

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Studium metastatických procesů a odpovědi na léčebnou terapii u primokultur
izolovaných z kolorektálního karcinomu a metastáz do lymfatických uzlin**

Lukáš Krbal

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program *Patologie*

Hradec Králové

2019

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Patologie na Fingerlandově ústavu patologie Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Autor: MUDr. Lukáš Krbal
Fingerlandův ústav patologie
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: prof. MUDr. Ivo Šteiner, CSc.
Fingerlandův ústav patologie
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel konzultant: prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.
Fingerlandův ústav patologie
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.
Ústav biologie, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni

doc. MUDr. Kristýna Němejcová, Ph.D.
Ústav patologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice, Praha

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR
dne v od hod.
(*bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času*)

Tato práce vznikla za podpory programů IGA MZ ČR (NT 14150-3/2013), GAČR (17-10331S)

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Patologie
Garant studijního programu

Obsah:

1	Souhrn	1
2	Summary	2
3	Úvod do problematiky	3
4	Cíle disertační práce	5
5	Materiál a metodika	5
6	Výsledky	8
7	Diskuse	19
8	Závěr	24
9	Použitá literatura	26
10	Publikační činnost autora	28

1 Souhrn

Studium metastatických procesů a odpovědi na léčebnou terapii u primokultur izolovaných z kolorektálního karcinomu a metastáz do lymfatických uzlin

Kolorektální karcinom je jedno z nejčastějších maligních onemocnění v České republice. I přes zavedení primárního populačního screeningu k odhalení premaligních lézí nejeví incidence ani mortalita na toto onemocnění výrazněji klesající tendenci. Stále velké procento pacientů přichází v pozdním (metastatickém) stádiu onemocnění.

Izolace primárních buněčných kultur kolorektálního karcinomu je metoda, při které se získá poměrně rychle velký počet nádorových buněk v podmínkách „*in vitro*“. Při nízkém počtu pasáží si buňky ponechávají většinu vlastností buněk „*in vivo*“. Proto jsou ideálním modelem pro studium účinnosti chemoterapeutik a chemorezistence, ale i markerů podílejících se na kancerogenezi a metastazování kolorektálního karcinomu.

Celkově byly získány resekáty od 60-ti pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva. Naším záměrem bylo odebrat z každého resekátu jeden vzorek z primárního tumoru a jeden vzorek z lymfatické uzliny. Z primárních nádorů bylo získáno 26 primokultur s úspěšností 45 % (26/58); z odebraných lymfatických uzlin bylo získáno 17 primokultur s úspěšností 47 % (17/36). Téměř polovina odebraných lymfatických uzlin však nebyla histologicky metastaticky postižena. Reálná úspěšnost izolace buněčných kultur z metastaticky postižených lymfatických uzlin byla vyšší; 74 % (14/19). Izolace buněčných kultur z primárního tumoru a zároveň i z lymfogenní metastázy se podařila v deseti případech.

Naše výsledky vykazují výraznou variabilitu, nejen v citlivosti na použítá chemoterapeutika, ale také variabilitu v expresi EMT markerů ve všech našich studovaných vzorcích, stejně tak jejich změny v expresi po ovlivnění chemoterapeutiky. Tato variabilita je pravděpodobně výsledkem rozdílného stagingu, gradingu a interindividuální heterogenity vzorků, ale také rozdílem v dynamice EMT procesů.

Porovnáváním účinku irinotekanu a oxaliplatiny na biologické chování a expresi EMT markerů v párových buněčných liniích kolorektálního karcinomu bylo zjištěno, že obě použítá chemoterapeutika snižovala motilitu a migrační aktivitu metastatických buněk, přičemž irinotekan působil na tyto buňky účinněji.

Dosažené výsledky doplňují a rozšiřují základní poznatky o vlastnostech a chování buněčných linií získaných z kolorektálního karcinomu a regionální lymfatické uzliny a popisují mechanismy, jimiž nádorové buňky překonávají buněčnou smrt.

2 Summary

Study of metastatic processes and response to chemotherapy in primary cultures obtained from colorectal carcinoma and lymph node metastases

Colorectal carcinoma is one of the most common malignant diseases in the Czech Republic. Despite an implementation of primary population screening to detect premalignant lesions, the incidence and the mortality of the disease do not appear to decrease significantly. A significant percentage of patients still manifest with late (metastatic) stage of the disease.

Isolation of primary cell cultures of colorectal carcinoma is a method in which a large number of tumour cells is obtained relatively rapidly under „in vitro“ conditions. With a low number of passages the cells can retain most of the characteristics of the original cells "in vivo". Therefore, cell cultures are an ideal model for studying the efficacy of chemotherapeutics and chemoresistance, as well as markers involved in carcinogenesis and metastasis of colorectal carcinoma.

Overall, samples from 60 patients with colon adenocarcinoma were obtained. Our intention was to take one sample from the primary tumour and another sample from the lymph node from each patient. From the primary tumours we successfully obtained 26 primocultures with a success rate of 45 % (26/58); from the collected lymph nodes we obtained 17 primocultures with a success rate of 47 % (17/36). However, in almost half of the collected lymph nodes, no metastasis was detected histologically. The real success of cell culture isolation from metastatic affected lymph nodes was higher; 74 % (14/19). In ten cases the isolation of cell cultures from the primary tumour and also from the lymph node metastasis was successful.

In all of our tested samples, the results showed significant variability in the sensitivity to the chemotherapeutic agents used and in the expression of EMT markers before the application of chemotherapeutics and after their use. This variability is probably the result of different staging, grading and interindividual heterogeneity of the samples, but it may also reflect the difference in EMT process dynamics.

By comparing the effect of irinotecan and oxaliplatin on biological behaviour and expression of EMT markers in paired colorectal carcinoma cell lines we found out that both chemotherapeutics reduced metastatic cell motility and migration activity; irinotecan being more efficient.

Obtained results broaden the basic knowledge of the properties and behaviour of colorectal carcinoma cell lines and describe the mechanisms by which the tumour cells may overcome cell death.

3 Úvod do problematiky

Česká republika dlouhodobě zaujímá přední místa v incidenci i mortalitě kolorektálního karcinomu v porovnání s ostatními zeměmi světa [1]. Rizikovými faktory pro vznik sporadického kolorektálního karcinomu jsou dieta bohatá na tuky a alkohol, rodinná anamnéza, přítomnost prekancerózních lézí v kolorektu, předchozí radioterapie v dutině břišní a dieta chudá na vlákninu. Incidence kolorektálního karcinomu roste s věkem pacienta, nicméně kolorektální karcinom může vzniknout i u mladších jedinců, obvykle na podkladě genetických abnormalit nebo v důsledku chronických zánětů ve střevě, hlavně u autoimunitních procesů (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida) [2, 3].

Přestože v současné době existuje několik preventivních programů (především test na okultní krvácení ve stolici a preventivní kolonoskopie), jež usilují o snížení incidence a mortality kolorektálního karcinomu, nejeví tyto parametry dosud výrazněji klesající tendenci [4].

V časných stádiích onemocnění je kolorektální karcinom bezpříznakový. Později se přidávají celkové nespecifické příznaky jako zvýšená teplota, hubnutí a únava. V pokročilejších stádiích se u pacientů objevují bolesti břicha a střevní dyskomfort spojený například se zvýšenou plynatostí. Zejména pro pravostranné karcinomy kolorekta je typická mikrocytární anémie v důsledku dlouhodobého okultního krvácení. Pro levostranné adenokarcinomy tlustého střeva jsou typické křečovitě bolesti břicha (tenesmy), střídání zácpy a průjmu, neprůchodnost střev (ileus) a viditelná krev ve stolici [2, 3].

Úspěšnost léčby závisí na klinickopatologickém stupni pokročilosti onemocnění. Základem léčby je chirurgický zákrok, který je v pokročilejších stádiích doplňován o chemoterapii popř. radioterapii a nověji i o tzv. biologickou léčbu. Pro konvenční chemoterapii kolorektálního karcinomu jsou používány režimy na principu kombinace 5-fluorouracilu a leukovorinu, oxaliplatinu a irinotekanu [5]. Jako tzv. biologická léčba jsou využívány terapeutické monoklonální protilátky, které blokují signální dráhy důležité pro růst kolorektálního karcinomu na principu blokování EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor) nebo působí antiangiogenně a ovlivňují novotvorbu cév blokováním VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor). Tyto látky jsou podávány u primárně pokročilých adenokarcinomů (pM1) nebo u adenokarcinomů, u kterých byla po předchozí chemoterapii zjištěna progresse onemocnění [6].

Velký problém představuje léková rezistence, která snižuje účinnost terapie a je zodpovědná za selhání léčby [7].

Buněčné kultury jsou dnes nenahraditelný model používaný ve výzkumu. První kulturu izolovaných buněk z odebraného materiálu označujeme jako primární kulturu neboli primokulturu. Buněčné kultury mají ve srovnání s jinými typy biologických modelů zásadní výhody. Velkou předností je to, že pokus probíhá na jediném dobře charakterizovaném typu buněk. Během krátké doby je možné získat poměrně velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu, což při použití jiných biologických modelů není možné. Zároveň

provádění experimentů na buněčných kulturách, při nichž dochází k jejich zničení, s sebou nese etické problémy, jako by tomu bylo při použití zvířecího pokusného modelu [8]. Na druhou stranu je potřeba počítat i s nevýhodami, která použití buněčných kultur limitují. Kultivované buňky rostou za nefyziologických podmínek – pěstují se v umělém kultivačním médiu, jehož složení neodráží přesně složení vnitřního prostředí v organismu, a také v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci ve tkáních. Kultivované buňky postrádají obvyklý tkáňový kontext, tj. přítomnost jiných buněčných typů, s nimiž by „*in vivo*“ komunikovaly. V důsledku toho dochází ke změně fenotypu kultivovaných buněk, takže jejich vlastnosti mohou ale nemusí přesně odpovídat vlastnostem stejných buněk v organismu [8].

Příprava buněk z kolorektálního karcinomu je obtížná z důvodu možné bakteriální a mykotické kontaminace. Pokud je však odběr prováděn ze serózní strany a nedojde k poškození střevní sliznice, je pravděpodobnost kontaminace mnohonásobně nižší. Mikrobiální kontaminaci lze předejít použitím antibiotik a antimykotik, nicméně vysoká dávka antibiotik nebo antimykotik však může interferovat s testovanými léčivy [9, 10]. Buněčné kultury jsou důležité pro studium účinnosti chemoterapeutik a lékové rezistence.

V naší práci jsme se snažili zhotovit primokultury z primárního tumoru tlustého střeva a zároveň z metastaticky postižené lymfatické uzliny. Takto získané primokultury jsou ideálním modelem pro studium markerů kancerogeneze, metastazování a epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT).

V průběhu EMT dochází k celé řadě změn – ztráta polarita buněk, změna tvaru buňky ve vřetenovitý, ztráta mezibuněčných spojů a závislosti na nich, zvýšená produkce složek extracelulární matrix, ztráta závislosti na bazální membráně, zvýšená schopnost motility a zvýšená odolnost vůči apoptóze. V tomto procesu dochází krom jiného ke změně E-cadherinu na N-cadherin, tzv. cadherinového switchi [11, 12].

Do metastatických procesů je zapojeno několik molekul podílejících se na adhezi, migraci nebo invazivitě nádorových buněk, jako např. epiteliální adhezní molekula (EpCAM), intercelulární adhezní molekula (ICAM1), β -catenin, nebo matrixové metaloproteinázy MMP2 a MMP9, podílející se na degradaci extracelulární matrix [11, 12].

