

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biologie a patologie buňky

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta

**Mgr. Karolína Strnadová**

Fenotyp melanocytů za fyziologických a patologických podmínek

Phenotype of melanocytes under physiological and pathological conditions

Disertační práce

Školitel: MUDr. Lukáš Lacina, Ph.D.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.7.2022

Karolína Strnadová

Podpis

Identifikační záznam:

STRNADOVÁ, Karolína. *Fenotyp melanocytů za fyziologických a patologických podmínek. [Phenotype of melanocytes under physiological and pathological conditions]*. Praha, 2022. Počet stran 112, bez příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav. Školitel Lacina, Lukáš.

## Abstrakt

Neopomenutelnými reprezentanty buněčných populací kůže, kromě dominantních keratinocytů a fibroblastů, jsou také melanocyty. Melanocyty jsou pigmentové buňky, jejichž primární funkcí je produkce pigmentu melaninu, který je důležitý pro ochranu keratinocytů před škodlivým ultrafialovým zářením. Nadměrné vystavení tomuto záření je rizikovým faktorem pro vznik kožních nádorů včetně maligního melanomu kůže, při kterém dochází k patologické transformaci melanocytů v buňky melanomu. Předložená disertační práce pojednává o studiu melanocytů a zaměřuje se na 4 tematické okruhy spojené zejména s jejich patologiemi. V prvním tematickém okruhu je do souvislostí dána zvyšující se incidence maligního melanomu kůže se stárnutím populace. Jednou z příčin se zdá být častější výskyt prozánětlivého ladění tkání ve stárnoucím organismu. Toto ladění připravuje vhodné prostředí pro vývoj nádoru. Druhý tematický okruh se orientuje na nové přístupy, které by mohly rozšířit škálu diagnostických metod pro časnou detekci maligního melanomu. První metodicky využívá detekci prozánětlivých molekul v těle pacienta, např. v době diagnózy. Bylo zjištěno, že vyšší sérové hladiny IL-6 nebo IL-8 korelují s nepříznivou prognózou pacienta. Druhý přístup se opírá o možnosti detekce nádorových buněk a možnosti jejich odlišení od buněk zdravých s využitím metod, jako je povrchem zesílená Ramanova spektroskopie rozšířená o metody umělé inteligence využívající konvolučních neuronových sítí. *In silico* se toto spojení vyznačuje vysokou senzitivitou. Práce třetího tematického okruhu se snaží různými metodami o modelování mikroprostředí melanomu ve 3D, a to jak v *in vitro* podmínkách, tak *in ovo* na chorioalantoidní membráně kuřete. Čtvrtý tematický okruh se zaměřuje na mezibuněčnou komunikaci mezi maligními buňkami melanomu a buňkami mikroprostředí, převážně nádorově-asociovanými fibroblasty. V tomto okruhu je kladen důraz na komunikaci zprostředkovanou extracelulárními váčky – exosomy. Z dosažených dat vyplývá, že exosomy produkované melanomem podporují nádorově-asociované fibroblasty a ty změnou svých vlastností dále podporují progresi nádoru.

## Klíčová slova

Melanocyty, maligní melanom, stárnutí, zánět, mikroprostředí, nádorově-asociované fibroblasty, sféroidy, IL-6, exosomy

## **Abstract**

In addition to the dominant keratinocytes and fibroblasts, melanocytes are also indispensable representatives of skin cell populations. Melanocytes are pigment cells whose primary function is to produce the pigment melanin, which is important for protecting keratinocytes from harmful ultraviolet radiation. Excessive exposure to this radiation is a risk factor for the development of skin tumours, including malignant melanoma of the skin, in which pathological transformation of melanocytes into melanoma cells occurs. The presented thesis focuses on 4 thematic areas associated mainly with malignant melanoma. In the first thematic area, the increasing incidence of malignant skin melanoma is associated with the ageing of the population. One of the reasons seems to be the more frequent occurrence of proinflammatory setting in the ageing organism. It prepares a suitable environment for tumour development. The second thematic area focuses on new approaches that could expand the range of diagnostic methods for the early detection of malignant melanoma. The first approach methodically uses the detection of proinflammatory molecules in the patient's serum. Higher serum levels of IL-6 and IL-8 correlate with an unfavourable patient prognosis. The second approach is based on the possibility of detecting a tumour cell and the possibility of distinguishing it from a healthy cell using methods such as surface-enhanced Raman spectroscopy extended by artificial intelligence methods using convolutional neural networks. *In silico* it seems to be highly sensitive. In the third thematic area there are described various methods to model the melanoma microenvironment in 3D, *in vitro* or *in ovo* using the chorioallantoic membrane of the chicken. The fourth thematic area focuses on intercellular communication between malignant melanoma cells and cells of the tumour microenvironment, predominantly cancer-associated fibroblasts. In this area, emphasis is placed on communication through extracellular vesicles – the exosomes. The data showed that exosomes produced by melanoma change the biological properties of cancer-associated fibroblasts to promote tumour progression.

## **Key words**

Melanocytes, malignant melanoma, ageing, inflammation, microenvironment, cancer-associated fibroblasts, spheroids, IL-6, exosomes

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Lukáši Lacinovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při psaní disertační práce a trpělivost. Ráda bych také vyjádřila upřímný vděk za jeho podporu a čas, který mi v průběhu celého doktorského studia věnoval.

Dále bych ráda poděkovala vedoucímu naší výzkumné skupiny a bývalému přednostovi Anatomického ústavu 1. LF UK, prof. MUDr. Karlu Smetanovi Jr., DrSc., za neocenitelné rady, motivaci, přečtení této práce a jeho připomínky.

Vřele děkuji také RNDr. Barboře Dvořánkové, Ph.D., která mi předala spoustu praktických rad v oblasti tkáňové kultivace a byla mi oporou a člověkem, na kterého se mohu vždy obrátit.

Děkuji také všem kolegům, se kterými jsem mohla spolupracovat. Bez nich by tato disertační práce nevznikla. Speciálně děkuji mým nejbližším kolegům, jmenovitě: RNDr. Pavlu Szabovi, Ph.D., MUDr. Aleši-Janu Pavlíčkovi, MUDr. Michalu Špankovi, MUDr. Lence Peterkové, MUDr. Michaele Tesařové, MUDr. Veronice Bandúrové, MUDr. Štěpánu Novákovi, MUDr. Ondřeji Kodetovi, Ph.D., MUDr. Janu Kučerovi, Ph.D., Heleně Stýblové, Ing. Michalu Kolářovi, Ph.D. a celému jeho týmu a v neposlední řadě Ing. Elišce Drobné Krejčí, Ph.D., která laskavě přečetla rukopis této práce a poskytla mi cennou zpětnou vazbu.

Dík patří také celému kolektivu Anatomického ústavu 1. LF UK, který je místem, kde je radost pracovat.

Na závěr bych chtěla z celého srdce poděkovat mé rodině za celoživotní podporu a lásku. Děkuji tátovi Pavlovi, mámě Olze a bratru Vojtěchovi. Upřímně děkuji také mému partnerovi a mým nejbližším přátelům za jejich pochopení, důvěru a povzbudivá slova.

## Seznam zkratek a jazykové poznámky

Ortografická norma předkládané disertační práce se zejména v případě odborné terminologie odvolává na ustálené formy tak, jak je zachycuje lexikon VOKURKA, Martin, HUGO, Jan a kol. *Velký lékařský slovník*. 10. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, [2015]. Jessenius. ISBN 978-80-7345-456-2. V obecných aspektech sleduje celý text českou jazykovou normu shrnutou v online publikaci *Internetová jazyková příručka* [online] (2008–2021). Praha: Ústav pro jazyk český AV ČR, v. v. i. Cit. 1. 4. 2022. <<https://prirucka.ujc.cas.cz/>>. (Práce používá data, která poskytuje výzkumná infrastruktura LINDAT/CLARIAH-CZ (<https://lindat.cz>) podporovaná Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt č. LM2018101).)

S ohledem na dominantní podíl zejména anglicky psaných literárních zdrojů, ze kterých tato práce vychází, jsou některá v odborné komunitě běžně užívaná slovní spojení ponechána v originálních formách bez pokusu o jejich doslovný převod do češtiny (často násilný a ve výsledku neobvyklý). Cizojazyčný termín takto užitý je odlišen v textu *kurzívou*.

Zkratka	Anglicky	Česky (je-li běžně užíván název)
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>	Americký výbor proti rakovině
AKT	<i>Protein Kinase B</i>	Proteinkináza B
$\alpha$ -MSH	<i><math>\alpha</math>-Melanocyte Stimulating Hormone</i>	$\alpha$ -melanocyty stimulující hormon
$\alpha$ SMA	<i><math>\alpha</math>-Smooth Muscle Actin</i>	$\alpha$ -hladkosvalový aktin
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>	Antigen prezentující buňky
ARF6	<i>Adenosine diphosphate-Ribosylation Factor 6</i>	
Bak	<i>BCL2 Antagonist/Killer</i>	
Bax	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis regulator</i>	
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>	
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>	

BRAF	<i>B-Raf Proto-Oncogene</i>	
CAF	<i>Cancer-associated fibroblasts</i>	Nádorově-asociované fibroblasty
CAM	<i>Chorioallantoic membrane</i>	Chorioalantoidní membrána
CDK4	<i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>	
CDKN2A, též ARF nebo p16 <sup>INK4A</sup> nebo CDK4 inhibitor	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>	
c-Fos	<i>Fos Proto-Oncogene</i>	
c-Jun	<i>Jun Proto-Oncogene</i>	
c-Myc	<i>MYC Proto-Oncogene</i>	
COL1A1	<i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i>	
COL1A2	<i>Collagen Type I Alpha 2 Chain</i>	
COL3A1	<i>Collagen Type III Alpha 1 Chain</i>	
CREB	<i>CAMP Responsive Element Binding Protein 1</i>	
CXCL1	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>	
CXCL8 (též IL-8)	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 (Interleukin 8)</i>	
CXCR1	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 1</i>	
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4</i>	
DCT, též TYRP2	<i>Dopachrome Tautomerase</i>	Dopachrom tautomeráza
DHI	<i>5,6-dihydroxyindole</i>	5,6-dihydroxyindol
DHICA	<i>5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid</i>	5,6-dihydroxyindol-2- karboxylová kyselina
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>	Extracelulární matrix
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	Epidermální růstový faktor
ELK1	<i>ETS-Like Gene 1</i>	
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>	Epitelo-mezenchymový přechod



ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>	Komplex endosomálního třídění potřebného pro transport
FAP	<i>Fibroblast Activation Protein</i>	Fibroblastový aktivační protein
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i>	Fetální bovinní sérum
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>	Fibroblastový růstový faktor 2
GDP	<i>Guanosindifosfát</i>	
GEF	<i>Guanosine Exchange Factor</i>	
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>	
GNA11	<i>G protein Subunit Alpha 11</i>	
GNAQ	<i>G protein Subunit Alpha Q</i>	
Gp130	<i>Membrane Glycoprotein 130</i>	
GPER	<i>G protein-coupled Estrogen Receptor</i>	
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound protein 2</i>	
HDF	<i>Human Dermal Fibroblasts</i>	Lidské dermální fibroblasty
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>	Hepatocytární růstový faktor
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>	Transkripční faktor indukovaný hypoxií
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>	
HMGB1	<i>High Mobility Group Box-1</i>	
ID1	<i>Inhibitor of Differentiation 1</i>	
IF	<i>Impact Factor</i>	Impakt faktor
IFN $\alpha$ 2b	<i>Interferon-<math>\alpha</math>-2b</i>	
IFN- $\gamma$	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i>	
IL-1	<i>Interleukin-1</i>	
IL-1 $\alpha$	<i>Interleukin-1<math>\alpha</math></i>	
IL1RA	<i>Interleukin 1 Receptor Antagonist</i>	
IL-2	<i>Interleukin-2</i>	

