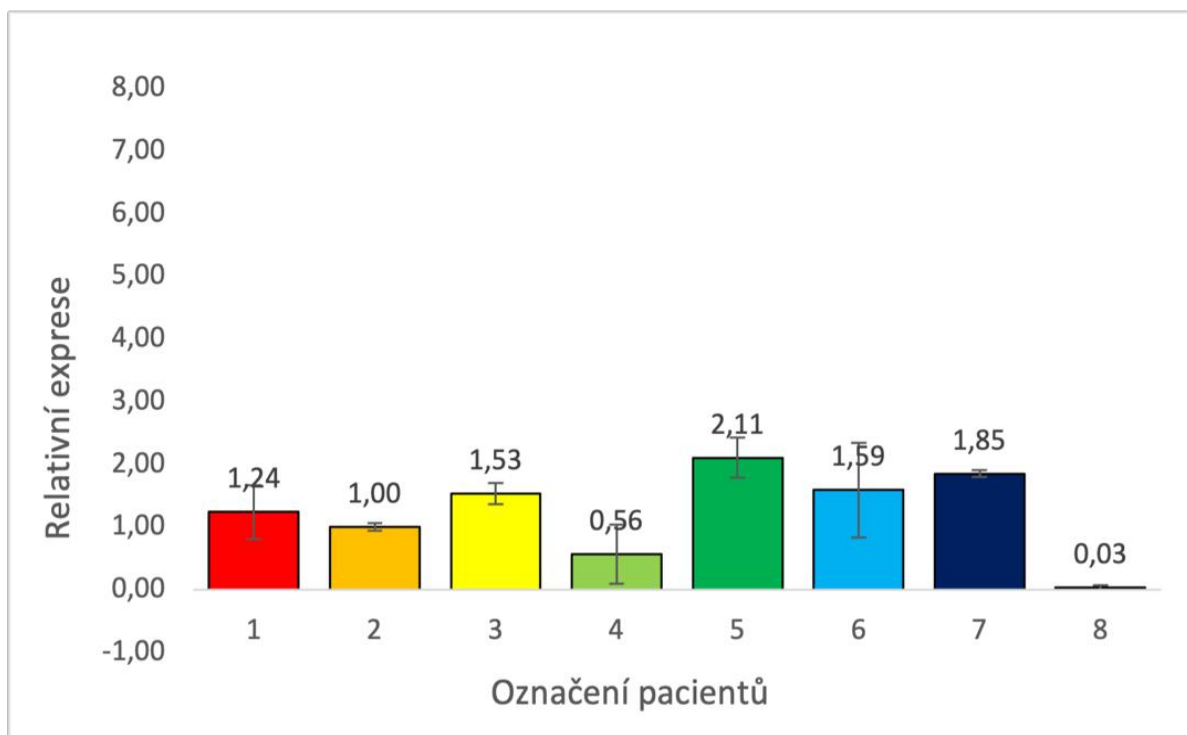
11.4 Exprese vybraných proteinů izolovaných z organoidů

Stanovení exprese jednotlivých genů probíhalo prostřednictvím metody PCR (viz 10.3.6.). Vzorky – organoidy byly izolované od pacientů trpící cystickou fibrózou. Každý pacient má určitou mutaci CFTR genu (viz tabulka 3). Vzorek 9 nebyl zahrnut do grafu, protože směrodatná odchylka naměřené hodnoty byla příliš vysoká, což zpochybňuje spolehlivost výsledku. Vzorek 10 nebyl interpretován, protože nebyla zaznamenána exprese referenčního genu, což znemožňuje spolehlivou normalizaci a následné vyhodnocení.



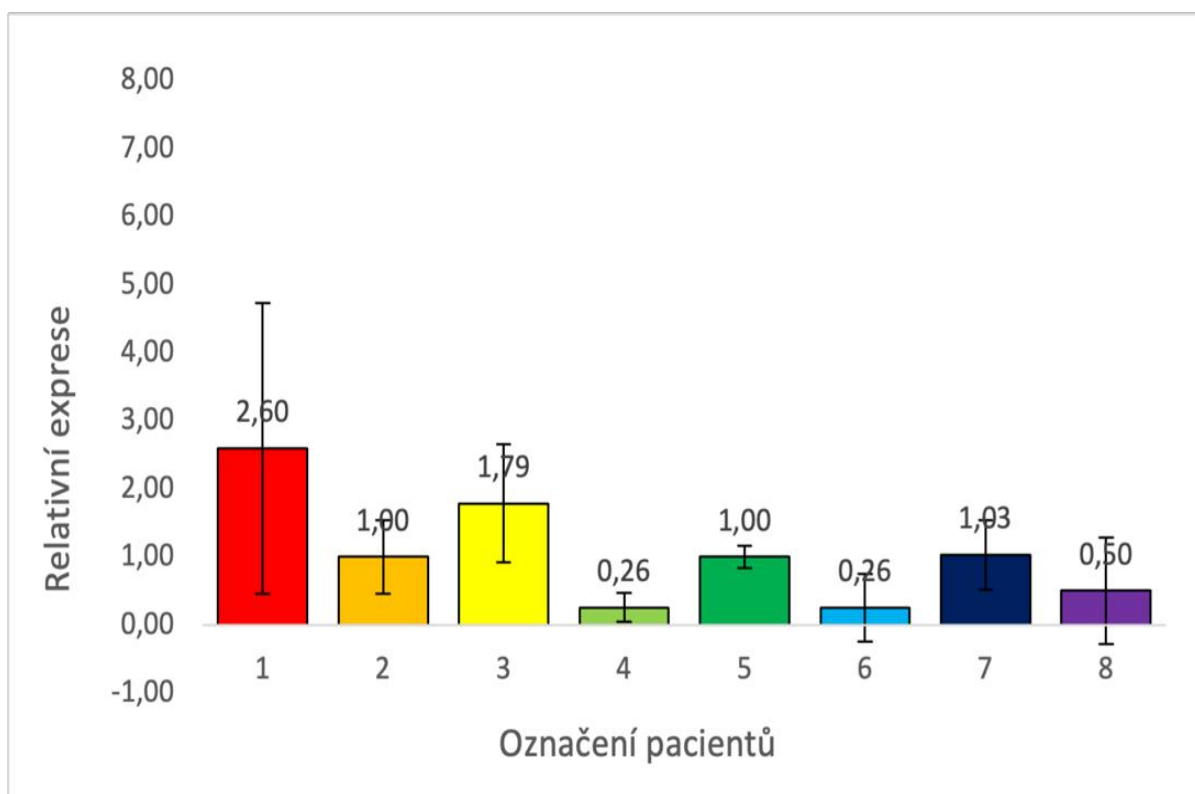
Obrázek č. 26 – **Relativní genová exprese NFkB mezi jednotlivými pacienty trpící cystickou fibrózou.** Osa y relativní exprese vztažena k referenčnímu genu GAPDH. Osa x reprezentuje pacienty (označené čísla 1–8). Číselné hodnoty představují násobky změny exprese. Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze dvou měření.