Jedním z nejmodernějších přístupů současné molekulární charakterizace nádorů, včetně kolorektálního karcinomu, je analýza mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou významné regulátory genové exprese, které kontrolují, jak fyziologické, tak patologické procesy v organismu. Časný záchyt kolorektálního karcinomu je jednou z hlavních podmínek úspěšné léčby. Velkou výzvou do budoucna je vyhledání takové miRNA, která by umožnila zlepšit detekci kolorektálního karcinomu nebo by byla schopná predikovat léčebnou odpověď u pacientů s kolorektálním karcinomem [13].

4 Cíle disertační práce

Náplní mé disertační práce bylo vybrat vhodný postup pro izolaci buněčných kultur z kolorektálního karcinomu a jeho metastázy do regionální lymfatické uzliny, provést základní charakterizaci odebraných buněčných linií se zaměřením na analýzu markerů nádorové progresy.

Díličními cíli projektu bylo:

- 1) Optimalizovat postup pro přípravu primokultur odvozených z kolorektálního karcinomu a přilehlých lymfatických uzlin.
- 2) Stanovit citlivost těchto primokultur k běžně používaným chemoterapeutikům (oxaliplatin, irinotekan), a/nebo monoklonálním protilátkám (bevacizumab, cetuximab, panitumumab).
- 3) Stanovit markery podílející se na kancerogenezi, metastazování u kolorektálního karcinomu na úrovni mikroRNA, mRNA a proteinů.
- 4) Objasnit roli epiteliálně mesenchymální tranzice v buňkách metastatického kolorektálního karcinomu.

5 Materiál a metodika

Materiál pro buněčné kultury

Všechny resekáty tlustého střeva pro tuto práci byly operovány na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Pro tuto práci byly získány adenokarcinomy volného tlustého střeva. Nejprve jsme se pokusili najít zvětšenou lymfatickou uzlinu a polovinu z ní odebrali. Poté byly odebrány vzorky z primárního tumoru střeva a nepostižená sliznice střeva do transportního media.

Zbylá část materiálu z uzliny a z primárního tumoru byla v laminárním boxu zbavena přebytečné tkáně, rozmělněna na co nejmenší fragmenty a následně zhomogenizována. Vzorek byl přenesen do kultivačních lahví, které byly následně inkubovány při 37°C v 5 % atmosféře CO₂.

Testování životnosti buněk

Irinotekan a oxaliplatin byly naředěny na cílové koncentrace kultivačním médiem. Životnost jednotlivých buněk byla měřena pomocí testu WST-1, což je kolorimetrická assay založená na štěpení tetrazoliové soli na nerozpustný formazan mitochondriálními dehydrogenázami živých buněk. Tento test kvantifikuje množství metabolicky aktivních

buněk. Z výsledků tohoto testu byla následně stanovena hodnota IC50, tj. koncentrace testované látky, při které přežívá 50 % buněk.

Testování migrace buněk

Zkoumání buněčné migrace bylo provedeno za pomoci přístroje X-CELLigence, který měří průchod buněk přes semipermeabilní membránu v reálném čase. Migrační potenciál byl detekován jako buněčný index, který odpovídá přímo úměrně nárůstu počtu buněk, které prošly přes semipermeabilní membránu.

Imunohistochemická analýza buněk

Z bioptických parafinových bločků byly na podložní sklíčka nanесeny 4 μm řezy a použity tyto primární protilátky: pancytokeratin, p53, vimentin, E-cadherin, N-cadherin, β-catenin, Ki67 a BRAF. Většina vzorků byla vložena do automatického barvicího systému BenchMark ULTRA (Ventana) a antigeny detekovány pomocí kitu ultraView Universal DAB (Ventana).

Příprava vzorků na extrakci RNA z buněčných kultur

Buněčná suspenze byla po 24 hodinách růstu v inkubátoru ovlivněna irinotekanem/oxaliplatinou. Poté byly buňky ošetřeny Trizolem, který buňky lyzuje, ale zároveň zachovává integritu nukleových kyselin a proteinů.

RNA izolace z buněčných kultur pomocí kolonek

Izolaci celkové RNA jsme prováděli pomocí komerčně zakoupených kolonek Zymo-Spin IIC Column. Buněčný lyzát byl nanесen na kolonky, centrifugací došlo k průchodu lyzátu skrz kolonku a navázání nukleových kyselin (RNA a DNA) na sorbent kolonky. Dále byl vzorek ošetřen přidáním DNAsy a kolonky byly několikrát promyty promývacími pufrý. Zachycenou RNA jsme nakonec z kolonky uvolnili pomocí DEPC vody do sběrné zkumavky, koncentraci RNA jsme změřili na NanoDropu 2000 a všechny vzorky jsme naředili na jednotnou koncentraci.

Měření integrity RNA – stanovení RIN čísla u vzorků RNA izolovaných buněčných kultur

Použití neporušené RNA je důležitým předpokladem pro úspěšnou RT-PCR analýzu, proto jsme u vzorků RNA izolovaných z buněčných kultur provedli kvalitativní analýzu RNA pomocí elektroforetického přístroje 2100 Bioanalyzer – měření RIN čísla (RNA integrity number). Tento systém pracuje na principu kapilární elektroforézy. Pro RT-PCR analýzu jsou vhodné vzorky s RIN číslem větším než 7, avšak jako nejvhodnější se považuje použití vzorků s RIN číslem v rozmezí 9 - 10.

Příprava cDNA a RT-PCR identifikace

cDNA (complementary DNA) je jednořetězcová DNA syntetizovaná podle RNA. Tuto reakci katalyzuje RNA-dependentní DNA polymeráza zvaná *reverzní transkriptáza*.

Pro přípravu cDNA pro mRNA a mikroRNA kvantifikaci byla použita RNA vyizolovaná z buněčných kultur. Směs reverzní transkriptázy, primerů, mixu nukleotidů

(deoxynukleotidtrifosfátů) a reakčního pufru byla poté inkubována v termobloku. Vzniklá cDNA byla následně amplifikována PCR reakcí.

Příprava vzorku na Western blot - buněčný lyzát

Buněčná suspenze byla po 24 hodinách ovlivněna irinotekanem/oxaliplatinou. Po 48 hodinách expozice byl přidán lyzační pufr s inhibitory proteáz a homogenát byl přenesen do mikrozkumavek. Poté byl zcentrifugován a odebraný supernatant byl použit na změření bílkoviny, z čehož bylo vypočteno naředění jednotlivých vzorků lyzačním pufrem a 4x koncentrovaným vzorkovým pufrem (SDS) na jednotnou koncentraci, které byly později nanášeny na gel.

BCA stanovení bílkoviny

Pro stanovení koncentrace bílkoviny jsme použili metodu BCA (Bicinchoninic acid assay). Princip metody je založen na reakci proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď v ní přechází z Cu^{2+} na Cu^{1+} , čímž dochází k redukci BCA (bicinchoninic acid) za vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny.

Elektroforéza

Princip této metody spočívá v separaci peptidů a proteinů dle jejich velikosti a náboje v elektrickém poli. V našich experimentech jsme použili vertikální SDS-PAGE elektroforézu s využitím polyakrylamidového gelu a přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS). Vzorky byly rozděleny a po ukončení separace byl gel vložen do blotovacího pufru a pokračovalo se metodou „western blot“.

Western blotting a chemoluminiscenční detekce proteinů

Pro stanovení proteinů v našich experimentech byla použita metoda „western blot“, kdy byly proteiny z gelu přeneseny na polyvinylidínfluoridovou (PVDF) membránu. Do tzv. blotovacího sendviče byly poskládány jednotlivé součásti, a to v pořadí blotovací houbička, filtrační papír, gel z elektroforézy, PVDF membrána, druhý filtrační papír a na něj nakonec blotovací houbička. Po přenesení proteinů na membránu byla tato membrána inkubována nejprve s primární a poté se sekundární protilátkou s navázanou křenovou peroxidázou. Proteiny byly detekovány pomocí chemiluminiscence, za pomoci programu Carestream. Jako kontrolní protein byl zvolen β -actin, pomocí kterého byla provedena relativní kvantifikace jednotlivých proteinů

Statistická analýza

Data ze všech měření byla vyjádřena jako hodnota \pm SD z průměru z alespoň dvou nezávislých měření. Statistická analýza byla provedena pomocí two way ANOVA analýzy, Sidak test významnosti, kde $p < 0,05$. Analýza dat byla provedena programem GraphPad Prism 6.0. Koncentrace vybraných inhibitorů způsobující 50 % pokles životnosti buněk (IC50) byla stanovena metodou nelineární regrese programem GraphPad Prism 6.0.

6 Výsledky

Do naší studie bylo zařazeno 60 resekátů od pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva. V tabulce č. 1 jsou shrnuta základní patologická data o všech odebraných vzorcích, včetně úspěšnosti izolace jednotlivých vzorků.

Tab. č. 1: Úspěšnost izolace buněčných linií z primárního tumoru a z regionální lymfatické uzliny v závislosti na histologických parametrech kolorektálního karcinomu.

	Celkový počet (n = 60)	% úspěšnost izolace z tumoru (n = 58)	% úspěšnost izolace z LU (n = 36)
Stage tumoru			
T1	1/60 (2 %)	0/0 (0 %)	1/1 (100 %)
T2	10/60 (17 %)	2/9 (22 %)	1/4 (25 %)
T3	38/60 (63 %)	17/38 (45 %)	10/24 (42 %)
T4a, b	11/60 (18 %)	7/11 (64 %)	5/7 (71 %)
Stage LU			
N0 + N0(i+)	32/60 (53 %)	14/31 (45 %)	3/17 (18 %)
N1a, b, c	18/60 (30 %)	8/17 (47 %)	8/11 (73 %)
N2a, b	10/60 (17 %)	4/10 (40 %)	6/8 (75 %)
Lokalizace			
Pravý tračník	26/60 (43 %)	11/24 (46 %)	9/18 (50 %)
Levý tračník	34/60 (57 %)	15/34 (44 %)	8/18 (44 %)
Grade			
G1	8/60 (13 %)	2/7 (29 %)	1/3 (33 %)
G2	40/60 (67 %)	16/39 (41 %)	10/24 (42 %)
G3	12/60 (20 %)	8/12 (67 %)	6/9 (67 %)
Angioinvaze			
Prokázána	25/60 (42 %)	10/25 (40 %)	9/13 (69 %)
Neprokázána	35/60 (58 %)	16/33 (48 %)	8/23 (35 %)
Perineurální šíření			
Prokázáno	13/60 (22 %)	7/13 (54 %)	6/8 (75 %)
Neprokázáno	47/60 (78 %)	19/45 (42 %)	11/28 (39 %)
Mucinózní komponenta			
Přítomna	16/60 (27 %)	5/16 (31 %)	3/10 (30 %)
Nepřítomna	44/60 (73 %)	21/42 (50 %)	14/26 (54 %)

Z primárních tumorů bylo získáno 58 vzorků, 36 vzorků bylo získáno z regionálních lymfatických uzlin. Z primárních nádorů bylo získáno 26 primokultur s úspěšností 45 % (26/58); z odebraných lymfatických uzlin bylo získáno 17 primokultur s úspěšností 47 % (17/36). Téměř polovina (konkrétně 17) odebraných lymfatických uzlin však nebyla histologicky metastaticky postižena. Reálná úspěšnost izolace buněčných kultur z metastaticky postižených lymfatických uzlin byla vyšší; 74 % (14/19).