IL-6	<i>Interleukin-6</i>	
IL-10	<i>Interleukin-10</i>	
IL-13	<i>Interleukin-13</i>	
IL-17	<i>Interleukin-17</i>	
IL-18	<i>Interleukin-18</i>	
IL-33	<i>Interleukin-33</i>	
JAK2/STAT3	<i>Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>	
JDF	<i>Juvenile Dermal Fibroblasts</i>	Juvenilní dermální fibroblasty (z neozářené části kůže dítěte)
Ki-67	<i>Marker of Proliferation Ki-67</i>	
KIT, též c-Kit nebo CD117	<i>KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine kinase</i>	
KSR1	<i>Kinase Suppressor Of Ras 1</i>	
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i>	Laktátdehydrogenáza
L-DOPA	<i>3,4-dihydroxyphenylalanine</i>	3,4-dihydroxyfenylalanin
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>	
MALAT1	<i>Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript</i>	
MAPK/ERK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracelullar signal-Regulated Kinase</i>	Mitogenem aktivovaná proteinkináza/Extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza
MC1R	<i>Melanocortin 1 Receptor</i>	
mCAF	<i>Cancer-associated fibroblasts isolated from malignant melanoma</i>	Nádorově-asociované fibroblasty izolované z maligního melanomu
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>	Mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza
Melan-A (MART-1)	<i>Melanoma Antigen Recognized by T-Cells 1</i>	

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>	Hlavní histokompatibilní komplex
MIP-1β	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 4</i>	
miRNA, též miR	<i>MicroRNA</i>	
MITF	<i>Melanocyte Inducing Transcription Factor</i>	
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>	Matrix metaloproteináza
MTT		3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
MVB	<i>Multivesicular body</i>	Multivesikulární tělísko
NEAT1	<i>Nuclear Enriched Abundant Transcript 1</i>	
NF-1	<i>Neurofibromin 1</i>	
NK	<i>Natural Killer cells</i>	Přirození zabíječi
NKG2D	<i>Killer Cell Lectin Receptor K1</i>	
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>	
p21 <sup>Waf1</sup>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>	
p27 <sup>kip1</sup>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B</i>	
p53	<i>Tumour protein P53</i>	
PAX3	<i>Paired Box 3</i>	
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>	Pufrovaný fyziologický roztok
PD-1	<i>Programmed Cell Death 1</i>	
PDF	<i>Photo-damaged Dermal Fibroblasts</i>	Dermální fibroblasty z fotoexponované kůže (seniorního dárce)
PD-L1	<i>Programmed Cell Death-1 Ligand 1</i>	

PD-L2	<i>Programmed Cell Death 1 Ligand 2</i>	
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>	
PGF2	<i>Prostaglandin F2</i>	
PI3K	<i>Phosphoinositol-3-Kinase</i>	Fosfoinositol-3-kináza
Pmel17, též gp100 nebo HMB-45	<i>Premelanosome Protein</i>	
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>	
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>	
RAL	<i>Ras-like protein</i>	
RANTES	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 5</i>	
RAS	<i>Rat Sarcoma gene</i>	
RASSF1	<i>Ras association domain family 1</i>	Reaktivní formy kyslíku
RTK	<i>Tyrosine Kinase Receptor</i>	Tyrosinkinázový receptor
S100A	<i>S100 Calcium Binding Protein A</i>	
S100B	<i>S100 Calcium Binding Protein B</i>	
SASP	<i>Senescent-Associated Secretory Phenotype</i>	Sekreční fenotyp sdružený se senescencí
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>	
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>	Těžká kombinovaná imunodeficience
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>	Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
Snail 2	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 2</i>	
SOD2	<i>Superoxide Dismutase 2</i>	Superoxid dismutáza 2
SOS	<i>Son Of Sevenless</i>	
SOX10	<i>SRY-Box Transcription Factor 10</i>	
SPF	<i>Sun Protection Factor</i>	Ochranný faktor proti slunci
TCR	<i>T-cell Receptor</i>	T-buněčný receptor
TEX	<i>Tumor-derived Exosomes</i>	Nádorově asociované exosomy

TGF $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>	
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase</i>	Tkáňové inhibitory matrix metaloproteináz
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	
TRAIL	<i>Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>	
TYR	<i>Tyrosinase</i>	Tyrosináza
TYRP1	<i>Tyrosinase-Related Protein 1</i>	Tyrosináze příbuzný protein 1
UV	<i>Ultraviolet (light)</i>	Ultrafialové (světlo)
ÚZIS		Ústav zdravotnických informací a statistiky
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>	Vaskulární endotelový růstový faktor A
VEGFR1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i>	Receptor 1 pro vaskulární endotelový růstový faktor
xCT	<i>Cystine/Glutamate Transporter</i>	Cystin-glutamátový transporter
ZEB2	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2</i>	

## Seznam obrázků a tabulek

- Obr. 1** Schématické znázornění řezu kůže.
- Obr. 2** Stratifikace epidermis na histologickém preparátu.
- Obr. 3** Vliv UV záření na kůži.
- Obr. 4** Rezervoár kmenových buněk melanocytů v kůži.
- Obr. 5** Pigmentové buňky kůže.
- Obr. 6** Zrání melanosomů.
- Obr. 7** Syntéza eumelaninu.
- Obr. 8** Zánětlivé faktory ovlivňující melanogenezi.
- Obr. 9** Graf pro vývoj incidence a mortality zhoubného melanomu kůže dle pohlaví (absolutní počty).
- Obr. 10** Graf věkově specifické incidence zhoubného melanomu kůže.
- Obr. 11** Mapa interakcí mezi geny vyskytující se v biologii melanocytů, které jsou spjaté s rizikem vzniku maligního melanomu.
- Obr. 12** Přehled MAPK/ERK signální dráhy.
- Obr. 13** Aktivace T lymfocytu s využitím monoklonálních protilátek proti CTLA-4 a PD-1.
- Obr. 14** Sféroidy.
- Obr. 15** Metoda visící kapky.
- Obr. 16** Charakteristika sféroиду.
- Obr. 17** Biogeneze exosomů.
- Obr. 18** Interleukin-6.
- Obr. 19** Korelace hodnot Breslowa se sérovými hladinami vybraných proteinů.
- Obr. 20** Invaze buněk melanomových linií BLM a A2058.
- Obr. 21** Řez kuřecí chorioalantoidní membránou.
- Obr. 22** Bioinformatická analýza JDF a PDF z heterogenních sféroidů.
- Obr. 23** Vznik, progresse a systémový efekt kožního maligního melanomu.
- Obr. 24** Charakterizace exosomů izolovaných z melanomové linie G361.
- Obr. 25** Transkriptomická analýza HDF a mCAF pod vlivem exosomů.
- Tab. 1** Specifické antigeny melanocytů epidermis.
- Tab. 2** Klasifikace maligního melanomu dle Clarka.
- Tab. 3** Možnosti léčby maligního melanomu.

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Poděkování</b> .....	<b>6</b>
<b>Seznam zkratk a jazykové poznámky</b> .....	<b>7</b>
<b>Seznam obrázků a tabulek</b> .....	<b>14</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>17</b>
<b>2 Literární přehled</b> .....	<b>19</b>
2.1 Kůže, struktura a vývoj .....	19
2.1.1 <i>Endogenní faktory ovlivňující stárnutí kůže</i> .....	21
2.1.2 <i>Exogenní faktory ovlivňující stárnutí kůže</i> .....	24
2.2 Melanocyty za fyziologických podmínek .....	26
2.2.1 <i>Vývoj melanocytů</i> .....	26
2.2.2 <i>Melanogeneze</i> .....	28
2.2.3 <i>Identifikace melanocytů in situ na molekulární úrovni</i> .....	33
2.3 Maligní melanom kůže a jeho fenotyp .....	36
2.3.1 <i>Charakteristika a etiopatogeneze</i> .....	36
2.3.2 <i>Klasifikace a diagnostika</i> .....	39
2.3.3 <i>Deregulace hlavních signálních drah vedoucí k vývoji maligního melanomu</i> .....	43
2.3.4 <i>Současné léčebné modality</i> .....	45
2.3.4.1 <i>Chemoterapie a radioterapie</i> .....	47
2.3.4.2 <i>Imunoterapie cílená na kontrolní body imunity (checkpoints)</i> .....	48
2.3.4.3 <i>Cílená léčba</i> .....	50
2.4 Nádorové mikroprostředí a jeho modelování .....	50
2.4.1 <i>Jednoduché modely mikroprostředí ve 2D</i> .....	51
2.4.2 <i>Jednoduché modely mikroprostředí ve 3D</i> .....	53
2.4.3 <i>Organotypické modely kůže</i> .....	56
2.4.4 <i>Zvířecí modely</i> .....	57
2.5 Exosomy jako nástroj mezibuněčné komunikace u maligního melanomu .....	60
<b>3 Cíle práce</b> .....	<b>65</b>
<b>4 Seznam publikovaných prací autorky se vztahem k tématu disertace</b> .....	<b>66</b>
<b>5 Materiál a metody</b> .....	<b>68</b>
<b>6 Výsledky a diskuse publikovaných prací s citačním ohlasem</b> .....	<b>70</b>
6.1 <b>Tematický okruh: Stárnutí kůže a jeho vztah ke zvýšené incidenci melanomu</b> .	<b>70</b>

6.2	Tematický okruh: Zlepšení časně detekce maligního melanomu.....	72
6.3	Tematický okruh: Modelování nádorového mikroprostředí.....	75
6.4	Tematický okruh: Mezibuněčná komunikace.....	83
<b>7</b>	<b>Závěr a zhodnocení cílů .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Souhrn .....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Summary .....</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>Soubor publikovaných prací autorky .....</b>	<b>112</b>



# 1 Úvod

Kůže představuje jeden z největších orgánů lidského těla a plní různorodé fyziologické funkce. Současně může být postižena i početnými patologickými stavy. Studium biologie lidské kůže přineslo již v předchozích dekadách velmi detailní poznatky, z nichž mnohé mají dokonce svůj translační potenciál a našly i klinické uplatnění. Kromě základních populací lidské kůže, epidermálních keratinocytů a dermálních fibroblastů, kůži spoluvytvářejí další, takzvané minoritní, buněčné populace. Jednou z nich jsou i melanocyty, jejichž biologie je náplní předkládané disertační práce.

Melanocyty jsou buňky vývojově vycházející z buněk neurální lišty. Za embryonálního vývoje jejich prekuzory migrují do míst svého určení, např. epidermis kůže. Fyziologicky zde pak zajišťují tvorbu pigmentu melaninu, která je realizována v organelách zvaných melanosomy. Tento pigment následně předávají svými výběžky okolním keratinocytům, a vytvářejí tak funkční jednotku (tzv. *Epidermal Melanin Unit*). Melanocyt tak předávaným melaninem přispívá k ochraně jejich jádra před nadměrnou expozicí ultrafialovému záření a následnému poškození integrity genetické informace DNA. Nadměrné ozáření totiž představuje základní rizikový faktor pro neoplastickou transformaci epidermálních keratinocytů a vznik epidermálních karcinomů, velmi běžných zhoubných nádorů, které postihují lidskou populaci. Mimo to ale ultrafialové záření může poškozovat i samu populaci melanocytů, a zvyšuje tak riziko vzniku kožního nádoru – maligního melanomu. Toto maligní onemocnění představuje jeden z nejagresivnějších kožních nádorů, jehož incidence v populaci stoupá. Časná detekce primárního ložiska maligního melanomu může být pro pacienta zásadní, protože umožňuje dosažení plně kurativního efektu prostřednictvím chirurgické léčby. Problém nadále ale představuje často rychlá progresse nádorového onemocnění, kdy nádorové buňky invadují lokálně a posléze pak i migrují do vzdálenějších míst krevním či lymfatickým řečištěm, což vede k tvorbě metastáz.