Nejvyšší exprese byla zaznamenána u pacienta 8 (hodnota 3,80) (obrázek 26), což naznačuje významnou aktivaci genu NfKB ve srovnání s ostatními pacienty. Hodnota je spojena s velkou variabilitou v důsledku chybové úsečky. Ostatní pacienti vykazovali relativně nízkou expresi, přičemž hodnoty se pohybovaly od 0,48 (pacient 5) po 1,03 (pacient 6). Nejnižší expresi vykazuje pacient 5, s hodnotou 0,48, což by mohlo indikovat sníženou aktivitu nebo regulaci genu v jeho případě. Směrodatná odchylka je zřetelně větší než u ostatních pacientů, což znamená, že u pacienta 8 existuje vyšší rozptýlení naměřených hodnot exprese. Tato variabilita mohla být způsobena technickými vlivy během měření (izolace RNA, reverzní transkripce, qPCR).



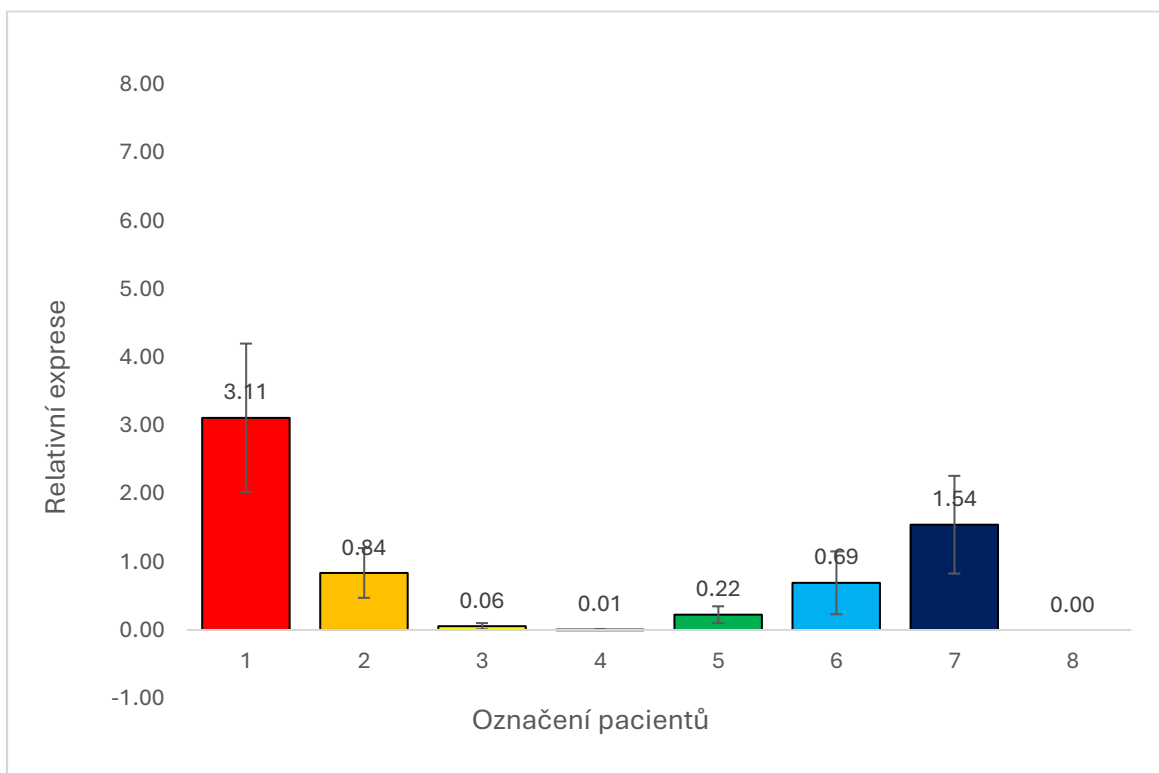
Obrázek č. 27 – **Relativní genová exprese CDH1 mezi jednotlivými pacienty trpící cystickou fibrózou.** Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze dvou měření.

Nejvyšší exprese byla zaznamenána u pacienta 5 (2,11) (obrázek 27), následována pacienty 7 (1,85), 6 (1,59), 3 (1,53) a 1 (1,24). Pacient 4 vykazuje výrazně nižší expresi (0,56), zatímco u pacienta 8 byla exprese téměř nulová (0,03), což může naznačovat minimální nebo zcela potlačenou expresi genu CDH1. Variabilita v expresi je zobrazena chybovými úsečkami, které indikují směrodatnou odchylku měření; u většiny pacientů je variabilita nízká, což svědčí o konzistenci měření. Výrazné rozdíly v expresi genu CDH1 mezi pacienty mohou být důsledkem rozdílného biologického stavu, například změn v adhezi buněk, což je klíčová funkce tohoto genu.



Obrázek č. 28 – **Relativní genová exprese CBY1 mezi jednotlivými pacienty trpící cystickou fibrózou.** Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze dvou měření.

Nejvyšší exprese byla zaznamenána u pacienta 1 (2,60) (obrázek 28), avšak s výraznou variabilitou, jak ukazují rozsáhlé chybové úsečky. Pacient 3 vykazuje zvýšenou expresi (1,79), následován pacienty 7 (1,03), 5 (1,00) a 8 (0,50). Výrazně nízké hodnoty exprese byly zaznamenány u pacientů 4 a 6 (shodně 0,26). Variabilita měření je relativně malá u většiny pacientů s výjimkou pacienta 1, kde odchylky naznačují možnou biologickou nebo technickou heterogenitu. Rozdíly v expresi genu CBY1 mezi pacienty mohou odrážet variace v regulaci tohoto genu, který je zapojen do signálních drah a kontroly buněčné polarity.



Obrázek č. 29 – **Relativní genová exprese APC mezi jednotlivými pacienty trpící cystickou fibrózou.** Výsledná data představují průměry a směrodatné odchylky ze dvou měření.