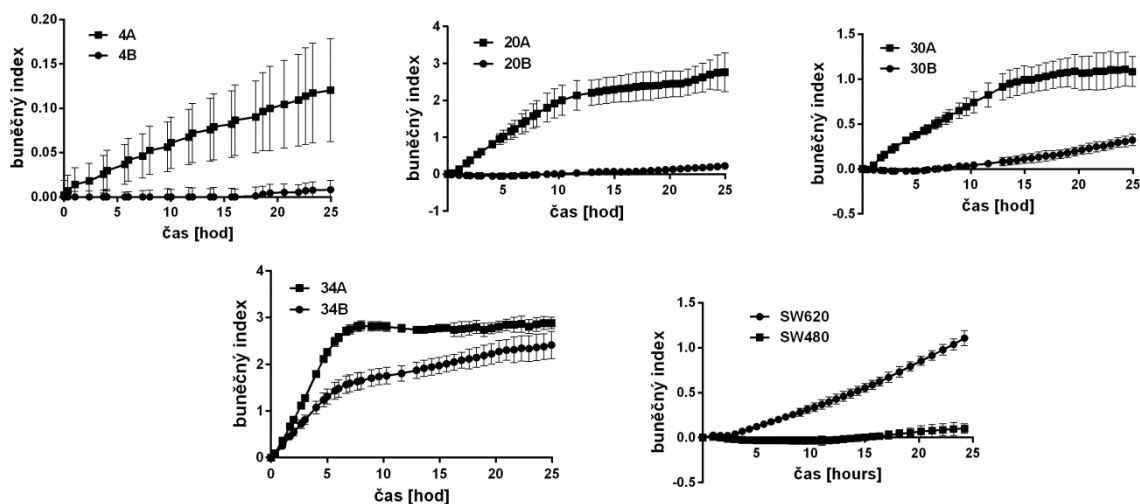
Na základě histologických dat byly pro prvotní experimenty vybrány čtyři vzorky, u nichž jsme získali jak buněčnou linii z primárního nádoru, tak z uzlinové metastázy (tab. č. 2).

Tab. č. 2: Základní histologická charakteristika vzorků určených pro izolaci buněčných kultur.

Číslo kultury	Stage tumoru	Stage uzlin	Grade tumoru	Angioinvaze	Perineurální šíření	Mucinózní komponenta	Lokalizace tumoru
4	T4b	T2b	G3	+	+	0	sigmoideum
20	T3	T1b	G2	-	-	0	cékum
30	T4a	T1a	G2	+	+	0	transversum
34	T3	T1a	G2	-	-	0	sigmoideum

Charakteristika primokultur z hlediska schopnosti migrace

Pro testování schopnosti migrace izolovaných primokultur byla použita metoda průchodu přes semipermeabilní membránu za pomoci přístroje xCELLigence. Jak je patrné obr. č. 1, buňky získané z metastázy do lymfatických uzlin (A) měly vyšší migrační potenciál, než buňky získané z primárního tumoru (B) a to ve všech čtyřech případech.

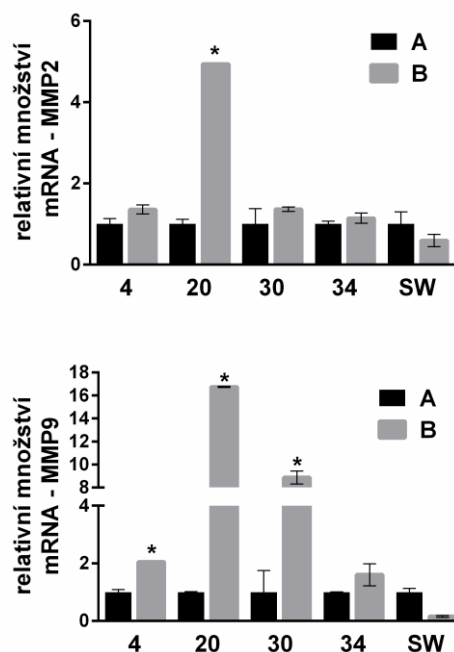


Obr. č. 1: Porovnání schopnosti migrace u čtyř různých linií izolovaných z primárního tumoru (4B, 20B, 30B, 34B) a linií z odpovídajících metastáz do lymfatických uzlin (4A, 20A, 30A, 34A). Pro srovnání byly použity immortalizované linie SW480 a SW620, tedy model buněk kolorektálního karcinomu a buněk z metastáz do lymfatické uzliny odebrané od stejného

pacienta. Data jsou vyjádřena jako průměr buněčného indexu \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů. Buněčný index odpovídá nárůstu počtu buněk prošlých přes semipermeabilní membránu.

Porovnání markerů zapojených do migrace

Do metastatických procesů je zapojeno mnoho molekul podílejících se na adhezi, migraci nebo invazivitě buněk. Matrixové metaloproteinázy (MMP2, MMP9) zapojené do degradace extracelulární matrix byly stanoveny na úrovni mRNA. V souvislosti se schopností migrace buněk byly nejprve stanoveny hladiny mRNA matrixových metaloproteináz (MMP). Vyšší hladiny MMP byly zjištěny u buněk izolovaných z primárního kolorektálního karcinomu, na rozdíl od imortalizovaných buněčných linií SW480 a SW620, ve kterých byl efekt opačný (obr. č. 2).

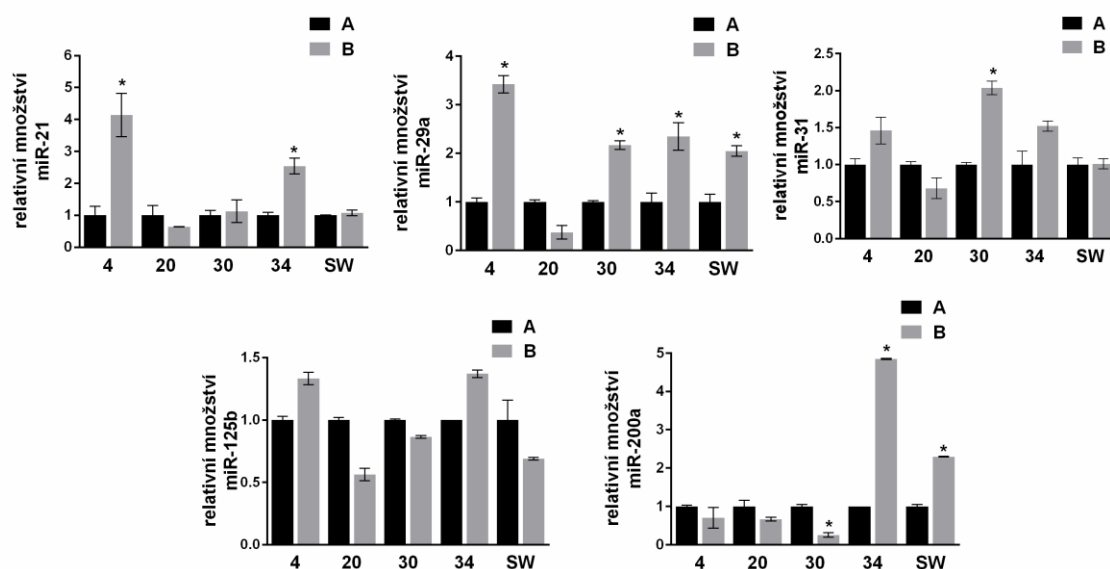


Obr. č. 2: Relativní množství MMP2 a MMP9 na úrovni mRNA v buňkách primárního kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B, 34B) a buňkách jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A) byla stanovena pomocí RT PCR. Pro srovnání byly použity imortalizované linie SW480 (označeno jako SW-B) a SW620 (označeno jako SW-A). Data jsou vyjádřena jako průměr relativního množství \pm SD z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = buňky primárního kolorektálního karcinomu vs buňky z jejich metastázy do lymfatické uzliny.

Stanovení relativního množství mikroRNA v izolovaných buněčných liniích

Dalšími důležitými regulátory genové exprese, podílejících se na procesech nádorové progresi jsou i miRNA. Ve vybraných čtyřech vzorcích (4, 20, 30 a 34) byly stanoveny miR-21, miR-29a, miR-31, miR-125b a miR-200a, vybrané na základě literatury. Výsledky jsou shrnuty v obrázku č. 3. Množství miR-21 bylo významně zvýšeno ve dvou případech (kultura č. 4 a č. 34) v liniích izolovaných z kolorektálního karcinomu. Stejně tak množství miR-29a bylo zvýšeno v kultuře č. 4, č. 34 a navíc také v kultuře č. 30, vše u buněk kolorektálního karcinomu, v porovnání s liniemi izolovanými z metastáz. MiR-31 byla deregulována pouze v případě 30B. MiR-200a byla výrazně modifikována ve dvou případech, v linii 30B došlo ke snížení exprese a v linii 34B byla exprese naopak zvýšena.

Expresí výše zmíněných miRNA souvisejících s procesy adheze a migrace byla měřena a porovnávána také v immortalizovaných buněčných liniích SW480 a SW620. Data jsou uvedena na obr. č. 3. Hladiny miR-21, miR-31 a miR-125b neukázaly žádnou významnou změnu. Na druhou stranu hladina miR-29a a miR-200a byly významně zvýšeny u linie SW480 v porovnání s linií SW620.