Klíčovým faktorem podílejícím se na regulaci invazivního chování nádoru je nádorové mikroprostředí. Pro buňky a struktury spoluvytvářející nádor, ale odlišné od maligně transformované nádorové populace, se historicky vžil v patologii termín stroma. Stromatu byly přisuzovány v starších dobách spíše jen podpůrné a nutritivní funkce. V novějším konceptu je přiznáván stromatu významný podíl na formování právě komplexního mikroprostředí, které může významně ovlivnit i maligní populaci.

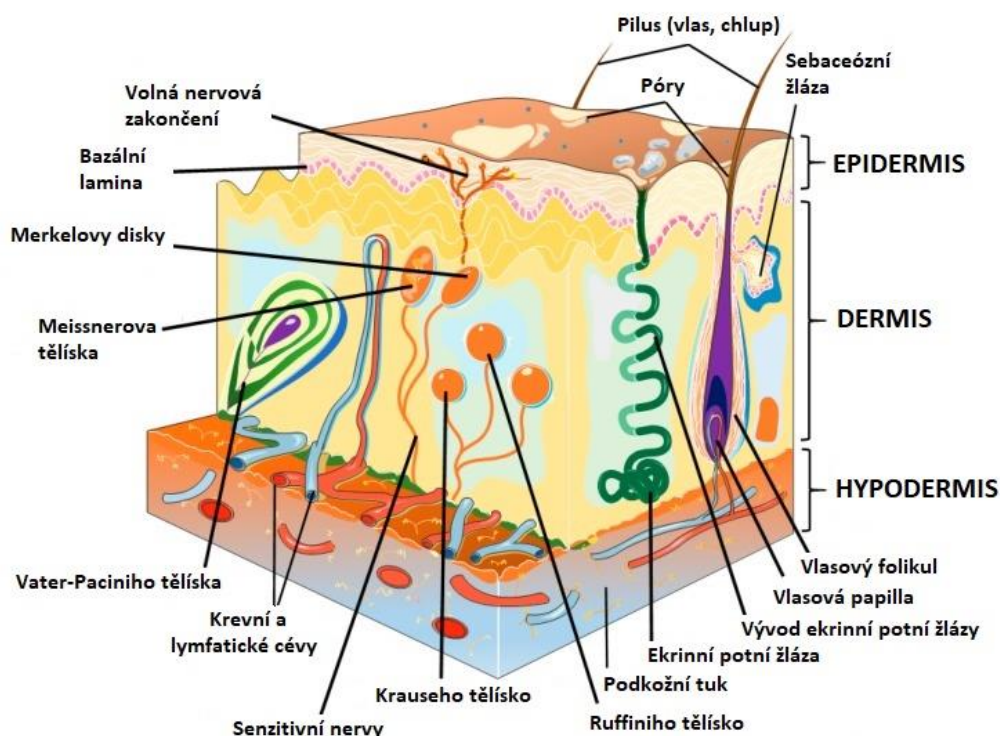
Jednou z hlavních buněčných populací tohoto nádorového mikroprostředí jsou nádorově-asociované fibroblasty, které jsou důležitými producenty složek extracelulární matrix a mnoha biologicky aktivních, zejména prozánětlivých, faktorů. Interakce a mezibuněčná komunikace mezi nádorovými a stromálními buňkami je pak zásadní pro vývoj nádoru. Proto byly právě mechanismy mikroprostředí a jejich vliv na melanocyty klíčovým přístupem a objektem zájmu při výzkumné práci vedoucí k sepsání předkládané disertační práce.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Kůže, struktura a vývoj

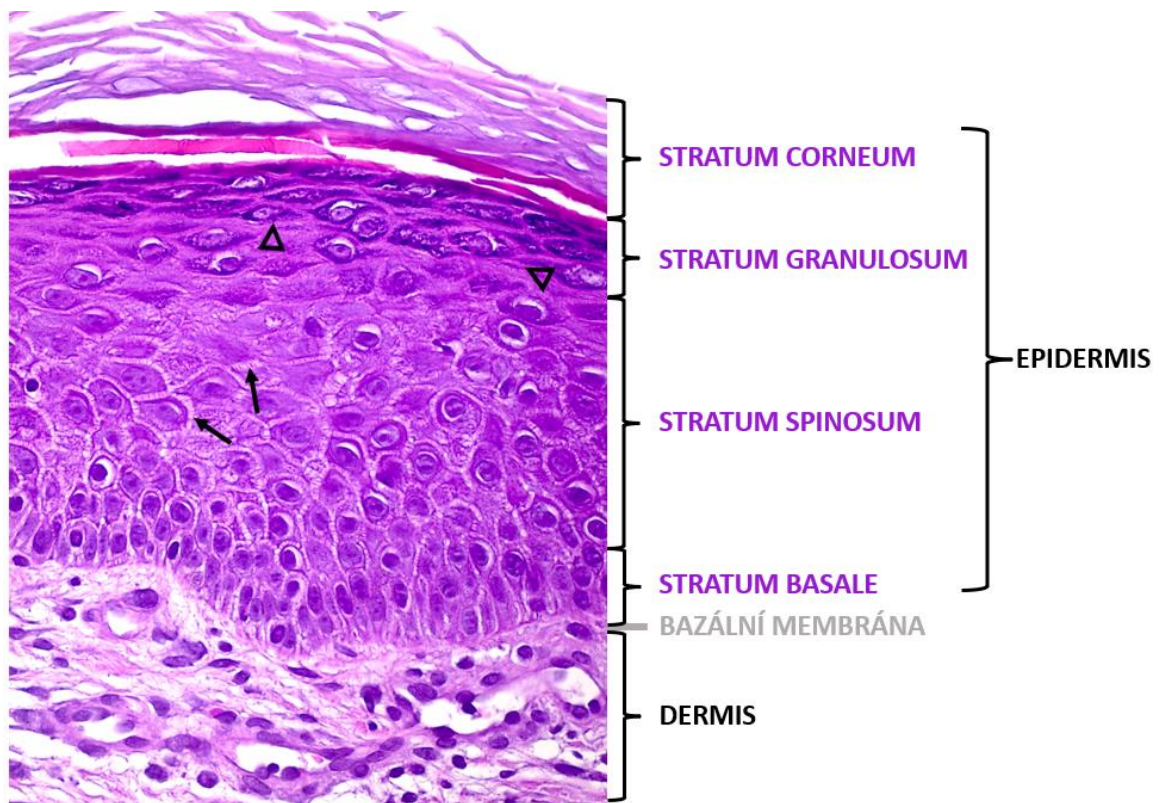
Kůže, *integumentum commune*, je krycím orgánem tvořící rozhraní mezi vnitřním prostředím těla a vnějším prostředím; působí tedy primárně jako ochrana těla před nežádoucími vlivy z okolí (Roger et al. 2019). Kromě vytváření mechanické ochranné bariéry se kůže účastní i termoregulace, a to prostřednictvím činnosti ekrinních potních žláz a regulací průtoku krve v kožním cévním řečišti (Rittié and Fisher 2015). Za zmínku stojí i její další funkce, např. metabolické jako je tvorba vitamínu D (Mostafa and Hegazy 2013), sekreční a exkreční funkce, nebo kožní cití. Významný je obecně i její estetický a psychosociální aspekt.

Kůže je v užším slova smyslu tvořena dvěma hlavními vrstvami – epidermis a dermis. Tyto hlavní vrstvy kůže volněji doplňuje ještě hlouběji uložené podkožní tukové vazivo (tzv. hypodermis) (Obr. 1).



**Obr. 1 Schématické znázornění řezu kůží.** Kůže se skládá ze tří vrstev: epidermis, dermis a hypodermis. Kůže obsahuje různé typy buněk (zejména keratinocyty, fibroblasty, melanocyty, buňky imunitního systému), rozdílné senzory a kožní adnexa (např. vlasy, mazové a potní žlázy). Epidermis působí jako ochranná bariéra před vnějšími nežádoucími vlivy. Dermis představuje podpůrnou vrstvu kvůli bohaté extracelulární matrix a zajišťuje také výživu díky přítomným krevním a lymfatickým cévám (převzato a upraveno dle Chamcheu et al. 2019).

Epidermis, pokožka, je povrchovou vrstvou obsahující převážně keratinocyty, které ve vrstvách epidermis postupně dosahují různých stádií diferenciaci (Brettmann and de Guzman Strong 2018). Epidermis je ektodermového původu. Kromě převažujících keratinocytů pak nalezneme v pokožce i pigmentové buňky melanocyty (viz kapitola 2.2), antigen prezentující Langerhansovy buňky nebo Merkelovy buňky (Tobin 2017). Tyto minoritní populace ale vznikají v jiných zárodečných listech a strukturách a do epidermis se dostávají až sekundárně. Histologicky představuje epidermis rohovějící mnohvrstevný dlaždicový epitel. Ten se dělí podle stratifikace na nejhlouběji při bazální membráně uložené *stratum basale*, nad ním směrem k povrchu následuje *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a plně keratinizované *stratum corneum* (Obr. 2). *Stratum lucidum* je patrné jen na tlustém typu kůže (tj. akrálně) a nachází se na hranici *stratum granulosum* a *stratum corneum* (Sadler 2011).



**Obr. 2 Stratifikace epidermis na histologickém preparátu.** Epidermis je histologicky rohovějícím mnohvrstevným dlaždicovým epitelem, který je dělen na *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a *stratum corneum*. Fotografie byla poskytnuta Dermatovenerologickou klinikou 1. LF UK a VFN. Šipka – adhezní buněčné spoje desmozomy mezi polygonálními keratinocyty ve *stratum spinosum*; prázdný trojúhelník – keratohyalinová granula keratinocytů ve *stratum granulosum*.

Dermis je definována jako podpurná vazivová vrstva kůže nacházející se pod bazální membránou epidermis. Z pohledu embryonálního vývoje má mezenchym formující

budoucí dermis v různých částech těla odlišný původ. V oblasti zad je dermis derivátem dermatomů somitů, v přední a boční oblasti trupu nebo na končetinách pochází dermis z laterální ploténky mezodermu a v oblasti hlavy je původem z buněk neurální lišty (Sadler 2011).

Podle struktury lze dermis rovněž dělit do vrstev. Její povrchová vrstva (*stratum papillare*) vybíhá proti epidermis v papilách, zatímco její hlubší a kompaktnější vrstva (*stratum reticulare*) dává kůži mechanickou podporu (Obr. 3) (Cole et al. 2018). Dermis je složená z acelulárních kolagenních a elastických fibril a dále pak z buněk – zejména fibroblastů, v menším rozsahu ale i z rezidentních, či migrujících buněk imunitního systému (např. histiocyty, makrofágy, CD4+ a CD8+ T lymfocyty).