Nejvyšší exprese byla zaznamenána u pacienta 1 (3,11) (obrázek 29). Pacient 7 vykazuje zvýšenou expresi (1,54), následován pacienty 2 (0,84), 6 (0,69) a 5 (0,22). Výrazně nízké hodnoty exprese byly zaznamenány u pacientů 3 a 4. U pacienta 8 byla exprese nulová, což může naznačovat minimální nebo zcela potlačenou expresi genu APC.

12 Diskuze

V rámci diplomové práce byla studována genová exprese genů v buněčných liniích NuLi-1 a CuFi-1, kde byly pozorovány rozdíly nejen v jednotlivých genech, ale zároveň pozorujeme změny genové exprese mezi časy 24 hodin a 72 hodin. Vliv na změnu genové exprese mohou mít přítomné modulátory. U jednotlivých pacientů s různými mutacemi cftr také pozorujeme změny v genové expresi různých genů.

Při porovnání exprese genu NFκB mezi buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 pozorujeme minimální rozdíly bez přítomnosti modulátorů. Dráha NF-κB je důležitá, protože reguluje imunitní odpověď, zánětlivé procesy a buněčné přežití, což má klíčový význam pro ochranu proti infekcím a rakovinnému bujení. Působení modulátorů na buňky dochází ke zvýšení exprese genu oproti kontrole. Vyšší nárůst exprese vlivem modulátorů bylo zaznamenáno v buňkách CuFi-1. Při porovnání pozorujeme vyšší expresi genu NFκB v buněčné linii CuFi-1 v přítomnosti modulátorů elexakaftor a tezakaftor (obrázek 18), oproti nízké expresi v buněčné linii CuFi-1 v přítomnosti modulátoru ivakaftor a bez přítomnosti modulátoru a ve všech testovaných modulátorech u buněčné linie NuLi-1. To naznačuje rozdílnou odpověď těchto buněčných linií na jednotlivé modulátory.

Buněčné linie CuFi-1 reagují vyšší expresí v přítomnosti elexakaftoru a tezakaftoru, což může být užitečné v podmínkách, kde je potřebná aktivace imunitní odpovědi nebo zánětlivých procesů. Příliš vysoká exprese genu NFκB může být nebezpečná, protože narušuje rovnováhu mezi zánětem, buněčným růstem a apoptózou. Tato nerovnováha přispívá k chronickým zánětlivým onemocněním, autoimunitním reakcím, rakovině a tkáňovému poškození. Regulace exprese NFκB je proto klíčová pro udržení buněčné homeostázy a prevenci patologických stavů. Naopak v přítomnosti modulátoru ivakaftoru a bez přítomnosti modulátoru u buněčné linie CuFi-1 vedou k nižší expresi, což by mohlo být výhodné tam, kde je potřeba tlumit zánět. Na druhou stranu snížená exprese NF-κB může vést ke zhoršení imunitních reakcí, takže tělo je zranitelnější vůči infekcím a potenciálně se snižuje schopnost opravovat poškození tkání. Buněčná linie NuLi-1 vykazuje nižší expresi NFκB napříč všemi modulátory (elexakaftor, tezakaftor, ivakaftor) či bez přítomnosti modulátoru. Buňky NuLi-1 mohou přirozeně produkovat méně NFκB, což by mohlo být způsobeno odlišnou regulační sítí v těchto buňkách ve srovnání s CuFi-1 (Liu 2017, Yamamoto and Gaynor 2001, Xia 2014).

CBY1 reguluje vývoj a diferenciaci buněk, zejména v kontextu signálních drah, jako je Wnt, a její mutace jsou spojeny s různými vývojovými poruchami. Při porovnání exprese genu CBY1 mezi buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1, byly zjištěny pouze malé rozdíly v nepřítomnosti modulátorů. Aplikace modulátorů vedla ke zvýšení exprese tohoto genu ve srovnání s kontrolními buňkami. V buněčných liniích CuFi-1 pozorujeme vyšší expresi CBY1 oproti buněčné linii NuLi-1. Zároveň u obou linií zaznamenáváme zvýšení exprese

v přítomnosti modulátorů, zatímco bez přítomnosti modulátorů pozorujeme expresi sníženou, téměř nulovou.

Modulátory elexakaftor a tezakaftor mohou podporovat vyšší expresi genu CBY1 (obrázek 19), což naznačuje jejich potenciální schopnost zvyšovat regulaci Wnt/beta-katenin signalizace. To může být prospěšné pro normalizaci signalizace nebo ochranu buněk před maligními změnami. Deregulace dráhy Wnt přispívá k iniciaci a progresi lidských onemocnění včetně rakoviny. Naopak modulátor ivakaftor a bez přítomnosti modulátoru, které vedou k nižší expresi genu CBY1 u CuFi-1 i NuLi-1 buněk. To potlačuje Wnt/beta-katenin signalizaci, což může způsobovat nedostatečnou regulaci buněčného růstu a polarizace (Jung 2006, Gao 2014, Takemaru 2003).

Modulátory elexakaftor a tezakaftor lépe podporují expresi CBY1 ve stresovaném nebo patologickém prostředí CuFi-1 buněk (např. zánětlivém nebo s poškozenou signalizací). NuLi-1 buňky, které mají pravděpodobně lépe regulované základní dráhy, mohou být méně citlivé na modulátory elexakaftor a tezakaftor a mohou dokonce negativně reagovat na modulátory ivakaftor a bez přítomnosti modulátoru.

CDH1 je důležitá pro udržování buněčné adheze a tkáňové integrity. Při analýze exprese genu CDH1 mezi buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 byly zjištěny minimální rozdíly, které nebyly ovlivněny přítomností modulátorů. Po aplikaci modulátorů na buňky došlo k významnému zvýšení exprese tohoto genu ve srovnání s kontrolními vzorky. Nejvýraznější nárůst exprese byl pozorován v buňkách CuFi-1, které vykazaly silnější reakci na modulátory. V buněčné linii CuFi-1 je exprese genu CDH1 výrazně vyšší než u linie NuLi-1. U obou buněčných linií dochází ke zvýšení exprese v přítomnosti modulátorů, zatímco v jejich nepřítomnosti je exprese snížena, přibližně na nulovou hladinu.

U buněčných linií CuFi-1 s modulátory elexakaftor a tezakaftor je vyšší exprese genu CDH1 (obrázek 20), která pozitivně zlepšuje buněčnou stabilitu a adhezivní vlastnosti. To může znamenat, že modulátory elexakaftor a tezakaftor podporují ochranu buněk před ztrátou epiteliální integrity. Nižší exprese genu CDH1 u CuFi-1 v přítomnosti modulátorů ivakaftoru a bez přítomnosti modulátoru a u NuLi-1 v přítomnosti modulátorů elexakaftor, tezakaftor, ivakaftor a bez přítomnosti modulátoru může spustit epiteliálně-mezenchymální tranzici, což vede k buněčné migraci, invazi a potenciálně k malignímu chování buněk (Meigs 2002, Yang 2020). I když NuLi-1 linie reprezentují normální epiteliální buňky, snížená exprese CDH1 naznačuje, že modulátory (zejména ivakaftor a bez přítomnosti modulátoru) mohou negativně ovlivnit jejich stabilitu.