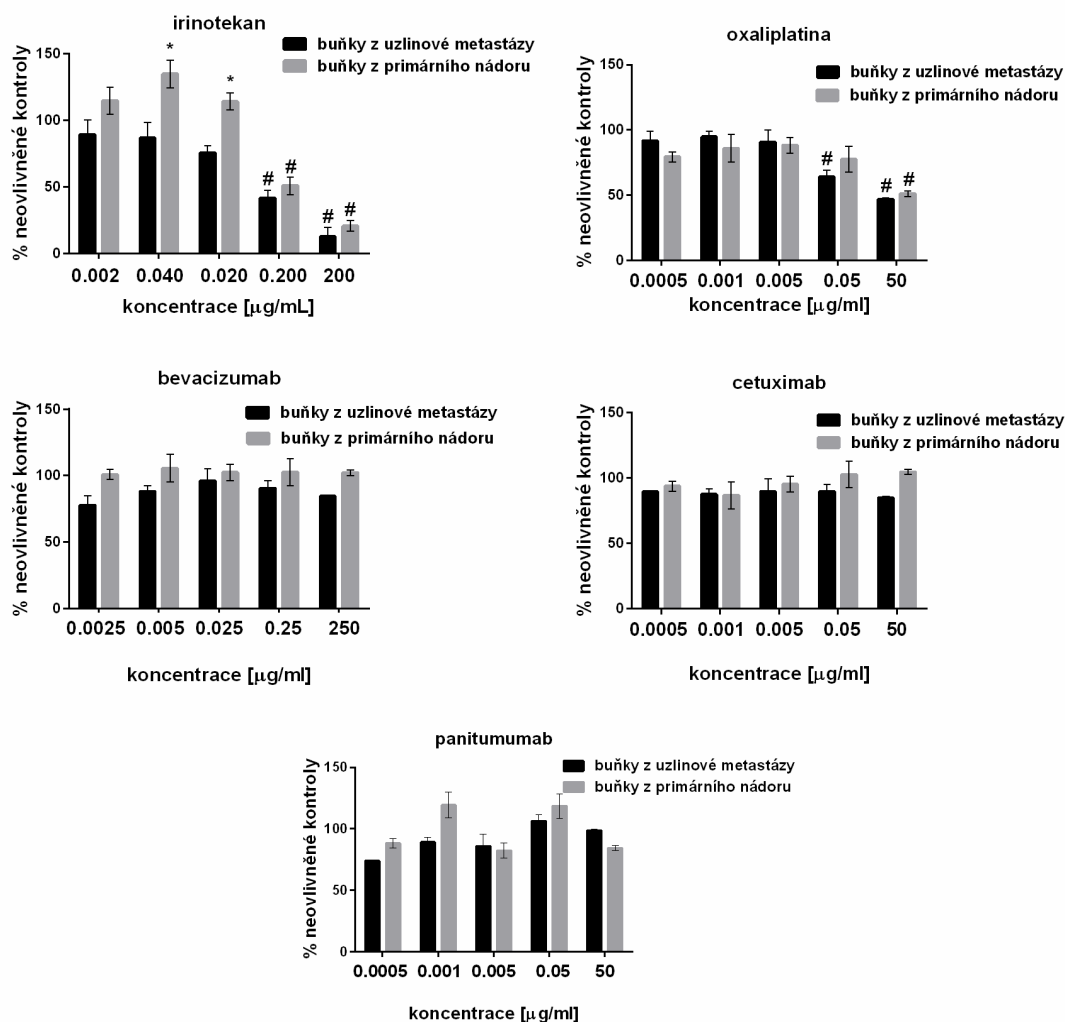


Obr. č. 3: Porovnání relativního množství vybraných miRNA souvisejících s buněčnou adhezí a progresí (miR-21, miR-29a, miR-31, miR-125b a miR-200a) u buněčných liniích izolovaných z kolorektálního karcinomu (4B, 20B, 30B a 34B) a jejich metastáz do lymfatické uzliny (4A, 20A, 30A, 34A), získaných od čtyř pacientů. Pro srovnání byly použity immortalizované linie SW480 (označeno jako SW-B) a SW620 (označeno jako SW-A). Data byla získána pomocí RT-PCR. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní množství \pm SD jako průměr z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = buňky z kolorektálního karcinomu vs. buňky z metastázy do lymfatické uzliny.

Účinek chemoterapeutik a biologické terapie na životnost izolovaných buněk

V další části studie jsme se zaměřili na stanovení životnosti buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu a jejich metastázy do lymfatické uzliny po ovlivnění chemoterapeutiky a biologickou léčbou (obr. č. 4). Pro naše experimenty jsme zvolili testování základní cytotoxicity těchto léčiv na buňkách kolorektálního karcinomu (20B) a buňkách z jejich metastázy do lymfatické uzliny (20A). Irinotekan se ukázal jako více účinný v porovnání s oxaliplatinou, zejména u buněk izolovaných z metastázy. Porovnání hodnot IC₅₀ je shrnuto v tabulce č. 3.

Stejně tak jako u adjuvantní terapie byl porovnáván účinek biologické terapie (bevacizumab, cetuximab, panitumumab) na životnost izolovaných buněk. U testovaných linií nebyly zjištěny žádné významné změny dokonce ani při použití vyšších koncentrací (bevacizumab 250 µg/ml; cetuximab a panitumumab 50 µg/ml).



Obr. č. 4: Porovnání životnosti buněk izolovaných z primárního nádoru a buněk z uzlinové metastázy po ovlivnění adjuvantní terapií (irinotekanem, oxaliplatinou) a biologickou léčbou (bevacizumabem, cetuximabem a panitumumabem) po dobu 30 hodin. Vyhodnocení bylo

provedeno pomocí WST analýzy. Data jsou vyjádřena jako procenta neovlivněné kontroly. * $p < 0,05$ = buňky izolované z kolorektálního karcinomu vs. buňky izolované z jejich metastázy do lymfatické uzliny; # $p < 0,05$ = buňky ovlivněné chemoterapií vs. neovlivněná kontrola.

Tab. č. 3: Hodnoty IC50 chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu u buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu a jejich metastázy do lymfatické uzliny po 30 hodinách inkubace.

IC50 [$\mu\text{g/ml}$]		
	buňky izolované z uzlinové metastázy	buňky izolované z primárního nádoru
irinotekan	0.11	0.22
oxaliplatina	48.23	52.23

Na základě předchozích výsledků byl pro další testování životnosti buněk vybrán irinotekan a oxaliplatina. Citlivost k těmto chemoterapeutikům byla testována na několika imortalizovaných buněčných liniích (HT29, CaCo2, SW480 a SW620) a nenádorových fibroblastech (CCD-112CoN) v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin. Dále byla citlivost testována na liniích izolovaných z primárních kolorektálních karcinomů, resp. jejich uzlinových metastáz, v časovém intervalu 48 hod, který byl v předchozích experimentech zjištěn jako optimální. Životnost byla hodnocena pomocí testu WST-1. Na základě testu cytotoxicity, chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu byly stanoveny hodnoty IC50 (tab. č. 4 a 5). V testovaných buněčných liniích byly zřetelné rozdíly citlivosti na testovaná chemoterapeutika, avšak jako citlivější se projevíly linie izolované z metastáz do lymfatických uzlin.

Tab. č. 4: Hodnoty IC50 chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu u imortalizovaných buněčných linií HT29, CaCo2, SW480 a SW620 a u nenádorové linie CCD-112CoN.

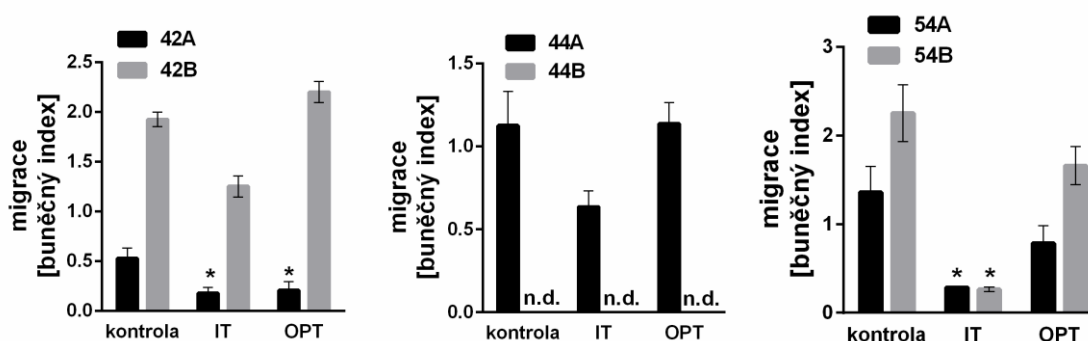
	IC50 OPT [$\mu\text{g/ml}$]			IC50 IT [$\mu\text{g/ml}$]		
	24hod	48hod	72hod	24hod	48hod	72hod
Imortalizované nádorové buněčné linie						
HT29	482.70	46.95	5.82	70.01	23.38	11.29
CaCo2	11.18	0.36	1.14	150.00	48.11	38.22
SW480	109.1	0.35	8.20	316.3	32.81	4.18
SW620	70.91	3.30	12.74	603.8	118.0	8.64
Nenádorová buněčná linie						
CCD	36.13	12.91	98.20	341.7	103.9	341.7

Tab. č. 5: Hodnoty IC50 chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu u buněčných linií izolovaných od pacientů z primárního tumoru (B) a z metastaticky postižené lymfatické uzliny (A).

	IC50 OPT [$\mu\text{g/ml}$]			IC50 IT [$\mu\text{g/ml}$]		
	24hod	48hod	72hod	24hod	48hod	72hod
Primokultury						
36B		7.42			40.44	
39B		55.08			108.5	
42A		80.67			303.8	
42B		30.18			41.82	
43B		139.70			534.20	
44A		47.83			43.63	
44B		238.60			248.70	
46B		143.90			504.80	
47B		216.80			285.90	
48B		24.08			13.33	
54A		172.2			66.13	
54B		16.19			38.11	
55B		85.21			88.26	

Vliv chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu na migrační potenciál izolovaných buněčných linií

Pro další testování byla vybrána skupina vzorků, na základě patologických charakteristik a na základě citlivosti k testovaným látkám. U těchto izolovaných linií (vzorky 42, 44, 54 A i B) byla testována schopnost migrace a zároveň byl porovnáván vliv chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu na jejich migrační potenciál (obr. č. 5). Vyšší migrační potenciál byl pozorován u buněk primárního tumoru (42B a 54B), kromě vzorku číslo 44, kde buňky primárního tumoru nebyly schopny migrovat vůbec (n.d. = nedetekovatelné). Na druhou stranu, irinotekan a oxaliplatin působily na migraci účinněji v buňkách izolovaných z lymfatické uzliny.



Obr. č. 5: Porovnání schopnosti migrace buněk izolovaných z kolorektálního karcinomu (B) a buněk izolovaných z jejich metastázy do lymfatické uzliny (A), získané z nádorové tkáně

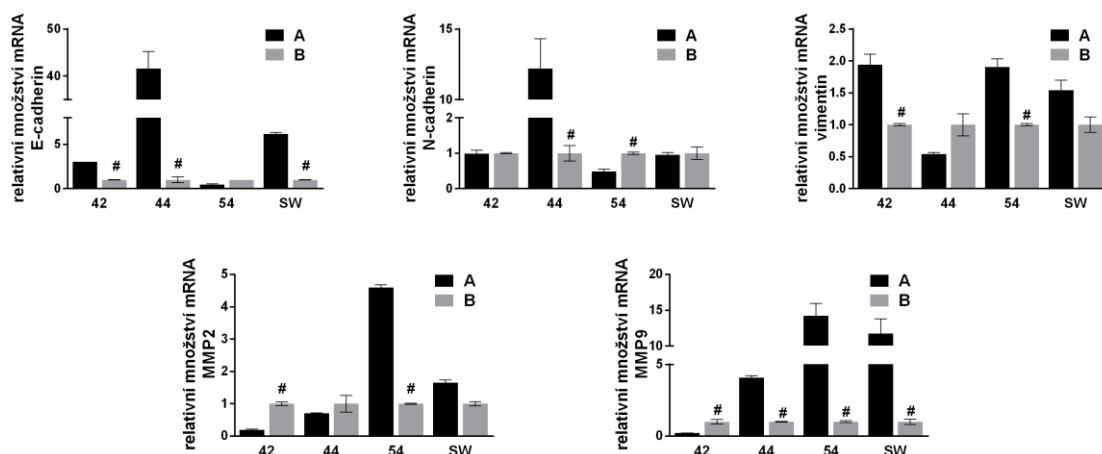
od tří pacientů (42, 44, 54), po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou (použitá koncentrace odpovídá hodnotě IC50). Migrační assay byla provedena pomocí analýzy v čase, přístrojem X-CELLigence. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD z posledního bodu měření z alespoň dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ = irinotekan a oxaliplatin vs. neovlivněná kontrola; n.d.= nedetekovatelné.

Stanovení markerů nádorové progresy na úrovni mikroRNA a mRNA

Dále byly měřeny hladiny markerů zapojených do nádorové progresy na úrovni mRNA (E-cadherin, N-cadherin, MMP2, MMP9 a vimentin) a také hladiny mikroRNA souvisejících s těmito procesy (miR-21, miR-29a a miR-200a) (viz obr. č. 6 a 7).