Fibroblasty dynamicky syntetizují, organizují, ale i odbourávají extracelulární matrix (anglicky: *Extracellular Matrix*; ECM). Účastní se nejen fyziologických procesů, jako je kontinuální obnova struktury dermis, ale i reparace po ztrátovém zranění, tedy hojení ran. Fibroblasty jsou přímo zdrojem, či se alespoň spoluúčastní některých patologických procesů, jakými jsou abnormální hojení (např. hypertrofické jizvy), fibrotizující onemocnění (např. sklerodermie) či nádory, kde v mikroprostředí nádoru fungují jako nádorově-asociované fibroblasty (anglicky: *Cancer-associated fibroblasts*; CAF) (Wlaschek et al. 2021).

V kontextu struktury kůže je nutno zmínit také adnexální struktury, jako jsou potní žlázy a pilosebaceózní jednotky. V dermis jsou přítomné i krevní a lymfatické cévy, nervová zakončení a specializovaná tělíska (Tobin 2017; Chambers and Vukmanovic-Stejić 2020).

Kůže se v průběhu nejen prenatálního, ale i postnatálního vývoje dramaticky mění. Stárnutí kůže není jen chronologický fenomén. Jde o komplexní proces, při němž hrají roli intrinsické (endogenní) i extrinsické (exogenní) faktory, které podněcují zhoršenou fyziologickou funkci a kompromitují i strukturální integritu kůže. Právě morfologické a funkční aspekty stárnutí se velmi významně dotýkají tématu předkládané doktorské teze.

### 2.1.1 Endogenní faktory ovlivňující stárnutí kůže

Ve stárnoucí kůži dochází strukturálně jednak k numerickému úbytku buněk, ale také ke ztrátám objemu ECM v důsledku snížení jejich biosyntetické výkonnosti. To je dále akcentováno i relativním nárůstem aktivity ECM degradujících enzymů (Robert et al. 2009). Navíc se častěji objevuje zmenšování podílu elastinu, fragmentace vláknité struktury ECM, což ztěžuje rozprostření fibroblastů (Cole et al. 2018). U stárnoucí kůže

dochází nejen ke ztenčování vrstev, především epidermis, v důsledku numerické atrofie keratinocytů, ale typicky dochází k zmenšené hydrataci, tedy k poklesu podílu vody v epidermis. Kůže je xerotická, změněné mechanické vlastnosti se vyznačují i změnou textury a povrchového reliéfu (tj. četnějšími vráskami) (Chambers and Vukmanovic-Stejic 2020).

Stárnutí kůže je funkčně také významně spjato i s buněčnou senescencí. Před více než půlstoletím byl v buněčné biologii etablován pojem „buněčná senescence“ pro stav, ve kterém se buňka ocitá, když již nemá kapacitu se dále dělit (Narita and Lowe 2005). Tento limitovaný replikační potenciál byl prvně popsán *in vitro* na primárních lidských fibroblastech v podmínkách tkáňových kultur a bývá tedy uváděn s odkazem na svého objevitele a popularizátora této problematiky také jako Hayflickův limit (Hayflick and Moorhead 1961). Buněčná senescence pozorovaná Hayflickem a Moorheadem (1961) byla později vysvětlena mechanisticky jako důsledek dramatického zkrácení, či úplné ztráty chromozomálních telomer při nedostatečné (či zcela chybějící) endogenní telomerázové aktivitě (Muñoz-Espín and Serrano 2014). Tento model lze s určitou nadsázkou interpretovat jako interní časomíru buňky.

V dnešní době je ale již známo, že fenomén buněčné senescence může být navozen i několika dalšími intrinsickými mechanismy. Mezi ně patří blokáda buněčného cyklu prostřednictvím inhibitorů cyklin dependentních kináz a známých tumor-supresorových genů jako je např. *p16<sup>INK4A</sup>* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*; viz *CDKN2A*), *p21<sup>Waf1</sup>* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*) a *p27<sup>kip1</sup>* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B*). Dalším zodpovědným faktorem může být produkce prozánětlivých či jiných tkáň degradujících faktorů navazujících na poškození tkáně (Muñoz-Espín and Serrano 2014; Vicente et al. 2016). Senescence tedy v těchto případech sehrává roli určitého obecného funkčního modulu chování, který je aktivován v kontextu abnormální situace vedoucí k poškození buňky. Toto chování dává buňkám šanci dokončit reparativní procesy, a zajistit tak integritu zejména dědičné informace. Pokud ale reparace není možná, bude buňka eliminována apoptózou, nebo alespoň vyřazena z proliferace navozenou senescencí. Nebude tak docházet ke kumulativnímu zvyšování mutační zátěže ve tkáni. V epidermis a dalších rychle se obnovujících strukturách jsou poškozené buňky kontinuálně odstraňovány při procesu diferenciaci. Selhání takové eliminace může zásadně usnadnit rozvoj některých patologií včetně maligních nádorů.

Bez ohledu na konkrétní proces vedoucí buňky do senescence je jejich výsledné biologické chování v obecných rysech obdobné. Navozené komplexní změny tohoto typu

je optimální popisovat více parametry. Velkou výpovědní hodnotu pro účely komparace má komplexní analýza sekretomu buněk za normálních podmínek a po dosažení či navození senescence. Ustanovený specifický sekretom senescentní buňky bývá označován jako sekreční fenotyp asociovaný se senescencí (anglicky: *Senescent-Associated Secretory Phenotype*; SASP) (Campisi 2005).

Dosažení senescence neovlivňuje pouze samotnou senescentní buňku, ale bude mít dopad i na celou tkáň, ve které k této změně dochází. SASP umožňuje buňkám parakrinními prostředky komunikovat s okolím, a ovlivňovat tak funkčně sousedící buňky. Za určitých podmínek může jeden buněčný typ navodit senescenci v sousedních buňkách prostřednictvím sekrece cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (Acosta et al. 2013).

Senescenci podléhají obě majoritní buněčné populace kůže, keratinocyty a fibroblasty, což vede k morfoloicky nápadným změnám. Velmi akcentované změny na kůži jsou pak přítomny u vzácných syndromů akcelerovaného stárnutí, jako je progerie (syndrom Hutchinson-Gilford) (Dreesen 2020). Senescence ale postihuje i minoritní buněčné typy včetně melanocytů, které pak exprimují *p16<sup>INK4A</sup>*, mají dysfunkční telomery a snižuje se u nich HMGB1 (*High Mobility Group Box-1*), jehož nízká hladina je považována za další znak buněčné senescence. Kromě toho senescentní melanocyty ovlivňují svým SASP i sousedící keratinocyty a způsobují i u nich dysfunkci telomer vedoucí k nízké proliferaci a posléze k atrofii epidermis (Vitorelli et al. 2019). Wang et al. (2014) popisuje, že senescenci u lidských melanocytů může navodit také IFN- $\gamma$  (*Interferon- $\gamma$* ), což je mechanisticky vysvětleno následně zvýšenou expresí proteinu p21. Navíc melanocyty po dlouhodobém vystavení IFN- $\gamma$  také masivně produkují cytokin IL-6 (*Interleukin-6*), který je jedním z klíčových faktorů SASP (Wang et al. 2014).

Proces stárnutí kůže bývá ovlivněn i nerovnováhou mezi endogenním vznikem a inaktivací reaktivních forem kyslíku (anglicky: *Reactive Oxygen Species*; ROS) a jiných volných radikálů vznikajících při základním oxidativně-fosforylačním metabolismu každé buňky. K tomu může docházet zvýšenou měrou u mitochondriálního oxidativního stresu, který se objevuje zejména u lidí ve věku nad 60 let (Lu et al. 1999). Antioxidační enzymy jsou zodpovědné za bezpečné odstraňování ROS i zmírnění jejich škodlivých účinků. Jedním z hlavních antioxidačních enzymů je superoxid dismutáza 2 (anglicky: *Superoxide Dismutase 2*; SOD2). Nepřítomnost SOD2 u myšího modelu způsobila sníženou aktivitu mitochondriálního komplexu II vedoucí k poškození jaderné DNA a

následně i k navození senescence. Apoptóza přitom v epidermis nebyla indukována. Toto pozorování ilustruje, jak se mitochondriální oxidativní stres spolu s buněčnou senescencí podílí na stárnutí kůže (Velarde et al. 2012).

V tomto případě spolehlivé odlišení podílu vlivu endogenně vznikajících a exogenně přicházejících ROS není snadné, tudíž v biologických systémech není lehká stanovitelná hranice mezi vlivy exogenními a endogenními.

### 2.1.2 Exogenní faktory ovlivňující stárnutí kůže

Za změnami ve struktuře a fyziologických funkcích kůže stojí i celá řada exogenních faktorů. Zpravidla se uvádí vlivy fyzikální, pocházející ze zevního prostředí (např. různé typy záření), vlivy chemické jako jsou reaktivní kyslíkové radikály či chemické environmentální polutanty, ale i některé vlivy biologické. Při analýze je pak nutno zohlednit i klinicky relevantní vlivy behaviorální, např. kouření, alimentární návyky a nezdravá životospráva (Strnadova et al. 2019; publikace II).

Pro karcinogenezi v kontextu kůže je ale zcela zásadním faktorem ultrafialové (anglicky: *Ultraviolet*; UV) záření. Právě tento faktor je epidemiologicky nejvýznamnější příčinou pro vznik kožních malignit včetně maligního melanomu kůže (blíže kapitola 2.3), a proto bude tato kapitola zaměřena zejména na faktor UV záření.

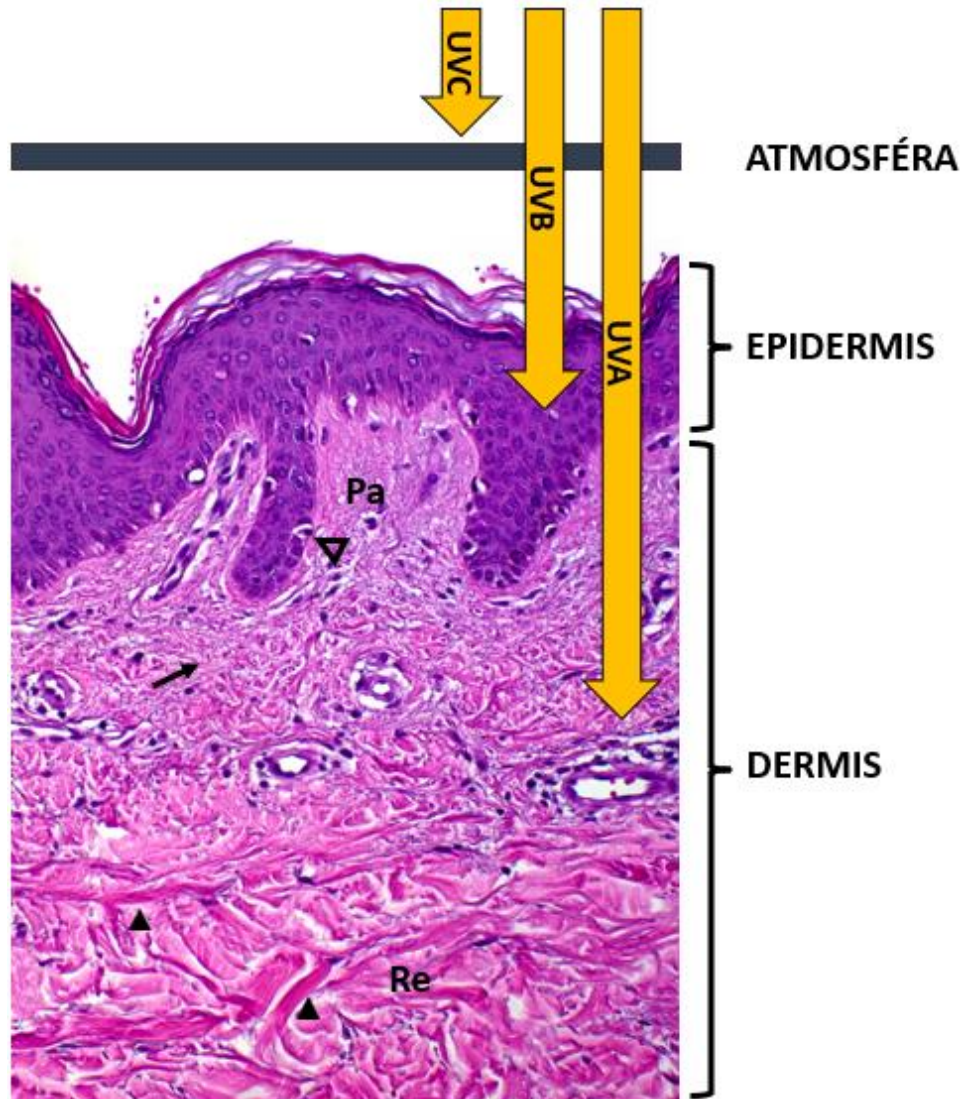
UV záření se dělí na spektrální pásma dle vlnových délek, a sice na UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) a UVC (100–280 nm). Sluneční záření dopadající na zemský povrch sestává dominantně z UVA (90–95 %) a UVB paprsků (5–10 %), zatímco přirozené UVC je z velké části absorbováno ozónovou vrstvou atmosféry (Obr. 3) (Amaro-Ortiz et al. 2014; Sample and He 2018). UV paprsky dopadají na kůži v průběhu celého života jednotlivce, byť kumulace dávky nepodléhá lineárnímu modelu (Karagas et al. 2007). Při excesivní expozici ale může dojít k urychlení stárnutí a tento výsledný strukturální a funkční efekt označujeme jako *photoageing* (Yaar and Gilchrist 2007).