APC je klíčová pro regulaci buněčného cyklu a stabilitu genomu, a její mutace jsou spojeny s rakovinou. Při porovnání exprese genu APC mezi buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 byly zjištěny pouze minimální rozdíly v nepřítomnosti modulátorů. Po aplikaci modulátorů došlo k zvýšení exprese genu ve všech vzorcích ve srovnání s kontrolními buňkami. Při

porovnání buněčných linií je patrně vyšší exprese v ve srovnání s linií CuFi-1. Přítomnost modulátorů vede ke zvýšení exprese, zatímco bez jejich přítomnosti je exprese výrazně nižší.

Vyšší exprese APC (obrázek 21) u NuLi-1 buněk v přítomnosti modulátorů elexakaftor a tezakaftor představuje pozitivní vliv na stabilitu buněk a ochranu před nádorovými změnami, zatímco snížená exprese APC u CuFi-1 a NuLi-1 buněk v přítomnosti modulátorů ivakaftoru a bez přítomnosti modulátoru, může znamenat negativní dopad na buněčnou stabilitu a zvýšení rizika neoplastických změn. U CuFi-1 buněk, které mají již zasaženou homeostázu a zánětlivé prostředí (např. v důsledku cystická fibróza), může tento efekt zhoršovat jejich proliferaci nebo invazivitu, což by mohlo vést k zvýšené riziku rakovinných transformací. U NuLi buněk, které představují normální epiteliální buňky, by snížená exprese APC mohla narušit normální regulační mechanismy a vyvolat abnormality v buněčné funkci (Lesko 2015, Peifer 1993, Powell 2010, Roose 1999).

Při porovnání exprese genu NFkB mezi buněčnými liniemi inkubovanými po dobu 24 a 72 hodin lze pozorovat, že exprese roste u linií CuFi-1 v přítomnosti modulátoru ivakaftor a v buněčných linií NuLi-1 v přítomnosti tezakaftor a ivakaftor, zatímco klesá u linií CuFi-1 v přítomnosti modulátorů elexakaftoru, tezakaftoru a bez přítomnosti modulátoru a buněčné linie NuLi-1 v přítomnosti modulátoru elexakaftoru a bez přítomnosti modulátoru. U genu CBY1 byl zaznamenán s časem nárůst exprese u linií CuFi-1 v přítomnosti všech tří modulátorů a v buněčných linií NuLi-1 v přítomnosti modulátoru tezakaftoru, ivakaftoru a bez přítomnosti modulátoru, naopak pokles exprese byl pozorován u linií CuFi-1 bez přítomnosti modulátoru a linií NuLi-1 v přítomnosti modulátoru elexakaftor. Exprese genu CDH1 se v průběhu času zvyšuje u linií CuFi-1 v přítomnosti ivakaftoru a bez přítomnosti modulátoru a linií NuLi-1 v přítomnosti elexakaftor a ivakaftor, zatímco snižuje u linií CuFi-1 v přítomnosti elexakaftoru a tezakaftoru a linií NuLi-1 v přítomnosti modulátoru tezakaftoru. V případě genu APC bylo patrné, že exprese roste u linií CuFi-1 v přítomnosti modulátoru tezakaftoru a ivakaftoru a linií NuLi-1 v přítomnosti modulátoru ivakaftoru a bez přítomnosti modulátoru, zatímco pokles byl zaznamenán u linií CuFi-1 v přítomnosti elexakaftoru a bez přítomnosti a linií NuLi-1 v přítomnosti elexakaftoru a tezakaftoru.

Modulátor Ivakaftor zjevně podporuje zvýšení exprese genů v některých buněčných liniích, což může být příznivé, pokud cíleně aktivuje supresorové nebo regulační geny (např. APC, CDH1). Zvýšení exprese genu NFkB vlivem modulátoru Ivakaftoru může naznačovat zlepšenou schopnost buňky reagovat na stresové nebo zánětlivé podněty, avšak nadměrná aktivace NFkB může vést k patologickým stavům, jako je zánět nebo zvýšené riziko proliferace nádorových buněk.

Modulátor tezakaftor (NuLi-1, CuFi-1) má smíšený efekt, protože u některých genů a linií podporuje růst exprese (například NFkB a CBY1 u NuLi-1 v přítomnosti modulátoru tezakaftoru), ale v jiných případech dochází k poklesu (např. CDH1 a APC u NuLi-1). Jeho účinek je tedy závislý na kontextu a typu genu. Modulátor elexakaftor (CuFi-1, NuLi-1)

vykazuje převážně pokles exprese, například u genů NFκB, CBY1, CDH1 i APC v liniích NuLi-1 a CuFi-1 v přítomnosti modulátoru elexakaftoru. To naznačuje, že modulátor elexacaftor nemá výrazný stimulační vliv na sledované geny. Kontrola (CuFi-1, NuLi-1) vykazuje většinou pokles exprese genů, s výjimkou genu CBY1, kde u NuLi-1 došlo k nárůstu. Tento modulátor tedy nemá konzistentní pozitivní vliv.

Rozdíly v expresi genů mezi jednotlivými pacienty mohou být způsobeny různými faktory, které souvisejí s typem mutace genu CFTR, jejím vlivem na funkci CFTR proteinu, následným ovlivněním intracelulárních signálních drah a mikroprostředím organoidů. Mutace CFTR ovlivňují správné složení, transport a funkci CFTR proteinu různou měrou.

Pacient 8 s mutací F508del, která je spojena s úplnou ztrátou funkčního CFTR proteinu, vykazuje nejvyšší expresi NF-κB (obrázek 26). Mutace F508del způsobuje selhání transportu chloridových iontů a dysfunkci iontové homeostázy. To vede k hromadění hlenu v epitelu, kolonizaci patogeny a nekontrolovatelné aktivaci NF-κB, což se projeví zvýšenou expresí.