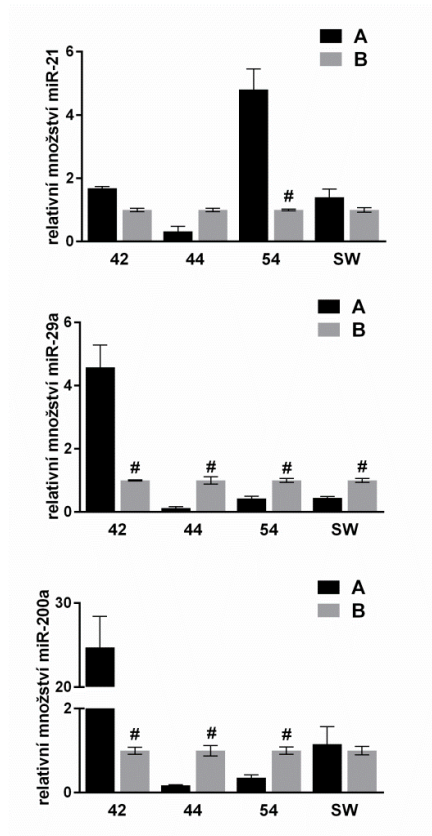
Vyšší exprese E-cadherinu byla zjištěna v buňkách z metastázy do lymfatické uzliny (A), ve vzorcích č. 42 a 44. Ve vzorku č. 54 byla vyšší exprese E-cadherinu nalezena v buňkách kolorektálního karcinomu. Výrazná exprese N-cadherinu byla zjištěna také ve vzorku 44A. Mezenchymální marker vimentin byl výrazně exprimován v buňkách z metastáz do lymfatické uzliny, kromě vzorku 44. MMP, které jsou zapojeny do nádorové progresy, byly významně vyšší v buňkách z metastaticky postižených lymfatických uzlin, zejména pak MMP-9. Jediná výjimka byl vzorek č. 42, ve kterém hladina mRNA obou MMP byla téměř nulová.

Co se týče exprese mikroRNA, vyšší hladina miR-21 byla stanovena v buňkách z metastaticky postižených lymfatických uzlin, vyjma vzorku 44. Nejvýraznější zvýšení miR-21 bylo zjištěno v metastatických buňkách 54A. Relativní množství miR-29a bylo naopak sníženo v metastatických buňkách (vzorek 44, 54, SW) v porovnání s liniemi odvozenými z primárního tumoru. Významný nárůst hladiny miR-29a byl detekován v linii 42A. Podobný trend jsme pozorovali i v expresi miR-200a, přičemž nejvyšší hladina byla stanovena právě v linii 42A.



Obr. č. 6: Porovnání rozdílu mRNA exprese vybraných molekul zapojených do nádorové progresy v buňkách izolovaných z metastázy do lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) a buněk z jejich primárních tumorů (42B, 44B, 54B). mRNA exprese E-cadherinu, N-cadherinu,

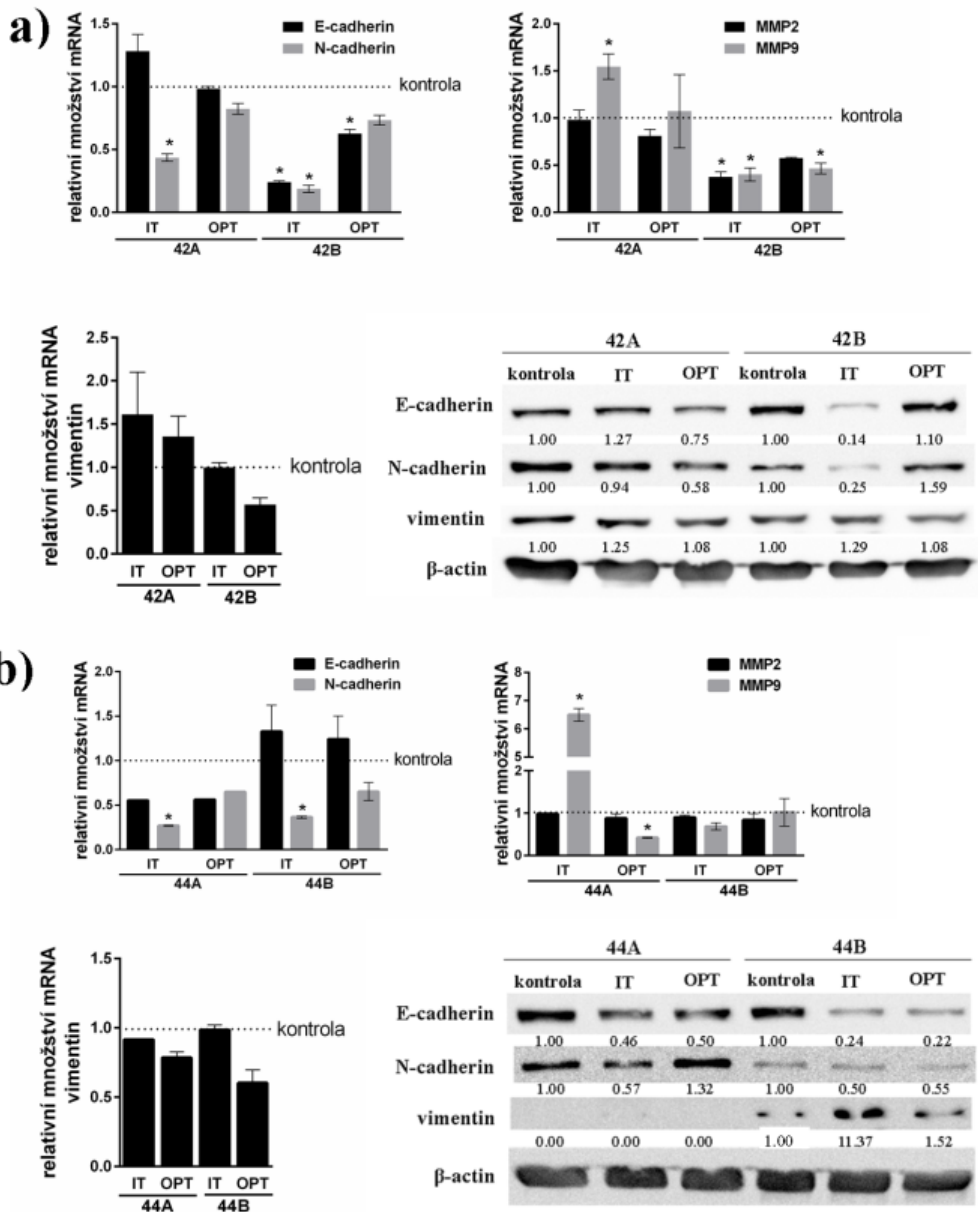
MMP2, MMP9 a vimentinu byla stanovena pomocí RT PCR. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako relativní množství \pm SD. # $p < 0,05$ = buňky z metastázy do lymfatické uzliny vs. buňky z primárního kolorektálního karcinomu.

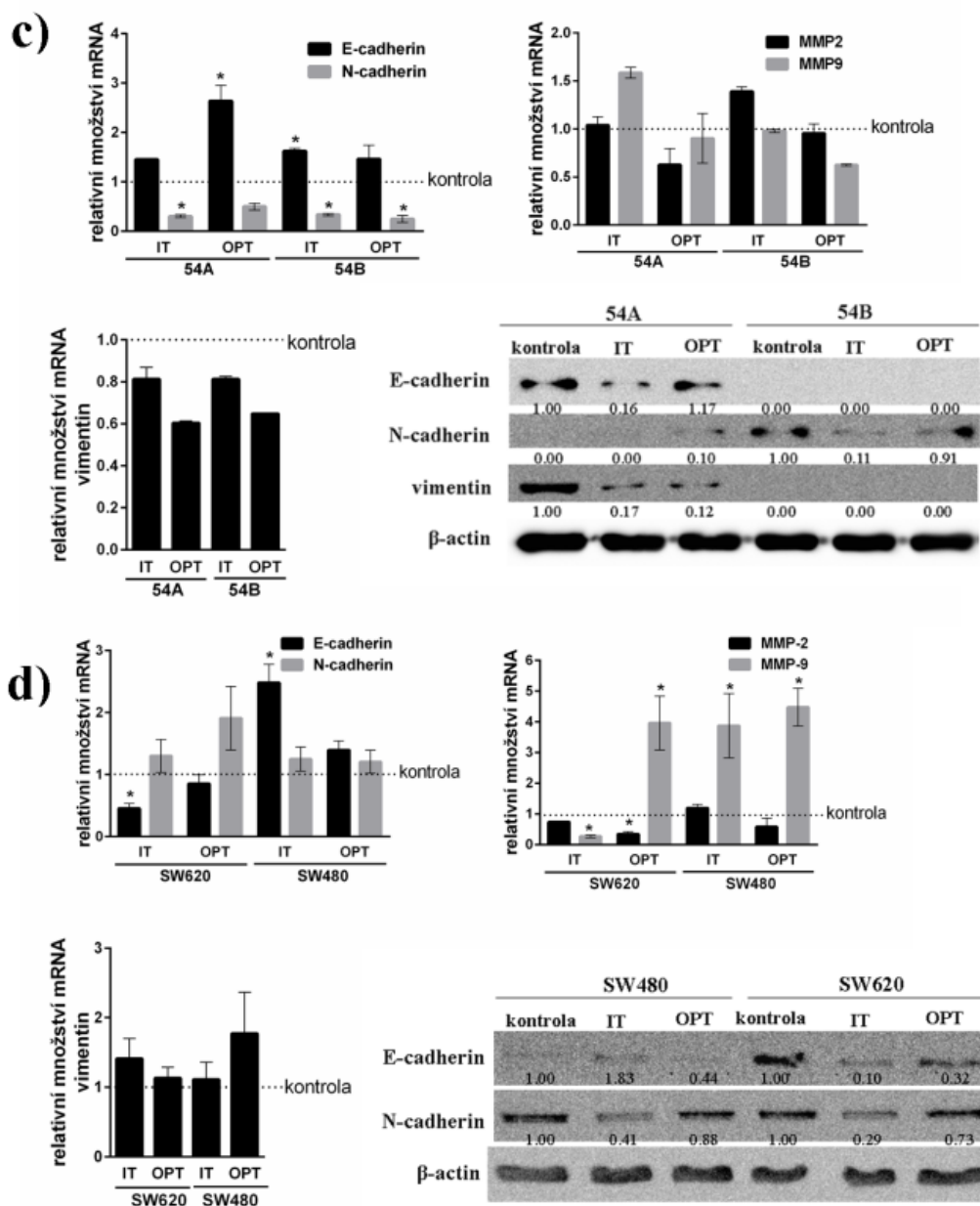


Obr. č. 7: Porovnání rozdílu hladin miRNA zapojených do nádorové progresy v buňkách izolovaných z metastázy do lymfatické uzliny (42A, 44A, 54A) a buněk z jejich primárních tumorů (42B, 44B, 54B). Hladiny miR-21, miR-29a, miR-200a byly stanoveny pomocí RT PCR. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech. Data jsou vyjádřena jako relativní množství \pm SD. # $p < 0,05$ = buňky z metastázy do lymfatické uzliny vs. buňky z primárního kolorektálního karcinomu.

Vliv chemoterapeutik irinotekanu a oxaliplatinu na expresi molekul zapojených do nádorové progresy

Účinek irinotekanu a oxaliplatinu na expresi molekul souvisejících s nádorovou progresí byl porovnáván nejen na úrovni mRNA, ale také na úrovni proteinu (obr. č. 8). Významné změny nastaly ve většině testovaných vzorků a to jak u buněk kolorektálního karcinomu, tak buněk odvozených z metastázy do lymfatické uzliny.