Přirozené i akcentované stárnutí způsobené UV zářením ovlivňuje tedy nejen povrchovou epidermis, ale také hlubší vrstvu dermis. Tyto dva aspekty od sebe nelze oddělit a v průběhu jednotlivých kroků vedoucích ke vzniku zhoubného nádoru sehrává aktinické poškození určitou roli.

UVB může způsobit přímé poškození deoxyribonukleové kyseliny (anglicky: *Deoxyribonucleic Acid*; DNA) v buňkách epidermis. UVA penetruje hlouběji až do dermis a zvyšuje zde ROS, které nepřímou mohou také vyvolávat DNA mutagenezi,



zároveň v dermis dochází i ke strukturálnímu poškození vedoucímu například až k solární elastolýze elastinových vláken (Amaro-Ortiz et al. 2014).



**Obr. 3 Vliv UV záření na kůži.** UV záření dopadající na kůži je převážně složeno ze spektrálních oblastí UVA a UVB. UVC je absorbováno ozonovou vrstvou atmosféry. UVB dosahuje hlavně epidermis kůže. Rizikem při nadměrném vystavení UVB je spálení kůže a následné přímé poškození DNA. UVA penetruje až do dermis, zvyšuje riziko ROS a oxidativního stresu vedoucí k DNA mutagenезi a předčasnému stárnutí kůže (Amaro-Ortiz et al. 2014). Fotografie byla poskytnuta Dermatovenerologickou klinikou 1. LF UK a VFN. Pa – *stratum papillare*; Re – *stratum reticulare*; prázdný trojúhelník – melanocyt; šipka – jemná extracelulární matrix ve *stratum papillare*; plný trojúhelník – hrubé kolagenní snopce ve *stratum reticulare*.

V dermis dochází k degradaci kolagenu a jiných proteinů ECM vyvolané zvýšenou aktivitou matrix metaloproteináz (anglicky: *Matrix Metalloproteinase*; MMP) (Quan et al. 2009). Zdá se, že aktivita tkáňových inhibitorů matrix metaloproteináz (anglicky: *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase*; TIMP) je ve stárnoucí kůži nižší, jako bylo objeveno v případě TIMP1 (Hornebeck 2003). Recentně provedená genová analýza potvrdila, že vystavení lidských dermálních fibroblastů UVB záření navozuje sníženou

expresi genů pro kolagen *COL1A1* (*Collagen Type I Alpha 1 Chain*), *COL1A2* (*Collagen Type I Alpha 2 Chain*), *COL3A1* (*Collagen Type III Alpha 1 Chain*) a zvýšenou expresi MMP (např. *MMP9*, *MMP10* nebo *MMP3*), nicméně aktivita TIMP vykazovala nejednotné trendy. Exprimovaný *TIMP3* byl zde downregulován, naopak geny *TIMP1*, *TIMP2* a *TIMP4* byly upregulovány. Těmito extrinsickými vlivy inspirovaný model stárnutí naznačuje, že TIMP reagovaly spíše na zvyšující se aktivitu MMP než na UVB záření (Lago and Puzzi 2019).

Souhrnně vzato, vlivy prostředí jako je právě UV záření, ROS, chemické polutanty a další škodliviny způsobují funkční vyčerpání ochranných mechanismů daných správnou funkcí antioxidantních enzymů. To vede ve výsledku také k poškození DNA a následně i k tkáňové reakci spojené se sekrecí prozánětlivých faktorů produkovaných buňkami kůže (jako je tomu u SASP). Zánětlivé prostředí stimuluje translaci dalších proteinů, např. různých MMP způsobujících degradaci ECM (Pillai et al. 2005).

Je tedy zřejmé, že exogenně zapříčiněné poškození kůže vyvolává změny reflektované na endogenní úrovni, a jak již bylo zmíněno, nelze tak tyto faktory od sebe jednoduše v biologických systémech oddělit.

## 2.2 Melanocyty za fyziologických podmínek

### 2.2.1 Vývoj melanocytů

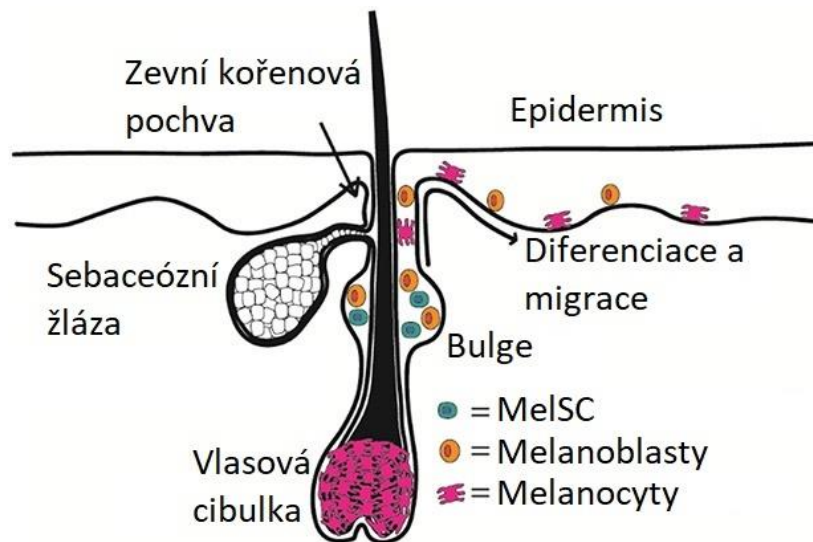
U obratlovců existuje velké množství různých typů buněk produkujících pigmenty (Schartl et al. 2016). Pro potřeby humánní morfologie a fyziologie je ale klíčovým buněčným představitelem tohoto typu melanocyt. Melanocyty jsou pigmentové buňky, které se nachází v pokožce ve *stratum basale*. Pigmentové buňky nalézáme ale i v *tunica vasculosa* oka, vnitřním uchu, mozkových obalech nebo srdci. Pro vývojové biology představuje vývoj melanocytů zajímavý model, který vysvětluje pozoruhodně širokou distribuci tohoto buněčného typu v lidském těle.

U savců pochází melanocyty z multipotentních kmenových buněk neurální lišty. Nejprve se bipotentní progenitor melanoblastů a gliových buněk vyznačuje pozitivitou pro *SOX10* (*SRY-Box Transcription Factor 10*) (Mort et al. 2015). Po uzavření neurální trubice (spojením neurálních valů) tato progenitorová populace projde nejprve epitelově-mezenchymovým přechodem (anglicky: *Epithelial-Mesenchymal Transition*; EMT), čímž se uvolní z neurálních valů, a posléze migruje vyvíjejícím se embryem. V oblasti hlavy dochází k EMT ještě před uzavřením neurální trubice. Při migraci odlišujeme dva

směry. Po migraci ventrální cestou dává progenitorová populace vzniknout například některým složkám periferního nervového systému. Druhou možností je pak migrace dorzolaterální cestou vedoucí ke vzniku melanoblastů (Silver and Pavan 2006). V kůži tyto buňky pronikají dermis, osidlují *stratum basale* epidermis a tvoří prekurzory melanocytů (Qiu et al. 2019).

Některé melanocyty si zachovávají v cílové tkáni také svůj charakter níže diferencovaných kmenových buněk, ty se nalézají v rozšířeném segmentu zevní kořenové epitelové pochvy vlasového folikulu označované jako „*bulge*“. Zde přítomná populace kmenových buněk melanocytů (anglicky: *Melanocyte Stem Cells*; MelSC) vytváří rezervu schopnou sebeobnovy, která je čerpána ve fázi anagenu růstového cyklu vlasových folikulů. Tyto melanocyty jsou pak zodpovědné za barvu vlasů a ochlupení (Joshi et al. 2019). Stárnutím ztrácí MelSC svojí schopnost sebeobnovy a vlasy postupně šediví (Wang et al. 2016). Zatímco MelSC ve vlasovém folikulu vykazují značnou plasticitu – v případě ztrátového poškození epidermis může z vlasových folikulů docházet i k repopulaci epidermis a následné repigmentaci (Obr. 4), např. při vitiligu (Cui et al. 1991; Yardman-Frank and Fisher 2021) – melanocyty v epidermis jsou vysoce diferencovanou populací buněk, které v případě jednotlivě se vyskytujících buněk ve *stratum basale* proliferují pouze výjimečně, a jsou tak stabilními dlouho žijícími buňkami (Cichorek et al. 2013; Casalou et al. 2022).

Nicméně existuje i studie popisující možnou diferenciaci melanocytů z dermálních prekurzorů, konkrétně dermálních kmenových buněk izolovaných z novorozeneckých předkožek a kultivovaných v nediferencovaném stavu. Tyto buňky exprimovaly znaky buněk neurální lišty (např. *nestin*). *In vitro* vykazovaly dermální kmenové buňky multipotentní charakter, které bylo možno diferencovat v jiné buněčné typy, např. buňky hladké svaloviny, adipocyty nebo právě melanocyty. V kontextu rekonstrukce kůže se tyto melanocyty usídlily při bazální membráně, byly pigmentované a exprimovaly následně i typické znaky pro melanocyty. To naznačuje, že by mohl existovat i jiný zdroj pro epidermální melanocyty, než jsou MelSC ve vlasových folikulech (Li et al. 2010).