Pacienti 1-7 s ostatními mutacemi vykazují střední úroveň exprese NF-κB, přičemž jejich hodnoty se pohybují okolo 1. Mutace jako 2789+5G>A a D1152H ponechávají určitý stupeň funkčnosti CFTR proteinu. I když to není dostatečné k úplné regulaci zánětu, zánětlivá aktivace NF-κB je méně intenzivní než u pacienta 8. Heterozygotní mutace jako G542X/L000del nebo G542X/E1104K kombinují částečně funkční a závažnější mutace. To způsobuje střední zánětlivou aktivaci. Mutace jako D1152H a N1303K jsou spojeny s částečnou ztrátou funkce CFTR, což zajišťuje mírnější dopad na aktivaci NF-κB ve srovnání s úplnou ztrátou proteinu (Fanen 2014).

Pacienti 5, 6 a 7 (obrázek 27) s mutacemi jako G542X/L000del, 2789+5G>A/3659delC a G542X/E1104K vykazují zvýšenou expresi CDH1 (okolo 2). U těchto pacientů mohou buňky zvyšovat expresi CDH1 jako odpověď na částečné narušení CFTR funkce. Zvýšení CDH1 může být strategií k udržení epitelové integrity v přítomnosti částečně funkčního CFTR proteinu. Pacienti s těmito mutacemi mohou mít nižší aktivaci zánětlivých drah ve srovnání s pacienty s těžšími mutacemi, což podporuje zvýšenou expresi CDH1 (Fanen 2014, Meigs 2002, Yang 2020).

Pacienti 1, 2 a 3 s mutacemi jako 2789+5G>A/3659delC, G542X/L000del a D1152H vykazují střední expresi CDH1 (okolo 1,5). Tyto mutace zajišťují určitý stupeň funkčnosti CFTR proteinu, což podporuje udržení relativně stabilní struktury epitelu a střední expresi CDH1. Pacient 4 s mutací N1303K vykazuje nízkou expresi CDH1. N1303K je mutace v ATP doméně CFTR, která výrazně narušuje funkci proteinu. To může vést k narušení iontové homeostázy a epitelové integrity, což snižuje expresi E-kadherinu. Nízká exprese CDH1 může být také důsledkem poklesu buněčné adheze a narušení integrity epitelu v organoidu (Fanen 2014, Meigs 2002, Yang 2020).

Pacient 8 s mutací F508del, která způsobuje úplnou ztrátu funkčního CFTR proteinu, vykazuje téměř nulovou expresi CDH1. Ztráta CFTR proteinu vede k narušení iontové homeostázy a zvýšení zánětlivého stavu, což výrazně potlačuje expresi CDH1 (Fanen 2014, Middleton 2019, Meigs 2002, Yang 2020).

Pacienti 1 a 3 (obrázek 28) s mutacemi 2789+5G>A/3659delC a D1152H vykazují zvýšenou expresi CBY1 (okolo 2). Mutace 2789+5G>A a D1152H jsou relativně mírné a ponechávají určitou zbytkovou funkci CFTR. To může vést k menšímu narušení epitelové polariry a integrity, což podporuje zvýšenou expresi CBY1 jako kompenzačního mechanismu. CBY1 hraje roli při stabilizaci epitelové polariry a inhibici nadměrné aktivace Wnt/ β -catenin dráhy. Zvýšená exprese může být snahou kompenzovat mírnou destabilizaci epitelu a zamezit dalšímu narušení homeostázy (Fanen 2014).

Pacienti 1, 5 a 7 s mutacemi G542X/L000del, N1303K a G542X/E1104K vykazují střední expresi CBY1 (okolo 1). Kombinace mutací jako G542X/L000del ponechává částečnou funkčnost CFTR, což způsobuje mírné narušení epitelové polariry. Tato úroveň dysfunkce se odráží ve střední expresi CBY1. Pacienti 4 a 6 s mutacemi N1303K, 2789+5G>A/3659delC, a G542X/E1104K vykazují nízkou expresi CBY1 (okolo 0,5). Mutace N1303K a kombinace G542X/E1104K jsou spojeny s větším funkčním deficitem CFTR, což může vést k destabilizaci epitelu a snížení exprese genů zapojených do udržování polariry. Nízká exprese CBY1 může být důsledkem aktivace zánětlivých drah a oxidačního stresu, které negativně ovlivňují transkripci genů důležitých pro buněčnou polaritu (Fanen 2014, Jung 2006, Gao 2014, Takemaru).

Pacient 8 s mutací F508del vykazuje pravděpodobně ještě nižší expresi CBY1 (téměř nulovou), což odpovídá extrémnímu narušení CFTR funkcí. Ztráta CFTR způsobuje zhoršenou iontovou homeostázu, což vede k destabilizaci epitelu a minimální expresi genů spojených s polaritou (Fanen 2014).

Pacient 8 s mutací F508del vede k nulové funkci CFTR a je spojena s absencí exprese APC. Absence CFTR proteinu může narušit signalizaci Wnt/beta-katenin, která je částečně regulována APC, což může vysvětlovat jeho úplnou absenci. U pacientů 1, 2, 6, 7 (různé mutace s částečně zachovanou funkcí CFTR) pozorujeme zvýšenou expresi APC jako adaptivní odpověď buněk na částečně narušenou funkci CFTR (Fanen 2014, Lesko 2015, Peifer 1993, Powell 2010, Roose 1999).

Zvýšená exprese APC může být také důsledkem zánětlivé odpovědi v organoidech. CFTR je klíčový pro regulaci zánětu (např. přes NF- κ B dráhu). Mutace, které zcela inaktivují CFTR (např. G542X v homozygotním stavu), mohou vést k silné aktivaci zánětlivých drah, což může inhibovat APC, jak je patrné u pacientů 3, 4 a 5. Nízko funkční nebo nefunkční CFTR (např.

D1152H, N1303K, homozygotní G542X) může způsobit silnější zánětlivou odpověď, která snižuje expresi APC prostřednictvím cytokiny indukovaných změn (Fanen 2014).

13 Závěr

Hlavním záměrem v této diplomové práci bylo porovnat expresi jednotlivých genů v epiteliálních buňkách plic (buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1) a organoidech, za účelem analyzovat predispozice rakoviny. Byly pozorovány rozdíly v expresi genů v buněčných liniích v přítomnosti modulátorů či bez přítomnosti modulátoru. Rozdíly jsme se pokusili vysvětlit prostřednictvím relativní genové exprese pomocí qPCR.