Obr. č. 8: Porovnání změn v relativní expresi molekul souvisejících s nádorovou progresí (E-cadherin, N-cadherin, MMP2, MMP9 a vimentin) na úrovni mRNA a proteinů po ovlivnění irinotekanem a oxaliplatinou v buňkách z metastázy do lymfatické uzliny (A) a v buňkách kolorektálního karcinomu (B) izolovaných z tumorů od tří pacientů (vzorek č. 42 - a); č. 44 - (b); č. 54 - (c); a buněk imortalizovaných SW480 a SW620 (d). Expze byla stanovena pomocí RT-PCR (množství mRNA) a pomocí western blot analýzy (množství proteinu). Data jsou vyjádřena jako průměr relativního množství \pm SD z alespoň dvou experimentů. * $p < 0,05$ = metastatické nádorové buňky z lymfatické uzliny vs. buňky kolorektálního karcinomu.

7 Diskuse

Pěstování buněčných kultur dnes patří mezi rutinní techniky používané v základním a aplikovaném výzkumu i ve výrobě. *In vitro* lze kultivovat řadu buněčných modelů, včetně modelu kolorektálního karcinomu [14].

K získání buněčných kultur z lidských nádorů existuje několik metod (mechanická a enzymatická disociace, separace za pomoci magnetických nanočástic a pomocí hustotního gradientu) [15-17]. Poslední dvě jmenované metody vedou k izolaci pouze určitého typu specifických buněk. Je čím dál více evidentní, že nádorové stroma hraje důležitou roli v invazivitě nádorů nebo se může podílet na lékové rezistenci v tumoru. Důležitým faktorem pro testování patologických procesů je tedy použití směsice buněk.

Námi použitá metoda mechanické disociace zachovává původní vlastnosti buněk, i když je vystavuje relativně velkému mechanickému stresu, který může vést k jejich smrti [18, 19]. Při použití této metody jsou přítomny buňky nádorové a zároveň zachovány podpůrné buňky nádorového stromatu (fibroblasty, endotelie,...). Dochází k relativnímu udržení původního mikroprostředí nádorových buněk, což podporuje jejich růst a proliferaci v porovnání s buněčnými liniemi izolovanými za pomoci jiných metod [10].

Buňky z primárního ložiska kolorektálního karcinomu a buňky z uzlinové metastázy získané od identického pacienta tvoří unikátní model vhodný pro studium nádorové progresie a dalších metastatických vlastností. Pro naše experimenty jsme však ještě hledali model imortalizovaných buněk, díky kterým bychom mohli porovnat dosažené výsledky, chování jednotlivých buněk, morfologické a fenotypové rozdíly obou buněčných typů s izolovanými buňkami. Buněčné linie SW480 (buněčná linie primárního kolorektálního karcinomu) a SW620 (metastáza do lymfatické uzliny) přesně splňovaly naše požadavky [20]. Při porovnávání buněk izolovaných a buněk imortalizovaných bylo nalezeno velké množství rozdílů, pravděpodobně také na základě selekce agresivních klonů během pasážování společně s důležitou rolí podpůrného stromatu v primární kultuře.

Mezibuněčné adheze nebo adheze mezi buňkami a extracelulární matrix hrají důležitou roli v nádorové progresi a rozvoji metastáz, ale také v usídlení buněk v sekundárním ložisku. Adhezní molekuly, jako např. cadheriny, ale i jiné, se podílejí na migraci buněk z nádorové masy. Snížená exprese E-cadherinu bývá často spojována s nádorovou progresí a zvýšenou buněčnou invazivitou [21]. Snížená exprese E-cadherinu společně s cateniny je spojována s dediferenciací, invazivitou a metastázami. Zároveň sníženou expresí E-cadherinu ale i dalších molekul mohou získat epiteliální buňky mezenchymální fenotyp, čímž se stávají více invazivními. Ztráta E-cadherinu a s tím související přechod na N-cadherin je základním předpokladem EMT v kolorektálním karcinomu. V tomto procesu N-cadherin interaguje s nejbližším okolím, čímž usnadňuje invazivitu a metastatický potenciál nádorových buněk. [22]. Při detekci markerů podílejících se na nádorové progresi jsme v našich modelových liniích našli dva případy buněk primárního kolorektálního karcinomu, které vykazovaly zvýšenou expresi E-cadherinu v porovnání s hladinou v buňkách z metastázy do

lymfatické uzliny od téhož pacienta. U většiny testovaných vzorků byla pozorována zvýšená migrace zejména u buněk izolovaných z uzlinových metastáz, ve dvou případech byla však migrační aktivita vyšší u buněčných kultur z primárního nádoru. Buňky z metastázy ve většině případů migrovaly agresivněji než buňky izolované z primárního karcinomu, což koresponduje s výsledky exprese E- a N-cadherinu na úrovni mRNA i proteinu. N-cadherin byl zvýšeně exprimován zejména v buňkách izolovaných z uzlinové metastázy, zatímco zvýšené hladiny E-cadherinu byly prokázány u buněk z primárního karcinomu [22].

Dalšími důležitými molekulami, podílejícími se na nádorové progresi jsou matrixové metaloproteinázy (MMP). Jedná se o proteolytické enzymy degradující kolagen v ECM a složky bazální membrány jako např. kolagen typu IV, proteoglykany, elastin, laminin a fibronectin. V maligních nádorech je zvýšená exprese MMP spojena se zvýšenou proteolýzou. Exprese MMP na povrchu invazivního tumoru může zprostředkovat interakci mezi buňkami tumoru a fibroblasty. Zvýšená hladina MMP-9 u kolorektálního karcinomu koreluje s agresivitou tumoru a přítomností metastáz v játrech. MMP-9 hraje důležitou roli v migraci nádorových buněk a metastatických procesech právě u kolorektálního karcinomu [23]. Hladina MMP-9 byla významně vyšší u metastatických SW620 v porovnání s buňkami SW480. Zatímco hladina další MMP, MMP-2, byla změněna minimálně. Zvýšená exprese MMP-2 a MMP-9 byla překvapivě zjištěna v buňkách primárního kolorektálního karcinomu, ve všech testovaných vzorcích. Rozdíly pravděpodobně reflektují změny mezi immortalizovanými buněčnými liniemi a buňkami izolovanými z nádorových tkání, které mohou být ovlivněny buňkami okolního stromatu [24].

Mezi významné regulátory genové exprese a to jak v procesech fyziologických, tak i patologických patří mikroRNA. Během posledních několika let je čím dál jasnější, že miRNA hrají klíčovou roli také v iniciaci a progresi kolorektálního karcinomu. Specifické miRNA mohou mít jak supresivní tak podpůrný efekt závislý na buněčném prostředí, ve kterém miRNA vznikají [25]. Např. miR-21 je velmi dobře prostudovaná „onkomiRNA“, která slouží jako marker horší prognózy u různých typů karcinomů včetně karcinomu prsu, jater, plic a také u kolorektálního karcinomu [26]. Kromě toho je zvýšená hladina miR-21 spojována s nižší chemosenzitivitou a špatnou odpovědí na chemoterapii u pacientů s kolorektálním a plicním karcinomem, zatímco inhibice miR-21 může zlepšit odpověď na chemoterapii [27, 28]. V našich experimentech byla miR-21 zvýšeně exprimována zejména ve vzorcích s vyšším migračním potenciálem. Exprese další miRNA, miR-31, která je schopná inhibovat lokální invazi, intravaskulární přežití a metastatické kolonizace, byla již dříve popsána v mnoha typech nádorů jako např. u karcinomu prsu, prostaty, ovaríí, žaludku, močového měchýře, u kolorektálního karcinomu, hepatocelulárního karcinomu, karcinomu hlavy a krku nebo dlaždicového karcinomu jazyka [29, 30]. V našich experimentech byla miR-31 zvýšeně exprimována pouze v jednom testovaném vzorku a to u buněk odvozených z primárního kolorektálního karcinomu. Velmi důležitým regulátorem genové exprese je rodina miR-200a, která působí na celou řadu procesů týkajících se buněčné migrace a invazivity. Genovou expresi markerů, podílejících se na těchto procesech reguluje přes ZEB1/2 v různých typech nádorů. Inhibice miR-200a působí snížení hladiny E-cadherinu, zatímco dochází ke zvýšení hladiny vimentinu a zároveň je podpořena buněčná motilita [31].

Naše studie ukázala ve dvou případech korelaci mezi snížením hladiny miR-200a v buňkách primárního kolorektálního karcinomu a zvýšením hladiny E-cadherinu. U linie kolorektálního karcinomu, ve které byla zjištěna nejvyšší schopnost migrace buněk, byla hladina miR200a významně zvýšena. Další důležitým regulátorem u pacientů s kolorektálním karcinomem je miR-29a, jejíž zvýšená hladina byla prokázána v séru pacientů s kolorektálním karcinomem [31]. Stejně tak naše buňky získané z primárního kolorektálního karcinomu vykazovaly významně vyšší hladinu miR-29a u většiny testovaných vzorků. Množství miRNA u kolorektálního karcinomu je spojena s prognózou a terapeutickou odpovědí. Všechny námi testované mikroRNA vykazovaly výraznou variabilitu, která však korelovala s expresí markerů týkajících se invazivity a metastazování, jako např. vimentinem a E-cadherinem.

Pokroky v chemoterapii a radioterapii významně zlepšují přežití pacientů. Nicméně pokročilý nebo relabující kolorektální karcinom je stále obtížně léčitelný pomocí konvenční systémové léčby, proto je potřeba nastavit lepší terapeutické podmínky [32]. 5-FU a leukovorin s kombinací s oxaliplatinou se běžně používají pro adjuvantní a paliativní chemoterapii kolorektálního karcinomu [33, 34]. Pozitivní cytotoxický efekt irinotekanu a oxaliplatinu *in vitro* byl již několikrát testován na různých buněčných liniích, jejich citlivost se ale vždy liší [35, 36]. Pilotní data našich experimentů na izolovaných buněčných liniích ukázaly vyšší účinnost irinotekanu na metastatické buňky v koncentracích srovnatelných s koncentracemi používanými u imortalizovaných buněčných linií. Oxaliplatinu působila toxicky pouze ve vyšších koncentracích u metastatických buněk izolovaných z lymfatické uzliny resp. buněk z kolorektálního karcinomu (IC₅₀=48,23, resp. 52,23 µg/ml). Do těchto výsledků se může promítnout celá řada faktorů, jako je např. různá exprese mikroRNA, markerů invazivity, mutace genů, či různá diferenciací a lokalizace tumoru [37].

V posledních letech cílená terapie reprezentuje nový přístup léčby pacientů s kolorektálním karcinomem, ale také slibný prostor pro výzkum molekulárních mechanismů zodpovědných za nádorovou progresi. Inhibice růstu buněk kolorektálního karcinomu linií Caco2 a HT-29 byla pozorována po 48 hodinách expozice 40 µg/µl koncentraci těchto léčiv, ale pouze v experimentech u kterých bylo léčivo přidáno k nasazované buněčné suspenzi. Podání cílené terapie za použití stejných podmínek jako pro konvenční chemoterapii nemělo žádný efekt na buněčnou proliferaci [38]. Námi izolované buněčné linie nereagovaly na použitou biologickou léčbu (bevacizumab, cetuximab, panitumumab). Efekt bevacizumabu na buněčnou linii, vzhledem k jeho působení na nádorovou angiogenezi, je pravděpodobně minimální. V primokulturách nepochybně jsou endoteliální buňky, které mohou uvolňovat některé působky, nicméně nezprostředkovávají zde nové cévní zásobení nebo přísun živin jako tumoru *in vivo*. Absence cytotoxického působení cetuximabu a panitumumabu je lépe vysvětlitelná. Cetuximab a panitumumab je používán v podstatě výhradně v kombinaci s konvenční chemoterapií a na jejich terapeutickém efektu se jistě spolupodílí i nádorové stroma a protinádorová (zejména buněčná) imunita organismu.