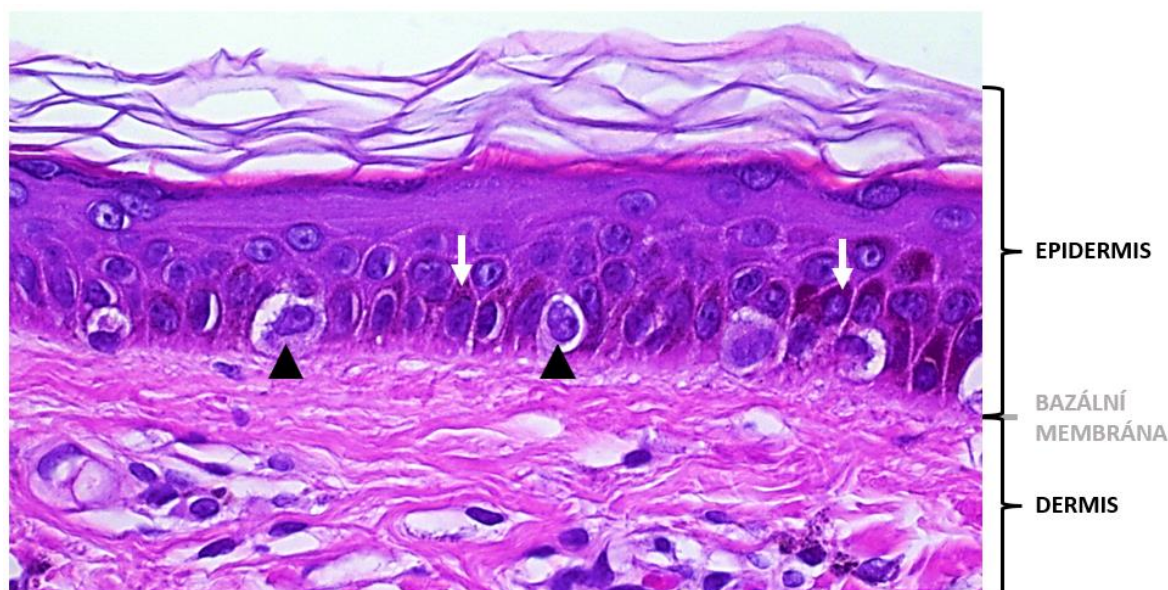


**Obr. 4 Rezervoár kmenových buněk melanocytů v kůži.** MelSC osidlují rozšířený segment zevní kořenové pochvy vlasového folikulu zvaný bulge. V případě potřeby perifolikulární repigmentace, např. v důsledku ztrátového poškození epidermis nebo při vitiligu, se část klidových MelSC a melanoblastů v bulge aktivuje a migruje do oblasti nad tento segment. V tomto místě dochází k další diferenciaci a migraci směrem do periferní epidermis, kde následně dochází k repigmentaci (převzato a upraveno dle Yardman-Frank and Fisher (2021)).

Popsaná velká schopnost tohoto buněčného typu udržovat si kmenové charakteristiky spojené s nízkým stupněm diferenciaci a dále pozoruhodná schopnost migrovat, mohou být důvodem, proč se melanocyty po neoplastické transformaci v buňky maligního melanomu chovají tak agresivně, jsou schopny odolávat terapii a také snadno metastazují (Mort et al. 2015).

### 2.2.2 Melanogeneze

Melanocyty tvoří přibližně 4 % buněčné populace v bazální vrstvě epidermis a svými dendritickými výběžky dosahují do úrovně *stratum spinosum*. Jeden melanocyt je obklopen zhruba 36 keratinocyty a dohromady tvoří epidermální melaninovou jednotku (Fitzpatrick and Breathnach 1963; Quevedo 1972; Seiberg 2001; Nordlund 2007). Svými výběžky předávají keratinocytům pigment melanin ve formě zralých melanosomů, které v cytoplasmě jako štít chrání jádra keratinocytů a pohlcují energii dopadajících fotonů UV záření (Obr. 5) (Seiberg 2001).

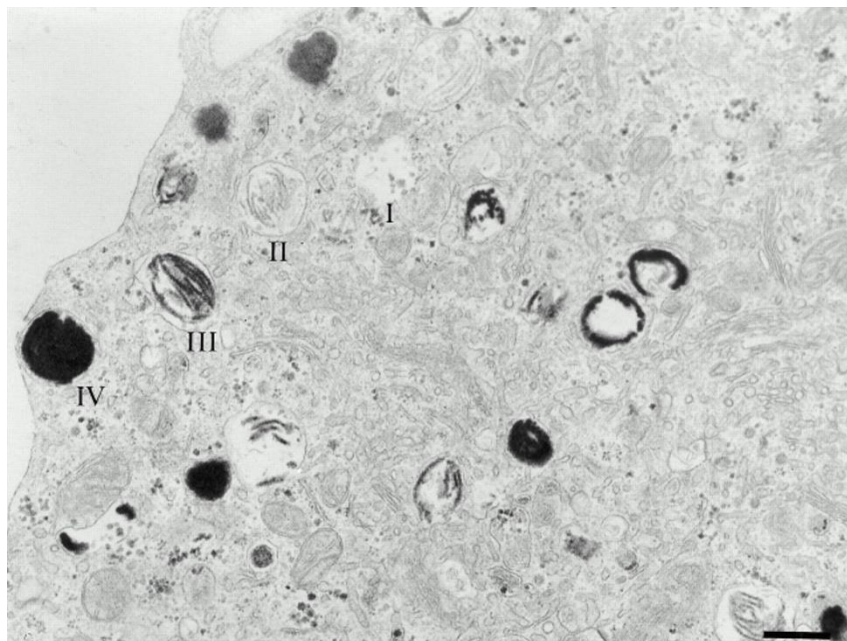


**Obr. 5 Pigmentové buňky kůže.** Na hranici mezi epidermis a dermis se nachází bazální membrána, na kterou nasedají pigmentové buňky kůže – melanocyty. Melanocyty předávají okolním keratinocytům v epidermis pigment melanin, který chrání jejich jádra před UV zářením. Fotografie byla poskytnuta Dermatovenerologickou klinikou 1. LF UK a VFN. Bílá šipka – pigment melanin chránící jádro keratinocytu; plný trojúhelník – melanocyt.

Melanin se u člověka v kůži přirozeně vyskytuje v několika formách – hnědočerný eumelanin, žlutočervený feomelanin či smíšený melanin. V lidském těle je dále přítomen i chemicky příbuzný pigment, neuromelanin, syntetizovaný v *substantia nigra* středního mozku (mesencephalon), který je ale funkčně velmi odlišný (Mort et al. 2015; Slominski et al. 2004; Zecca et al. 2001). U lidí se v kůži nejčastěji vyskytuje eumelanin, proto bude s ohledem na jeho funkční význam popsána melanogeneze právě této formy melaninu.

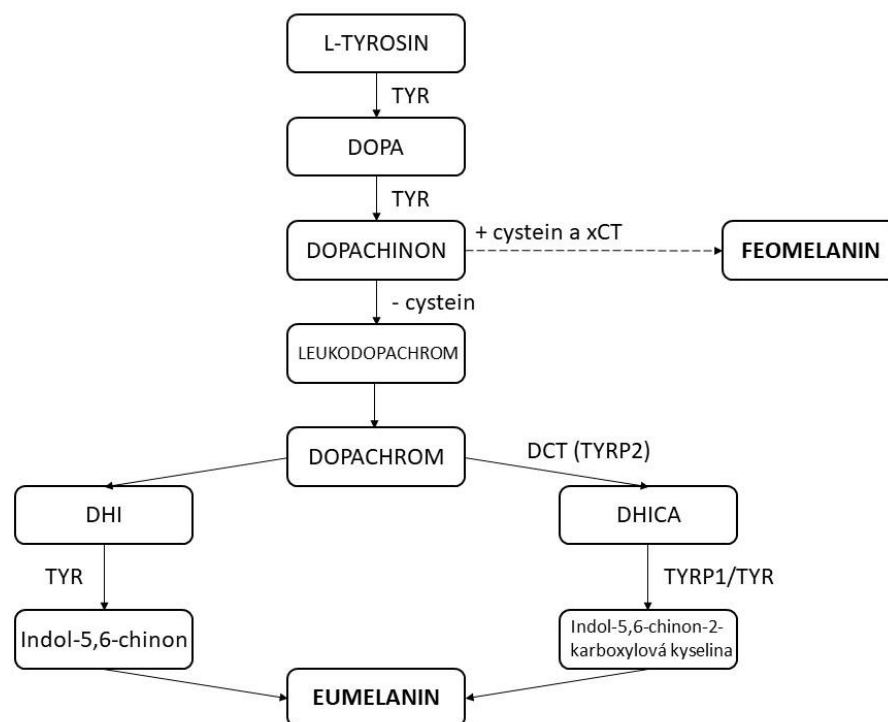
Průběh melanogeneze je možné dělit podle fází tvorby organel melanosomů, ve kterých je pigment uložen (Obr. 6). Tyto váčky se do jisté míry podobají lysozomům. První fázi (I) vzniku eumelanosomů představují membránou ohraničené vezikuly zatím postrádající pigment, ale obsahující již v lumen základy proteinových fibril. Tyto proteinové fibrily jsou zcela dotvořeny ve stádiu II a melanosom se pak vyznačuje elipsoidním tvarem. V této fázi začíná také syntéza eumelaninu. Ve stádiu III a IV se eumelanosom obohacuje o elektrondenzní melanin, který se postupně ukládá na fibrilách až do úplného zaplnění lumen organely (Raposo and Marks 2007; D'Alba and Shawkey 2019). Hlavní strukturální složkou fibril je protein Pmel17 (*Premelanosome Protein*; též gp100), který obsahuje opakující se sekvence aminokyselin prolinu/serinu/threoninu, tzv. RPT domény (Bissig et al. 2016). Delece této domény vede k neschopnosti tvořit fibrily a zamezuje rozpoznání Pmel17 monoklonální protilátkou užívanou při běžné diagnostice pod označením HMB45 (Hoashi et al. 2010). Další kriticky významný protein pro

strukturní zrání melanosomů je vedle Pmel17 i Melan-A (označovaný také jako MART-1 - *Melanoma Antigen Recognized by T-Cells 1*) (Yamaguchi et al. 2007).



**Obr. 6 Zrání melanosomů.** Obrázek z imunoelektronové mikroskopie odhaluje stádia zrání melanosomů. Ve stádiu I se v membránově ohraničených váčcích objevují základy proteinových fibril dominantně tvořených z Pmel17. Ve stádiu II proteinové fibrily dorůstají. Ve stádiu III a IV dochází k syntéze melaninu, který postupně vyplňuje lumen melanosomu (převzato a upraveno dle Raposo et al. 2001).

Biochemická syntéza eumelaninu je několikastupňový proces a začíná přeměnou L-tyrosinu na dopachinon prostřednictvím enzymu tyrosinázy (anglicky: *Tyrosinase*; TYR). Mezistupněm této přeměny je 3,4-dihydroxyfenylalanin (anglicky: *3,4-dihydroxyphenylalanine*; L-DOPA). Dopachinon je následně přeměněn na leukodopachrom, poté na dopachrom a v důsledku oxidačně-redukčních reakcí na meziprodukty 5,6-dihydroxyindol (anglicky: *5,6-dihydroxyindole*; DHI) a 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylovou kyselinu (anglicky: *5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid*; DHICA). DHI a DHICA polymerizují a vytváří hnědočerný eumelanin. Kromě TYR hrají důležitou roli v tomto procesu i další dva enzymy: tyrosináze příbuzný protein 1 (anglicky: *Tyrosinase-Related Protein 1*; TYRP1) a dopachrom tautomeráza (anglicky: *Dopachrome Tautomerase*; DCT nebo TYRP2) (Obr. 7) (Hearing and Jiménez 1987; Slominski et al. 2004; Yamaguchi et al. 2010). Přítomnost těchto proteinů je velmi specifická pro melanocyty a může tedy být chápána jako jejich velmi specifický fenotypový znak využitelný i diagnosticky.