Získané výsledky ukazují, že modulátory výrazně ovlivňují expresi klíčových genů, což se liší nejen mezi buněčnými liniemi CuFi a NuLi, ale i mezi jednotlivými geny. Modulátory elexakaftor a tezakaftor u buněk CuFi stimulovaly zvýšenou expresi NF- κ B, což naznačuje jejich schopnost aktivovat zánětlivé dráhy, zatímco modulátor ivakaftor a bez přítomnosti modulátoru měly spíše supresivní vliv. Naopak u buněk NuLi byla exprese NF- κ B nižší napříč všemi modulátory, což může být důsledkem jejich odlišné regulační sítě. Podobně modulátory elexakaftor a tezakaftor vedly k vyšší expresi genů CBY1 a CDH1 u CuFi buněk, zatímco modulátor ivakaftor a bez přítomnosti modulátoru měly spíše negativní efekt.

Rozdíly v expresi genů, jako jsou CBY1, CDH1 a APC, ukazují na důležitost modulátorů pro regulaci epitelové polarity, buněčné adheze a stability. Zvýšená exprese APC u NuLi buněk s modulátory elexakaftor a tezakaftor podtrhuje jejich pozitivní roli v ochraně před maligními změnami, zatímco snížená exprese APC a dalších genů u CuFi s modulátory ivakaftor a bez přítomnosti modulátorů může zhoršovat patologické procesy. Tato zjištění zdůrazňují, že účinnost modulátorů závisí na typu buněčné linie, přičemž modulátory elexakaftor a tezakaftor mají v mnoha případech větší terapeutický potenciál.

Analýza rozdílů v expresi genů mezi pacienty s různými mutacemi CFTR ukázala, že závažnost dopadu na genovou expresi úzce souvisí s mírou ztráty funkce CFTR proteinu. Pacienti s mutací F508del, která zcela eliminuje funkci CFTR, vykazují nejvyšší aktivaci zánětlivých drah (NF- κ B) a výrazný pokles exprese genů spojených s epitelovou polaritou (CBY1), adhezí (CDH1) a regulací Wnt/ β -catenin dráhy (APC). Pacienti s částečně funkčním CFTR (např. mutace D1152H nebo 2789+5G>A) vykazují mírnější zánětlivou aktivaci a adaptivní zvýšení exprese genů CBY1 a APC.

Výsledky rovněž zdůrazňují rozdíly v odpovědi buněk na různé mutace, přičemž mutace s reziduální funkcí CFTR umožňují lepší regulaci zánětlivých a epitelových drah. Těžší mutace, jako homozygotní G542X nebo N1303K, vedou k vyšší zánětlivé zátěži a výraznějšímu narušení epitelové stability, zatímco mírnější mutace vykazují stabilnější expresní profil. Zachování i minimální funkce CFTR proteinu se ukazuje jako klíčové pro omezení patologických změn, což podtrhuje význam personalizovaného přístupu v terapii cystické fibrózy zaměřené na konkrétní typ mutace a její důsledky na buněčnou funkci.

Zdroje

Bode, S.F.N., Rapp, H., Lienert, N., Appel, H., Fabricius, D., 2023. *Effects of CFTR-modulator triple therapy on sinunasal symptoms in children and adults with cystic fibrosis*. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 280, 3271–3277.

Castellani, C., Assael, B.M., 2017. *Cystic fibrosis: a clinical view*. Cell. Mol. Life Sci. 74, 129–140.

CFTR Modulator Therapies | *Cystic Fibrosis Foundation* [WWW Document], n.d. URL <https://www.cff.org/managing-cf/cftr-modulator-therapies>.

Chen, Q., Shen, Y., Zheng, J., 2021. *A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects*. Anim. Models Exp. Med. 4, 220–232.

ČR, Ú., n.d. *Zhoubné nádory: diagnóza a prognóza* [WWW Document]. NZIP.cz. URL <https://www.nzip.cz/clanek/1165-zhoubne-nadory-diagnoza-a-prognoza>.

Čoupková, H. 2024. *Karcinom plic*. Masarykův onkologický ústav. https://static.mou.cz/d/mou.cz/files/4357.pdf/s-c434f6ba951f?_ts=1715085597

Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis [WWW Document], n.d. URL <https://medilib.ir/uptodate/show/6367>.

Dave, K., Dobra, R., Scott, S., Saunders, C., Matthews, J., Simmonds, N.J., Davies, J.C., 2021. *Entering the era of highly effective modulator therapies*. Pediatr. Pulmonol. 56, S79–S89.

Davies, J.C., Turner, M.W., Klein, N., London MBL CF Study Group, 2004. *Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles*. Eur. Respir. J. 24, 798–804.

Daele, S.V., 2006. *Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and Achromobacter xylosoxidans in Belgian cystic fibrosis patients, relying on molecular typing techniques*. Ghent University

Dickinson, K.M., Collaco, J.M., 2021. *Cystic Fibrosis*. Pediatr. Rev. 42, 55–67.

[Elexacaftor | C26H34F3N7O4S | CID 134587348 - PubChem \(nih.gov\)](#)

Fanen, P., Wohlhuter-Haddad, A., Hinzpeter, A., 2014. *Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies*. Int. J. Biochem. Cell Biol., Cystic Fibrosis: From o-mics to cell biology, physiology, and therapeutic advances 52, 94–102.

Fink, A.K., Yanik, E.L., Marshall, B.C., Wilschanski, M., Lynch, C.F., Austin, A.A., Copeland, G., Safaeian, M., Engels, E.A., 2017. *Cancer risk among lung transplant recipients with cystic*

fibrosis. J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc. 16, 91–97.

Freedman Steven D., Blanco Paola G., Zaman Munir M., Shea Julie C., Ollero Mario, Hopper Isabel K., Weed Deborah A., Gelrud Andres, Regan Meredith M., Laposata Michael, Alvarez Juan G., O’Sullivan Brian P., 2004. *Association of Cystic Fibrosis with Abnormalities in Fatty Acid Metabolism*. N. Engl. J. Med. 350, 560–569.

Garibyan, L., Avashia, N., 2013. *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*. J. Invest. Dermatol. 133, e6.

Garred, P., Pressler, T., Lanng, S., Madsen, H.O., Moser, C., Laursen, I., Balstrup, F., Koch, Claus, Koch, Christian, 2002. *Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease*. Pediatr. Pulmonol. 33, 201–207.

Gao, C., Xiao, G., Hu, J., 2014. *Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications*. Cell Biosci. 4, 13.

Green, M.R., Sambrook, J., 2012. *Agarose Gel Electrophoresis*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition. 94

Hassanpour, S.H., Dehghani, M., 2017. *Review of cancer from perspective of molecular*. J. Cancer Res. Pract. 4, 127–129.

Holubec L. 2004. *kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. Praha. Grada, 175 s. ISBN 80-247-0636-9.