V další části studie jsme se zaměřili na studium procesu EMT v našich buněčných liniích. EMT bývá popsána jako klíčový proces růstu maligních tumorů, zvýšené invazivity a

tvorby metastáz. V případě kolorektálního karcinomu je fenomén EMT znám víc než 20 let. Velmi často se v odborných pracích setkáváme s heterogenitou existující v souvislosti s procesem EMT uvnitř tumorů. Existence různých spekter EMT fenotypů je důvodem, proč je čím dál složitější detekce EMT markerů a predikce vývoje a biologického chování tumoru.

Nádor může být produktem svého mikroprostředí. Role nádorového mikroprostředí a EMT v tvorbě a rozvoji tumoru je zprostředkována dvěma důležitými mechanismy. První je ten, že fibroblasty usnadňují proliferaci buněk v okrajových částech tumoru a podporují EMT progresi za pomoci faktorů jako je IL-6 [39] nebo Tcf21 [40]. Druhý mechanismus je ten, že léčba pomocí chemoterapeutik mění nádorové mikroprostředí, které podporuje EMT proces a chemorezistenci nádorových buněk.

Na základě těchto faktů byla další část naší studie navržena tak, že byla nejprve charakterizována přítomnost EMT markerů a jejich role v buněčných liniích získaných z nádorové tkáně pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Po otestování širšího spektra buněčných kultur na citlivost k irinotekanu a oxaliplatině jsme se zaměřili na ty, které vykazovaly výrazně vyšší, či naopak výrazně nižší citlivosti k testovaným chemoterapeutikům a byly získány ze vzorků z nízkce diferencovaných tumorů (G3) a s vyšší pokročilostí primárního tumoru (T3, resp. T4a). Dále jsme porovnávali vliv irinotekanu a oxaliplatinu na biologické chování a expresi EMT markerů v těchto buňkách. Naše získaná data jsou v souladu s akceptovaným konceptem EMT a její role v růstu a invazivitě kolorektálního karcinomu, nicméně vykazují určitou variabilitu. Imunohistochemická analýza ukazuje spíše konzistentní expresi E-cadherinu ve všech analyzovaných vzorcích, přítomnost N-cadherinu a vimentinu v metastatických maligních buňkách je patrná pouze v jednom z testovaných vzorků. Na druhou stranu pokud porovnáme buněčné linie s původní tkání, ze které byly izolovány, metastázy z regionálních uzlin vykazují zvýšenou expresi E-cadherinu, vimentinu a MMP. Toto zvýšení však již není patrné u N-cadherinu a nebylo spojeno ani se zvýšenou motilitou buněk.

Mezi vnitřní faktory podílejících se na plasticitě buněk patří nekódující RNA, miRNA. V kolorektálním karcinomu bylo popsáno několik miRNA, které jsou abnormálně exprimovány [41 - 44], mezi jinými miR-21, miR-135a a miR-135b, které mají protumorigenní efekt [41, 43]. V první části studie bylo otestováno několik mikroRNA zapojených do nádorové progresi u kolorektálního karcinomu. Pro naše další testování jsme se již zaměřili pouze na hladiny miR-21, miR-29a a miR-200a. Tyto miRNy byly v našich experimentech nalezeny v nízkých hladinách u metastatických buněk v porovnání s buňkami z primárního kolorektálního karcinomu, což odpovídá jejich roli v EMT regulaci, přesněji přes změny v expresi E-cadherinu a/nebo expresi MMP-2. Navíc MMP-9, která je také zapojena do procesu EMT, negativně korelovala s miR-29a ve všech testovaných vzorcích. Další zajímavý trend byl zřejmý v případě zvýšené hladiny miR-21, což korelovalo s vyšší expresí vimentinu na úrovni mRNA i proteinu. Celkově tato data potvrzují existenci EMT v buňkách získaných z metastázy do lymfatické uzliny. Rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou patrné a to nejen co se týče exprese EMT markerů, což odpovídá intra- a internádorové heterogenitě.

V další části naší studie jsme porovnávali účinek irinotekanu a oxaliplatinu na biologické chování a expresi EMT markerů v párových buněčných liniích kolorektálního karcinomu. Obě použítá chemoterapeutika snižovala motilitu a migrační aktivitu metastatických buněk, přičemž irinotekan působil na tyto buňky účinněji. Významné změny v expresi EMT markerů byly v ovlivněných buňkách znatelné. Zatímco zjištěný inhibiční efekt na expresi N-cadherinu byl konzistentní ve všech testovaných liniích a to zejména na úrovni proteinu, hladina E-cadherinu se mezi jednotlivými vzorky lišila. U některých vzorků došlo ke zvýšené expresi E-cadherinu na úrovni proteinu u buněk získaných z metastaticky postižené lymfatické uzliny, u některých byla patrna vyšší, nebo srovnatelná exprese s buňkami získanými z primárního tumoru. Hladina vimentinu nebyla dokonce změněna vůbec. Dynamické změny fenotypu nádorových buněk a exprese výše zmíněných markerů souvisí s probíhající EMT, respektive MET (mesenchymálně-epiteliální tranzice), které umožňují trvalý růst nádoru a jeho šíření. Významný vliv má i podpůrné stroma, které se na těchto mechanismech podílí [45].

Zajímavé bylo to, že potlačení exprese N-cadherinu korelovalo se sníženou migrační aktivitou buněk po ovlivnění irinotekanem i oxaliplatinou. Tyto výsledky podporují naše předchozí zjištění, ve kterých vyšší migrační potenciál odpovídal vyšší hladině N-cadherinu. Změna E-cadherinu na N-cadherin bývá často pozorována u agresivních nádorů a exprese N-cadherinu je často spojována s migrací transformovaných epiteliálních buněk [46]. Naše experimenty ukázaly, že účinek irinotekanu a oxaliplatinu se může podílet na snížení migračního potenciálu buněk.

Celkem vzato, naše výsledky vykazují výraznou variabilitu, nejen v citlivosti na použítá chemoterapeutika, ale také variabilitu v expresi EMT markerů na všech našich studovaných vzorcích, stejně tak jejich změny v expresi po ovlivnění chemoterapeutiky. Tato variabilita je pravděpodobně výsledkem rozdílného stagingu, gradingu a interindividuální heterogenity vzorků, ale také rozdílem v dynamice EMT procesů. Zatímco buňky izolované z primárních tumorů získaly mezenchymální charakteristiky schopné invadovat a metastazovat, metastatické buňky tyto charakteristiky ztrácely a vracely se ke svému původnímu fenotypu, nazývanému mezenchymálně-epiteliální tranzice (MET). Jiným důvodem pozorované variability může být také intratumorální heterogenita a přítomnost fibroblastů asociovaných s tumorem a dalších typů buněk, které zůstaly zachovány z důvodu použití mechanické disociace nádorových vzorků. I když tento přístup přináší některé komplikace, tak na druhou stranu přispívá k pochopení procesů, které se podílí na nádorové progresi na experimentální úrovni, protože zachovává původní složení nádorové tkáně, což lépe odráží situaci *in vivo*.

8 Závěr

V disertační práci jsem se zabýval studiem buněčných linií z kolorektálního karcinomu a jeho metastázy do regionální lymfatické uzliny, jejich charakterizací na úrovni mikroRNA, mRNA a proteinů a testováním jejich citlivosti k běžně používaným chemoterapeutikům. Dosažené výsledky lze shrnout do následujících závěrů:

Pro izolaci buněčných kultur z kolorektálního karcinomu a jeho metastázy do regionální lymfatické uzliny byla zvolena jednoduchá, nenákladná metoda založená na mechanické disociaci. Celkově byly získány resekáty od 60-ti pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva. Naším záměrem bylo odebrat z každého resekátu jeden vzorek z primárního tumoru a jeden vzorek z lymfatické uzliny. Z primárních tumorů bylo získáno 58 vzorků. 36 vzorků bylo získáno z regionálních lymfatických uzlin. Z primárních nádorů bylo získáno 26 primokultur s úspěšností 45 % (26/58); z odebraných lymfatických uzlin bylo získáno 17 primokultur s úspěšností 47 % (17/36). Téměř polovina odebraných lymfatických uzlin však nebyla histologicky metastaticky postižena. Reálná úspěšnost izolace buněčných kultur z metastaticky postižených lymfatických uzlin byla vyšší; 74 % (14/19). Izolace buněčných kultur z primárního tumoru a zároveň i z lymfogenní metastázy se podařila v deseti případech. Nejefektivnější izolace nádorových buněk z primárního tumoru byla pozorována u níže diferencovaných tumorů (Grade 3) a u lokálně pokročilých tumorů (T3 a T4a,b). Tumory s histologicky zjištěnou angioinvasí a perineurálním šířením byly spojeny s vyšší úspěšností izolace, zejména u linií z lymfogenních metastáz. Nejúspěšnější izolace nádorových buněk z lymfogenních metastáz byla zaznamenána u vzorků s vyšší lokální pokročilostí tumoru (T3 a T4a,b) a u nádorů s postižením většího počtu lymfatických uzlin.

Monoklonální protilátky se ukázaly jako neefektivní pro náš testovaný model, proto jsme se zaměřili na testování oxaliplatinu a irinotekanu. Citlivost jednotlivých buněčných linií k oběma testovaným chemoterapeutikům se významně lišila. Tato variabilita je pravděpodobně výsledkem rozdílného stagingu, gradingu a interindividuální heterogenity vzorků. Dalším důvodem může být přítomnost fibroblastů asociovaných s tumorem a dalších typů buněk, které zůstaly zachovány z důvodu použití mechanické disociace nádorových vzorků.

Porovnáváním účinku irinotekanu a oxaliplatinu na biologické chování a expresi EMT markerů v párových buněčných liniích kolorektálního karcinomu bylo zjištěno, že obě použítá chemoterapeutika snižovala motilitu a migrační aktivitu metastatických buněk, přičemž irinotekan působil na tyto buňky účinněji.

V testovaných buněčných liniích byly dále pozorovány významné korelace mezi hladinami mikroRNA, expresí EMT markerů a biologickým chováním testovaných buněčných linií, i když se mezi jednotlivými vzorky projevovala výrazná heterogenita. Nejen že se množství mikroRNA lišilo mezi buňkami metastatickými a buňkami získanými z primárního nádoru. U miR-21, miR-200a a miR-29a byly navíc zjištěny významné regulace exprese E-cadherinu, vimentinu a také změny v buněčné motilitě.

Dosažené výsledky doplňují a rozšiřují základní poznatky o vlastnostech a chování buněčných linií získaných z kolorektálního karcinomu a regionální lymfatické uzliny a popisují mechanismy, jimiž nádorové buňky překonávají buněčnou smrt. I když námi zvolený postup izolace přináší některé komplikace, přispívá k pochopení procesů, které se podílí na nádorové progresi na experimentální úrovni, protože zachovává původní složení nádorové tkáně, čímž lépe odráží situaci *in vivo*, což by mohlo v budoucnu zefektivnit léčebné strategie používané k léčbě kolorektálního karcinomu. Pro posouzení potencionálního přínosu však bude zapotřebí více experimentů na širším spektru vzorků.