**Obr. 7 Syntéza eumelaninu.** Schéma znázorňuje několikastupňový proces přeměny L-tyrosinu na hnědočerný pigment eumelanin. V případě, že je přítomen cystein a cystin-glutamátový transporter (anglicky: *Cystine/Glutamate Transporter*; xCT), z dopachinonu může vzniknout přes benzothiazinové meziproducty žlutočervený feomelanin (převzato a upraveno dle Zhang et al. 2018).

Biogeneze melanosomů a syntéza melaninu je klíčově regulována transkripčním faktorem MITF (*Melanocyte Inducing Transcription Factor*) (Vachtenheim and Borovanský 2010). Kromě toho svou roli v produkci melaninu hraje i hodnota pH. Bylo dokázáno, že neutrální pH je optimální pro efektivní melanogenezi a naopak nízké kyselé pH snižuje aktivitu enzymu TYR, a tudíž i produkci melaninu (Ancans et al. 2001). Dalšími klinicky relevantními stimuly ovlivňujícími pigmentaci mohou být například extrinsický faktor UV záření nebo intrinsický faktor, jako je probíhající zánět (Videira et al. 2013).

UV záření je důležitým regulačním faktorem melanogeneze a následně získané pigmentace. UVB záření zahajuje soubor dějů vedoucí k „zpožděnému/nepřímému“ opálení (z anglického *delayed tanning*), které trvá dny až týdny (Yardman-Frank and Fisher 2021). Na tomto procesu se podílí onkogen *p53* (*Tumour protein P53*), jehož aktivita je v důsledku UVB záření zvýšená, a to přímo vede k transkripci genu proopiomelanokortinu v keratinocytech (Cui et al. 2007; Park et al. 2009). Jedním z možných aktivních produktů tohoto polypeptidu je po sestřihu  $\alpha$ -melanocyty stimulující hormon (anglicky:  *$\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone*;  $\alpha$ -MSH), který zintenzivňuje syntézu melaninu (Yamaguchi et al. 2007; Videira et al. 2013). Bylo zjištěno, že při

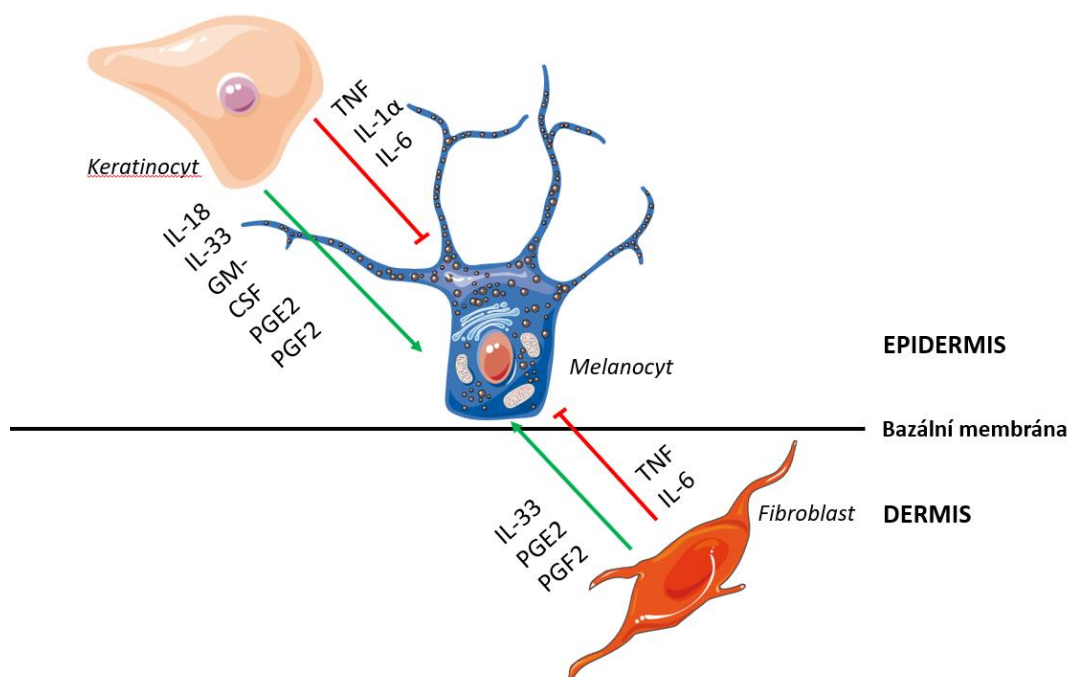
inaktivaci tumor-supresorového genu *p53* u myši nedochází k opálení kůže (Cui et al. 2007), které je považováno za adaptivní odpověď kůže na DNA poškození způsobené UV zářením (Videira et al. 2013). U starších jedinců může, v důsledku kumulativního působení dávek UVB záření, docházet k fokální hyperpigmentaci způsobené akumulací melaninu v cytoplasmě keratinocytů v podobě tzv. *lentigo solaris* (Imokawa 2019).

I krátkodobá nadlimitní expozice UVB záření může způsobit spálení kůže, klinicky odpovídající *dermatitis solaris*. Akutní poškození kůže se projevuje zčervenáním, bolestí, někdy až tvorbou puchýřů, či dokonce nekrózou keratinocytů. Klinicky tedy naplňuje Celsovy<sup>1</sup> znaky zánětu (Scott et al. 2004). Dochází při ní skutečně k akumulaci imunitních buněk, které produkují celou řadu zánětlivých proteinů a způsobují kožní zánět (Hossain et al. 2021; Ansary et al. 2021). V kůži vystavené nadměrné solární radiaci vznikají ve velkém množství také ROS (Mittal et al. 2014), které aktivují signální kaskády v keratinocytech a fibroblastech vedoucí také ke zvýšené expresi zánětlivých molekul, např. cytokinů (Ansary et al. 2021). Parakrinní produkce těchto proteinů dvěma hlavními buněčnými populacemi kůže je dalším faktorem ovlivňujícím melanogenezi v melanocytech (Obr. 8) (Fu et al. 2020). Zvýšená hladina ROS a tedy ve výsledku buněčného stresu může být také spouštěčem některých kožních autoimunitních onemocnění, např. vitiliga, které se vyznačuje autoimunitně podmíněnou ztrátou melanocytů a následnou depigmentací postižené části kůže (Bergqvist and Ezzedine 2020). Bylo zjištěno, že právě u vitiliga dochází k elevaci hladin cytokinů IL-6, IL-17 (*Interleukin-17*) nebo TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Yang et al. 2018). Tyto faktory lze monitorovat i v periferní krvi (Tomaszewska et al. 2020). Škála relevantních molekul ovlivňujících pigmentaci kůže je ale velmi široká (review Fu et al. 2020).

---

<sup>1</sup>Aulus Cornelius Celsus (25 př. n. l. – 50 n. l.)





**Obr. 8 Zánětlivé faktory ovlivňující melanogenezi.** Faktory produkované dvěma největšími buněčnými populacemi kůže – keratinocyty v epidermis a fibroblasty v dermis – parakinně ovlivňují melanogenezi v melanocytech. Keratinocyty stimulují melanogenezi sekrecí proteinů, jako jsou IL-18 (*Interleukin-18*), IL-33 (*Interleukin-33*), GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*), PGE2 (*Prostaglandin E2*) a PGF2 (*Prostaglandin F2*), naopak ji inhibují produkcí TNF, IL-1 $\alpha$  (*Interleukin-1 $\alpha$* ) a IL-6. Fibroblasty podporují melanogenezi sekrecí IL-33, PGE2 a PGF2. Inhibice melanogeneze je stimulována, ze strany fibroblastů, produkcí TNF a IL-6. Obrázky byly staženy z obrázkové banky Servier Medical Art image bank zdarma dostupné na smart.servier.com. Servier Medical Art podléhá licenci Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. Schéma vychází z review Fu et al. (2020) a je upraveno pro potřeby této doktorské práce autorkou.

### 2.2.3 Identifikace melanocytů *in situ* na molekulární úrovni

Identifikace melanocytu na úrovni světelné mikroskopie v základním histologickém barvení technikou hematoxylin-eosin na tkáňovém řezu je jistě možná, ale pro potřeby patologické diagnostiky a dále i pro potřeby výzkumné práce je taková detekce nedostatečně spolehlivá. Významné rozšíření možností studia melanocytů a melanocytárních patologií přineslo rutinní využívání imunohistochemie a v pozdější době i molekulárních metod jako například *in situ* hybridizace.

Na molekulární úrovni jsou melanocyty v epidermis identifikovány dle několika znaků (Tab. 1). Tyto geny a jejich proteinové produkty se objevují primárně při vývoji melanocytů nebo jejich melanogenezi. Bohužel, ani tyto pokročilé techniky zpravidla neumožní identifikaci melanocytu či jeho prekurzorů založenou na jediném markeru. Pro udržení dostatečné senzitivity a specifity bývá tedy pro diagnostické aplikace často užívána paralelně kombinace několika (často 2–3) protilátek.

<b>Pozitivní znaky pro melanocyty epidermis (v abecedním pořadí)</b>
<i>Bcl-2</i>
<i>DOPA</i>
<i>KIT (seu c-Kit nebo CD117)</i>
<i>Melan-A (seu MART-1)</i>
<i>MITF-M</i>
<i>Pmel17 (seu gp100 nebo HMB-45)</i>
<i>S100 protein</i>
<i>SOX10</i>
<i>TYR</i>
<i>TYRP1</i>
<i>TYRP2 (DCT)</i>

**Tab. 1** Specifické antigeny melanocytů epidermis. Tabulka shrnuje abecedně seřazené proteiny, pro které jsou melanocyty v epidermis pozitivní. Na jejich základě lze melanocyty identifikovat na molekulární úrovni, a rozeznat je tak od jiných populací buněk (převzato a upraveno dle Passeron et al. 2007).

Genová rodina Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) je obecně schopna regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány. Tvoří ji jak proapoptické tak antiapoptické proteiny. Proapoptické faktory, např. Bax (*BCL2 Associated X, Apoptosis regulator*), Bak (*BCL2 Antagonist/Killer*), zvyšují propustnost mitochondriální membrány vedoucí k vyloučení cytochromu C z mitochondrie, což je prvotní krok v průběhu programované buněčné smrti. Cytochrom C utváří multiproteinový komplex apoptosom (Eberle and Hossini 2008). Oproti tomu antiapoptické proteiny jako jsou Bcl-2 nebo Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*), inhibují proapoptické faktory a v případě melanocytů regulují jejich přežití (Opferman and Kothari 2018), jak bylo zjištěno i na experimentech s *Bcl2* null myši, které vykazovaly ztrátu pigmentace a dramatickou redukci kmenové populace melanocytů (Mak et al. 2006). Podobně bylo pozorováno i vymizení folikulárních melanocytů u *bcl-2<sup>-/-</sup>* myši, u kterých byla biochemicky detekována ztráta 60–70 % melaninu v druhém vlasovém cyklu po depilaci (Yamamura et al. 1996).