Idowu, P.A., Idowu, A.P., Zishiri, O.T., Mpfu, T.J., Veldhuizen, E.J.A., Nephawe, K.A., Mtileni, B., 2021. *Activity of Mannose-Binding Lectin on Bacterial-Infected Chickens—A Review*. Animals 11, 787.

[Ivacaftor | C24H28N2O3 | CID 16220172 - PubChem \(nih.gov\)](#)

Jung, Y., Bang, S., Choi, K., Kim, E., Kim, Y., Kim, J., Park, J., Koo, H., Moon, R.T., Song, K., Lee, I., 2006. *TC1 (C8orf4) enhances the Wnt/beta-catenin pathway by relieving antagonistic activity of Chibby*. Cancer Res. 66, 723–728.

Kilpatrick, D.C., 2002. *Mannan-binding lectin and its role in innate immunity*. Transfus. Med. 12, 335–352.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. *The real-time polymerase chain reaction*. Mol. Aspects Med. 27, 95–125.

Labianca, R., Beretta, G.D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M.A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F., Wils, J., 2010. *Colon cancer*. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 74, 106–133.

Lesko, A.C., Goss, K.H., Yang, F.F., Schwertner, A., Hukur, I., Onel, K., Prosperi, J.R., 2015. *The APC tumor suppressor is required for epithelial cell polarization and three-dimensional morphogenesis*. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1853, 711–723.

Liu, K., Zhang, X., Zhang, J.T., Tsang, L.L., Jiang, X., Chan, H.C., 2016. *Defective CFTR- β -catenin interaction promotes NF- κ B nuclear translocation and intestinal inflammation in cystic fibrosis*. Oncotarget 7, 64030–64042.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. *NF- κ B signaling in inflammation*. Signal Transduct. Target. Ther. 2, 1–9.

[Lmacaftor | C24H18F2N2O5 | CID 16678941 - PubChem \(nih.gov\)](#)

Mackiewicz, A., Kushner, I., Baumann, H., 1993. *Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry, and clinical applications*. CRC Press, Boca Raton.

Mahadeva, R., Sharples, L., Ross-Russell, R.I., Webb, A.K., Bilton, D., Lomas, D.A., 2001. *Association of alpha(1)-antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis*. Thorax 56, 53–58.

Maisonneuve, P., Marshall, B.C., Knapp, E.A., Lowenfels, A.B., 2013. *Cancer risk in cystic fibrosis: a 20-year nationwide study from the United States*. J. Natl. Cancer Inst. 105, 122–129.

Májek, O., Koziar Vašáková, M., Čierna Peterová, I., Mírka, H., Koudelková, M., Ngo, O., Gregor, J., Dušek, L., Hejduk, K.: *PrevenceProPlice.cz – Program časného záchytu karcinomu plic* [online]. 2022. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.

Mannan-Binding Lectin - an overview | ScienceDirect Topics [WWW Document], n.d. URL <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/mannan-binding-lectin>.

Markowitz, S.D., Dawson, D.M., Willis, J., Willson, J.K.V., 2002. *Focus on colon cancer*. Cancer Cell 1, 233–236.

Meigs, T.E., Fedor-Chaikin, M., Kaplan, D.D., Brackenbury, R., Casey, P.J., 2002. *Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin*. J. Biol. Chem. 277, 24594–24600.

Middleton, P.G., Mall, M.A., Dřevínek, P., Lands, L.C., McKone, E.F., Polineni, D., Ramsey, B.W., Taylor-Cousar, J.L., Tullis, E., Vermeulen, F., Marigowda, G., McKee, C.M., Moskowitz, S.M., Nair, N., Savage, J., Simard, C., Tian, S., Waltz, D., Xuan, F., Rowe, S.M., Jain, R., 2019. *Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del*

Allele. N. Engl. J. Med. 381, 1809–1819.

Miller, York E. „*Pathogenesis of Lung Cancer*”. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33, č. 3 (září 2005): 216–23.

Minna, J.D., Roth, J.A., Gazdar, A.F., 2002. *Focus on lung cancer*. *Cancer Cell* 1, 49–52.

Ng, M.Y., Flight, W., Smith, E., 2014. *Pulmonary complications of cystic fibrosis*. *Clin. Radiol.* 69, e153–e162.

Ng, T.F.F., Kondov, N.O., Deng, X., Van Eenennaam, A., Neibergs, H.L., Delwart, E., 2015. *A Metagenomics and Case-Control Study To Identify Viruses Associated with Bovine Respiratory Disease*. *J. Virol.* 89, 5340–5349.

Nichols, D.P., Donaldson, S.H., Frederick, C.A., Freedman, S.D., Gelfond, D., Hoffman, L.R., Kelly, A., Narkewicz, M.R., Pittman, J.E., Ratjen, F., Sagel, S.D., Rosenfeld, M., Schwarzenberg, S.J., Singh, P.K., Solomon, G.M., Stalvey, M.S., Kirby, S., VanDalfsen, J.M., Clancy, J.P., Rowe, S.M., 2021. *PROMISE: Working with the CF community to understand emerging clinical and research needs for those treated with highly effective CFTR modulator therapy*. *J. Cyst. Fibros.* 20, 205–212.

Nooreldeen, R., Bach, H., 2021. *Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis*. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8661.

Norman, D., Elborn, J.S., Cordon, S.M., Rayner, R.J., Wiseman, M.S., Hiller, E.J., Shale, D.J., 1991. *Plasma tumour necrosis factor alpha in cystic fibrosis*. *Thorax* 46, 91–95.

Parisi, G.F., Papale, M., Pecora, G., Rotolo, N., Manti, S., Russo, G., Leonardi, S., 2023. *Cystic Fibrosis and Cancer: Unraveling the Complex Role of CFTR Gene in Cancer Susceptibility*. *Cancers* 15, 4244.

Park, K.-S., Liang, M.-C., Raiser, D.M., Zamponi, R., Roach, R.R., Curtis, S.J., Walton, Z., Schaffer, B.E., Roake, C.M., Zmoos, A.-F., Kriegel, C., Wong, K.-K., Sage, J., Kim, C.F., 2011. *Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer*. *Cell Cycle* 10, 2806–2815.

Patschull, A.O.M., Segu, L., Nyon, M.P., Lomas, D.A., Nobeli, I., Barrett, T.E., Gooptu, B., 2011. *Therapeutic target-site variability in $\alpha 1$ -antitrypsin characterized at high resolution*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 1492–1497.

Pérez-Frías, J., Ruiz, E.P., Castillo, M. del C.L., García, P.C., Pérez-Frías, J., Ruiz, E.P., Castillo, M. del C.L., García, P.C., 2019. *The History of Cystic Fibrosis*. *Open J. Pediatr. Child Health* 4, 001–006.