9 Použitá literatura

1. *Epidemiologie kolorektálního karcinomu*, www.svod.cz (staženo 20.8.2017).
2. Bosman FT, C.F., Hruban RH, Theise ND, et al., *WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4th (edn)*. Lyon: IARC Press, 2010: p. 134-146.
3. *Colon cancer - symptoms and causes*, <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/dxc-20188239> (Staženo, 28.8.2017).
4. Suchanek, S., et al., *Colorectal cancer prevention in the Czech Republic: time trends in performance indicators and current situation after 10 years of screening*. Eur J Cancer Prev, 2014. **23**(1): p. 18-26.
5. *Modrá kniha České onkologické společnosti*. Vol. 23. aktualizace. 2017: Masarykův onkologický ústav.
6. *Protokol pro léčbu karcinomu tlustého střeva - Klinika onkologie a radioterapie FNHK*, Editor. verze 2013.
7. Hu, T., et al., *Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies*. World Journal of Gastroenterology, 2016. **22**(30): p. 6876-6889.
8. Vejražka, M. *Buněčné kultury - Bioprojekty* <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf> (staženo 10.10. 2017).
9. Cree, I.A., *Isolation and culture of colon cancer cells and cell lines*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* I.A. Cree, Editor. 2011. p. 135-140.
10. Glaysher, S. and I.A. Cree, *Principles of cancer cell culture*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* I.A. Cree, Editor. 2011. p. 13-26.
11. Gheldof, A. and G. Berx, *Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **116**: p. 317-36.
12. Matejka, V.M., J. Finek, and M. Kralickova, *[Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Tissue and Its Role for Metastatic Spread of Cancer]*. Klin Onkol. **30**(1): p. 20-27.
13. Andreoli, S.C.d.S., et al., *Use of microRNAs in directing therapy and evaluating treatment response in colorectal cancer*. Einstein, 2014. **12**(2): p. 256-258.
14. Freshney, R.I., *Primary Culture*, in *Culture of Animal Cells*. 2010, John Wiley & Sons, Inc. p. 163-186.
15. Chougule, P., et al., *Isolation and characterization of human primary enterocytes from small intestine using a novel method*. Scand J Gastroenterol, 2012. **47**(11): p. 1334-43.
16. Loret, S., et al., *Preliminary characterization of jejunoocyte and colonocyte cell lines isolated by enzymatic digestion from adult and young cattle*. Res Vet Sci, 2009. **87**(1): p. 123-32.
17. Rusu, D., et al., *Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures*. BMC Cell Biol, 2005. **6**: p. 42.
18. Mitra, A., L. Mishra, and S. Li, *Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy*. Trends in biotechnology, 2013. **31**(6): p. 347-354.
19. Ljung, B.M., et al., *Cell dissociation techniques in human breast cancer--variations in tumor cell viability and DNA ploidy*. Breast Cancer Res Treat, 1989. **13**(2): p. 153-9.
20. Hewitt, R.E., et al., *Validation of a model of colon cancer progression*. J Pathol, 2000. **192**(4): p. 446-54.

21. Nakajima, S., et al., *N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4125-33.
22. Tsanou, E., et al., *The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach*. Anticancer Res, 2008. **28**(6A): p. 3815-26.
23. Zhang, Y.Y., B. Chen, and Y.Q. Ding, *Metastasis-associated factors facilitating the progression of colorectal cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(6): p. 2437-44.
24. Zucker, S. and J. Vacirca, *Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 101-17.
25. Schetter, A.J., H. Okayama, and C.C. Harris, *The role of microRNAs in colorectal cancer*. Cancer J, 2012. **18**(3): p. 244-52.
26. Chen, H., et al., *Evaluation of Plasma miR-21 and miR-152 as Diagnostic Biomarkers for Common Types of Human Cancers*. J Cancer, 2016. **7**(5): p. 490-9.
27. Kheirelseid, E.A.H., et al., *Clinical applications of gene expression in colorectal cancer*. J Gastrointest Oncol, 2013. **4**(2): p. 144-57.
28. Slaby, O., et al., *MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application*. Molecular Cancer, 2009. **8**(1): p. 102.
29. Triulzi, T., et al., *microRNA: New Players in Metastatic Process*. Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic. 2013.
30. Wang, J., et al., *Cronkhite-Canada syndrome associated with colon cancer metastatic to liver: A case report*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(38): p. e7466.
31. Chan, S.H. and L.H. Wang, *Regulation of cancer metastasis by microRNAs*. J Biomed Sci, 2015. **22**: p. 9.
32. Berrino, F., et al., *Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–99: results of the EURO CARE-4 study*. The Lancet Oncology, 2007. **8**(9): p. 773-783.
33. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803*. J Clin Oncol, 2007. **25**(23): p. 3456-61.
34. Van Cutsem, E., et al., *Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3*. J Clin Oncol, 2009. **27**(19): p. 3117-25.
35. Arnould, S., et al., *Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines*. Eur J Cancer, 2003. **39**(1): p. 112-9.
36. Ikehata, M., et al., *Different Effects of Epigenetic Modifiers on the Cytotoxicity Induced by 5-Fluorouracil, Irinotecan or Oxaliplatin in Colon Cancer Cells*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2014. **37**(1): p. 67-73.
37. O'Connell, M.J., *Oxaliplatin or irinotecan as adjuvant therapy for colon cancer: the results are in*. J Clin Oncol, 2009. **27**(19): p. 3082-4.
38. Luca, T., et al., *In vitro combined treatment with cetuximab and trastuzumab inhibits growth of colon cancer cells*. Cell Prolif, 2014. **47**(5): p. 435-47.
39. Guan, J., et al., *Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells*. Cancer Lett, 2014. **345**(1): p. 132-9.
40. Acharya, A., et al., *The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors*. Development, 2012. **139**(12): p. 2139-49.
41. Bandres, E., et al., *Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 29.
42. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(12): p. 882-91.

43. Nagel, R., et al., *Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(14): p. 5795-802.
44. Shi, B., et al., *Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(45): p. 32582-90.
45. Brabletz, T., et al., *Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin*. *Cells Tissues Organs*, 2005. **179**(1-2): p. 56-65.
46. Shih, W. and S. Yamada, *N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 15): p. 3661-70.

10 Publikační činnost autora

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise:

- 1) Krbal L., Hanušová V., Soukup J., John S., Matoušková P., Ryška A.: Contribution of in vitro comparison of colorectal carcinoma cells from primary and metastatic lesions to elucidation of mechanisms of tumor progression and response to anticancer therapy. *Tumor Biol.*, 2016, 37, 9565-9578. (*IF* = 2.926)
- 2) Krbal L., Soukup J., John S., Hanušová V.: Derivation and basic characterization of colorectal carcinoma primary cell lines. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017 Dec;161(4):360-368. (*IF* = 1,113)
- 3) Skarková V., Králová V., Krbal L., Matoušková P., Soukup J., Rudolf E.: Oxaliplatin and irinotecan induce heterogenous changes in the EMT markers of metastasizing colorectal carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2018 Aug 15;369(2):295-303. (*IF* = 3.309)
- 4) Šteiner I., Krbal L., Rozkoš T., Harrer J., Laco J.: Calcific aortic stenosis: immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate. *Research and Practice*, 2012, 231-234. (*IF* = 1,466)

Ostatní práce v impaktovaném časopise:

- 5) Žáček P., Omran N., Chek J.L., Krbal L., Vojáček J., Harrer J.: Cardiac sarcoidosis. *J Card Surg.* 2013 Sep;28(5):525-8. (*IF* = 1.179)
- 6) Omran N., Laco J., Krbal L., Vojáček J., Mand'ák J.: Isolated thoracic aortitis. *J. Card. Surg.*, 2014, 29, 2, s. 225-230. (*IF* = 1,179)

Ostatní práce v recenzovaných neimpaktovaných časopisech:

- 7) Šteiner I., Krbal L., Dominik J.: Blood vessels and lymphatics in calcific aortic stenosis – in support of its inflammatory pathogenesis. *Česko-slovenská patologie a soudní lékařství*, 2010, roč. 46, č. 2, s. 33-36.
- 8) Rozkoš T., Ryška A., Nová M., Hornychová H., Krbal L., Matěj R., Laco J.: Identification of an optimal algorithm for effective diagnostics of non-small cell lung cancer with ALK gene rearrangement - implementation of the method and practical experiences with routine diagnostics. *Česko-slovenská patologie a soudní lékařství*, 2017, roč. 53, s. 89-96.

Přednášky na odborných setkáních

1. 16. seminář mladých patologů a 40. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl, 5.-6.4.2013, sklíčkový seminář, **Epiteloidní leiomyom**.
2. 17. seminář mladých patologů a 41. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl 11.-12.4.2014, sklíčkový seminář, **Epiteloidní angiosarkom s ložisky připomínající epiteloidní hemangioendoteliom**.
3. 18. seminář mladých patologů a 42. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl, 17.-18.4.2015, sklíčkový seminář, **Chondrooseální hamartom s respiračním epitelem (CORE)**.
4. 19. seminář mladých patologů a 43. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl, 22.-23.4.2016, sklíčkový seminář, **Atypický thymom typu A**.
5. 4th Pannonia Congress of Pathology, Osijek, Chorvatsko, 12.-14.5.2016, slide seminar, **Atypical thymoma type A**.
6. 20. seminář mladých patologů a 44. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl, 31.3.-1.4.2017, sklíčkový seminář, **Nekompaktní kardiomyopatie**.
7. 21. seminář mladých patologů a 45. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl, 5.-6.4.2019, sklíčkový seminář, **Angiomyomatózní hamartom lymfatické uzliny a ITC maligního melanomu**

Plakátová sdělení na odborných setkáních

1. **Soukup J., Krbal L., Skarková V.:** Circadian clock proteins expression in primary cell cultures of metastatic colorectal carcinoma and its relationship with chemosensitivity to oxaliplatin a irinotecan – pilot study. Mechanisms to Therapies: Innovations in Cancer metabolism. 9.-11.10.2018. Bilbao, Španělsko.
2. **Skarková V., Krbal L., Soukup J., Skarka A.:** The role of E-cadherin in metabolism of irinotecan and oxaliplatin in colorectal cancer cells. Mechanisms to Therapies: Innovations in Cancer metabolism. 9.-11.10.2018. Bilbao, Španělsko
3. **Gregová M., Němejcová K., Dundr P., Bártů M., Tichá I., Hojný J., Mára M., Boudová B., Laco J., Krbal L.:** Leiomyoma with bizarre nuclei. A study of 108 cases focusing on clinicopathological features, morphology, and fumarate hydratase alterations. 30th European Congress of Pathology, Pathology: Path to Precision medicine, 8.–12.9.2018, Bilbao, Španělsko
4. **Hanušová V., Krbal L., Soukup J., John S., Rudolf E.:** Role of E-cadherin in metastatic colorectal cancer treatment; 3rd MAP 2017 – Molecular Analysis for Personalised Therapy. 13.–14.10.2017, Curych, Švýcarsko
5. **Hanušová V., Krbal L., Soukup J., Stefanidi A., Rudolf E.:** Role E-kadherinu v léčbě metastatického kolorekálního karcinomu; XXIX. Xenobiochemické sympozium. 23.-26.5.2017, Telč, Česká republika
6. **Hanušová V., Matoušková P., Krbal L., Soukup J., John S., Ryška A.:** MicroRNAs as a marker for elucidation of mechanisms of tumor progression in colorectal carcinoma cells from primary and metastatic lesions; 6th Clinical Epigenetics Society (CLEPSO) International Meeting, 3.-4.3.2016, Düsseldorf, Německo