Peifer, M., 1993. *Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection*. *Science* 262: 1667-1668.

Powell, A.E., Shung, C.-Y., Saylor, K.W., Müllendorf, K.A., Weiss, J.B., Wong, M.H., 2010. *Lessons from development: A role for asymmetric stem cell division in cancer*. Stem Cell Res. 4, 3–9.

Priyashantha, A.K.H., Umashankar, S., 2021. *Separation of DNA Fragments using Agarose Gel Electrophoresis*; Protocol, Results, Principle and Possible Errors to Avoid. p. 145.

Reed, C., Fu, Z.Q., Wu, J., Xue, Y.N., Harrison, R.W., Chen, M.J., Weber, I.T., 1997. *Crystal structure of TNF- α mutant R31D with greater affinity for receptor R1 compared with R2*. Protein Eng. Des. Sel. 10, 1101–1107.

Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., Clevers, H., 1999. *Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1*. Science 285: 1923-1926.

Schabath, M.B., Cote, M.L., 2019. *Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 28, 1563–1579.

Shmarina, G.V., Pukhalsky, A.L., Kokarovtseva, S.N., Pukhalskaya, D.A., Shabalova, L.A., Kapranov, N.I., Kashirskaja, N.J., 2001. *Tumor necrosis factor- α /interleukin-10 balance in normal and cystic fibrosis children*. Mediators Inflamm. 10, 234390.

Skalická, Mud.V., n.d. *Terapeutické trendy cystické fibrózy*.

Southern, K.W., Castellani, C., Lammertyn, E., Smyth, A., VanDevanter, D., van Koningsbruggen-Rietschel, S., Barben, J., Bevan, A., Brokaar, E., Collins, S., Connett, G.J., Daniels, T.W.V., Davies, J., Declercq, D., Gartner, S., Gramegna, A., Hamilton, N., Hauser, J., Kashirskaya, N., Kessler, L., Lowdon, J., Makukh, H., Martin, C., Morrison, L., Nazareth, D., Noordhoek, J., O'Neill, C., Owen, E., Oxley, H., Raraigh, K.S., Raynal, C., Robinson, K., Roehmel, J., Schwarz, C., Sermet, I., Shteinberg, M., Sinha, I., Takawira, C., van Mourik, P., Verkleij, M., Waller, M.D., Duff, A., 2023. *Standards of care for CFTR variant-specific therapy (including modulators) for people with cystic fibrosis*. J. Cyst. Fibros. 22, 17–30.

Steen, B.M., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2011. 12 - *The Role of the Immune System in Fracture Healing*, in: Lorenzo, J., Choi, Y., Horowitz, M., Takayanagi, H. (Eds.), Osteoimmunology. Academic Press, San Diego, pp. 343–367.

Strandvik, B., Gronowitz, E., Enlund, F., Martinsson, T., Wahlström, J., 2001. *Essential fatty acid deficiency in relation to genotype in patients with cystic fibrosis*. J. Pediatr. 139, 650–655.

Strandvik, Birgitta. „*Fatty Acid Metabolism in Cystic Fibrosis*“. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 83, č. 3 (1. září 2010): 121–29.

Takemaru, K.-I., Yamaguchi, S., Lee, Y.S., Zhang, Y., Carthew, R.W., Moon, R.T., 2003. *Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway*. Nature

422, 905–909.

Thakor, A.S., Gambhir, S.S., 2013. *Nanooncology: The future of cancer diagnosis and therapy*. CA. Cancer J. Clin. 63, 395–418.

The Colon: What it is, What it Does | ASCRS [WWW Document], n.d. URL <https://fascrs.org/patients/diseases-and-conditions/a-z/the-colon-what-it-is,-what-it-does>

[Tezacaftor](#) | [C26H27F3N2O6](#) | [CID 46199646 - PubChem \(nih.gov\)](#)

Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Cassiman, J.-J., 2002. *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions*. J. Cyst. Fibros. 1, 13–29.

Volta, C., Street, M.E., Ziveri, M.A., Bonelli, P., Spaggiari, C., Grzincich, G.L., Bernasconi, S., 2005. *Thyroid Function, Cytokine and IGF-IGFBP Interactions in Cystic Fibrosis Patients*. Horm. Res. 63, 206–210.

Wang, H., Cebotaru, L., Lee, H.W., Yang, Q., Pollard, B.S., Pollard, H.B., Guggino, W.B., 2016. *CFTR controls the activity of NF- κ B by enhancing the degradation of tradd*. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 40, 1063–1078.

What Is Cancer? - NCI [WWW Document], 2007. URL <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.

www.benes-michl.cz, B.& M., n.d. *Nové možnosti terapie cystické fibrózy* | Remedia [WWW Document]. URL <https://www.remedia.cz/rubriky/aktuality/nove-moznosti-terapie-cysticke-fibrozy-11620/>.

WHO. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1, World Health organization

Xia, Y., Shen, S., Verma, I.M., 2014. *NF- κ B, an Active Player in Human Cancers*. Cancer Immunol. Res. 2, 823–830.

Yamamoto, Y., Gaynor, R.B., 2001. *Role of the NF- κ B Pathway in the Pathogenesis of Human Disease States*. Curr. Mol. Med. 1, 287–296.

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H.L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G.J., Hadjantonakis, A.-K., Huang, R.Y.J., Kalchauer, C., Kalluri, R., Kang, Y., Khew-Goodall, Y., Levine, H., Liu, J., Longmore, G.D., Mani, S.A., Massagué, J., Mayor, R., McClay, D., Mostov, K.E., Newgreen, D.F., Nieto, M.A., Puisieux, A., Runyan, R., Savagner, P., Stanger, B., Stemmler, M.P., Takahashi, Y., Takeichi, M., Theveneau, E., Thiery, J.P., Thompson, E.W., Weinberg, R.A., Williams, E.D., Xing, J., Zhou, B.P., Sheng, G., 2020. *Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition*. Nat. Rev. Mol.

Cell Biol. 21, 341–352.

Zhao, Z., Chen, X., Dowbaj, A.M., Sljukic, A., Bratlie, K., Lin, L., Fong, E.L.S., Balachander, G.M., Chen, Z., Soragni, A., Huch, M., Zeng, Y.A., Wang, Q., Yu, H., 2022. *Organoids*. Nat. Rev. Methods Primer 2, 1–21.

Zoratto, F., Rossi, L., Verrico, M., Papa, A., Basso, E., Zullo, A., Tomao, L., Romiti, A., Russo, G.L., Tomao, S., 2014. *Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis*. Tumor Biol. 35, 6195–6206.