Proto-onkogen KIT (*KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine kinase, též CD117 nebo c-Kit*) kóduje tyrosinkinázový receptor. Ligand, který se na tento receptor váže, je SCF (*Stem Cell Factor*). Po navázání tohoto cytokinu na KIT dochází k fosforylaci mnoha intracelulárních proteinů, které hrají roli v proliferaci, diferenciaci, migraci nebo

v hematopoéze a melanogenezi (Pham et al. 2020). Interakce KIT a SCF je potřebná pro přežití melanocytů při migraci v dermis, ale i v zevní epitelové pochvě vlasového folikulu (Yoshida et al. 2001). Exon 10 u *Kit* kóduje transmembránovou doménu tohoto proteinu. Vyřazení tohoto exonu, s využitím inducibilního knock-out systému *Cre-loxP* (Kim et al. 2018), se u myši fenotypově projevuje bílými skvrnami na srsti a redukcí počtu melanoblastů v raném vývoji (Aoki et al. 2015).

S100 proteiny zahrnují širokou škálu nízkomolekulárních  $\text{Ca}^{2+}$  vázajících proteinů s rozmanitou funkcí, jako jsou regulace proliferace, diferenciací, transkripce, apoptózy,  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázi aj. (Eckert et al. 2004; Donato et al. 2012). Konkrétně zástupce této rodiny, S100B (*S100 Calcium Binding Protein B*), je pozitivním znakem pro melanocyty a je diagnostickým markerem i pro kožní melanom (Shrestha et al. 1998). Podobně i S100A (*S100 Calcium Binding Protein A*) je znakem s vysokou senzitivitou pro melanocyty a buňky maligního melanomu, ale jeho použití při diagnostice je značně nespecifické (Xia et al. 2016). Nutno zmínit, že S100 protein je přítomen i u další epidermální buněčné populace a sice Langerhansových buněk; navíc se nachází i u mnoha jiných buněčných typů zejména původem z buněk neurální lišty jako u Schwannových buněk a astrocytů nebo v oblasti hlavy a krku u chondrocytů či adipocytů (Böni et al. 1997; Donato et al. 2012). Právě s astrocyty se pojí výzkum na myších, u nichž je vyřazen gen pro S100B, který naznačuje, že normální hladiny tohoto proteinu snižují riziko epileptických záchvatů (Dyck et al. 2002). Při chemickém podráždění kůže, např. hydrochinonem a kyselinou retinovou (látky používající se klinicky pro léčbu hyperpigmentací), se zvyšuje intracelulární i extracelulární hladina S100B. Částečné potlačení (tzv. *knock-down*) aktivity tohoto genu u kultivovaných melanocytů vede k jejich apoptóze. Výsledky naznačují, že by zvýšená exprese S100B mohla být kompenzační reakcí pro ochranu melanocytů před cytotoxicitou (Cheong et al. 2014).

S100 je jedním z běžně užívaných znaků při diagnostice melanomu. Oceňována je zejména vysoká senzitivita dostupných protilátek. Při hodnocení 60 cytologických vzorků od 58 pacientů s metastatickým maligním melanomem byl protein S100 pozitivní v 87 % případů. Dokonce i při absenci dvou dalších typických znaků pro melanocyty a maligní melanom – Pmel17 (HMB-45) a Melan-A (MART-1) – byl S100 přítomný v 73 % případů. S100 se tak dá považovat za vysoce užitečný diagnostický marker maligního melanomu (Erdag et al. 2013), zejména je-li užíván v kombinaci s dalšími znaky.

DOPA, TYR, TYRP1, TYRP2, Pmel17 a Melan-A jsou proteiny již zmíněné při melanogenezi a zrání melanosomů. Knock-out genu *Tyrp2* u myši snižuje obsah melaninu

v chlupech a barva srsti je nevýrazná, nicméně viabilita primárních melanocytů je zachována a nebyly zaznamenány změny v distribuci TYR nebo TYRP1 (Guyonneau et al. 2004). Inaktivace genu *Pmel17* (*Pmel*<sup>-/-</sup>) u myši nenarušuje viabilitu ani fertilitu, ale dochází u nich ke snížení eumelaninu v chlupech oproti *wild-type* myším a zároveň melanocyty obsahují více sférické melanosomy. *Pmel17* je tak důležitým faktorem pro epidermální pigmentaci (Hellström et al. 2011). Obdobné výsledky jsou pozorovány u myši s vyřazeným genem pro Melan-A. Myši s touto deficiencí mají deformované melanosomy a dochází u nich opět ke ztrátě pigmentu v kůži a srsti (Aydin et al. 2012).

MITF reguluje transkripci tří hlavních enzymů melanogeneze – TYR, TYRP1 a TYRP2 (D’Mello et al. 2016) a objevuje se v několika isoformách s různým tkáňovým expresním profilem. Jeho M-isoforma (*MITF-M*) je exprimována výhradně u melanocytů (Fuse et al. 1996; Nguyen and Fisher 2019) a je zásadním regulátorem nejen vývoje, proliferace a přežití melanocytů, ale i produkce melaninu (Vachtenheim and Borovanský 2010). Mutace v tomto genu způsobuje jednu z forem Waardenburgova syndromu projevujícího se ztrátou sluchu a defektem v pigmentaci (Tassabehji et al. 1994). Bylo zjištěno, že exprese *MITF* je přímo ovlivňována navázáním SOX10 a PAX3 (*Paired Box 3*) na jeho promotor (Bondurand et al. 2000).

## 2.3 Maligní melanom kůže a jeho fenotyp

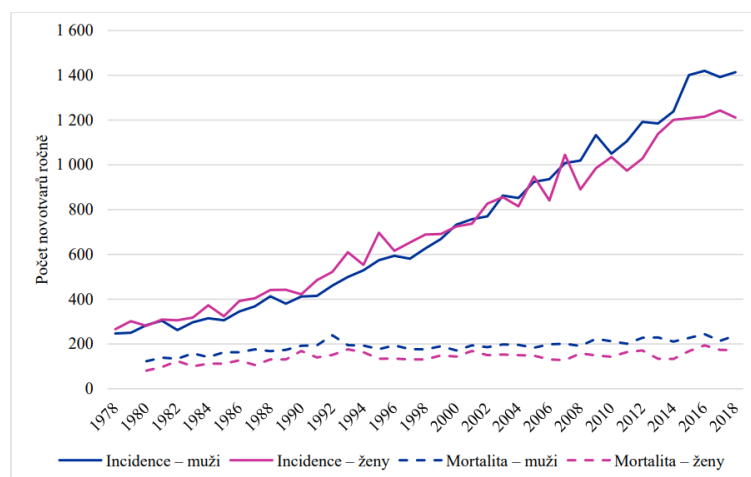
### 2.3.1 Charakteristika a etiopatogeneze

Maligní melanom je jedno z nejzhoubnějších nádorových onemocnění, které vzniká neoplastickou proliferací transformovaných melanocytů. Všeobecně známým rizikovým faktorem pro vznik melanomu je expozice UV záření a zejména pak četnost spálení kůže v průběhu dětství a dospívání (Gandini et al. 2005; Leonardi et al. 2018). Předpokládá se totiž, že kumulace dávky záření v tomto ohledu není plně lineární (Karagas et al. 2007). UV záření tak nadále zůstává nejrizikovějším mutagenem i s odstupem dekad po proběhlé expozici.

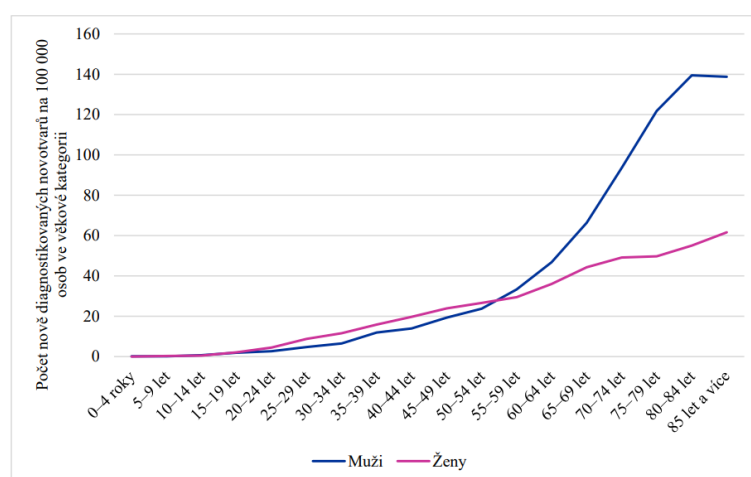
Na UV záření poškozující DNA odpovídají kožní keratinocyty produkcí  $\alpha$ -MSH. Tento hormon je vázán na receptor MC1R (*Melanocortin 1 Receptor*) na melanocytech, což vyvolává uvolnění melaninu, který tvoří ochranný štít před dalším poškozením buněčných jader. Nedostatečné reparační mechanismy a genotoxický efekt UV záření mohou způsobit nekontrolovatelný růst a dělení buněk, které vyústí až ve vývoj melanomu.

Rizikové faktory u maligního melanomu zohledňované v klinické dermatoonkologii jsou fototyp kůže, genetická predispozice, stav imunitního systému, rodinná anamnéza, počet atypických melanocytárních névů a samozřejmě zvyšující se věk (Marks 2000; Abdel-Malek et al. 2000; Hawkes et al. 2016; Leonardi et al. 2018).

Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) byl v poslední hodnocené dekádě, tj. období 2009–2018, pozorován nejvýraznější vzestup celkové incidence onkologických diagnóz právě u zhoubného melanomu kůže, u kterého byla zaznamenána průměrná roční procentuální změna jako nárůst o 3,5 %<sup>2</sup>. I přestože incidence maligního melanomu v České republice (Obr. 9) i celosvětově stále stoupá, mortalita zůstává přibližně stabilní (Obr. 9).



**Obr. 9 Graf pro vývoj incidence a mortality<sup>3</sup> zhoubného melanomu kůže dle pohlaví (absolutní počty).** Data zveřejněná Ústavem zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) za období 2009–2018.



**Obr. 10 Graf věkově specifické incidence zhoubného melanomu kůže.** Data zveřejněná Ústavem zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) za období 2014–2018.

<sup>2</sup><https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018>

<sup>3</sup>Zdroj dat mortality: od roku 1994 Český statistický úřad

Výrazný je počet nově diagnostikovaných novotvarů u mužské populace nad 70 let, kdy křivka nabírá strmě rostoucí tendenci (Obr. 10). Důvodů může být několik. Historickou příčinou mohlo být častější vystavení těchto pacientů slunci při práci ve venkovním prostředí, ale i ve volnočasových aktivitách, a to v období, kdy nebyla propagována účinná fotoprotekce. Fotoprotekce se stala předmětem medicínsky relevantní osvěty teprve přibližně na přelomu 80. a 90. let minulého století (Ma and Yoo 2021). V současné době se jeví i nadále jako primární důvod nižší ochota mužské populace používat fotoprotektivně působící dermokosmetiku, tedy s ochranným faktorem proti slunci (anglicky: *Sun Protection Factor*; SPF) a nebo podstupovat pravidelné preventivní prohlídky u dermatologů (Smalley 2018; Raimondi et al. 2020).

Dalším důvodem odlišnosti postižení pacientů podle pohlaví může být z fyziologického hlediska i nižší hladina hormonu estrogenu, než se vyskytuje u žen. Autoři studie z roku 2018 (Natale et al. 2018) totiž poukázali na fakt, že receptor GPER (*G protein-coupled Estrogen Receptor*) na buňkách melanomu je aktivován právě estrogenem, který spouští signalizaci prostřednictvím protein kinázy A. Přes další komponenty signální dráhy jako je CREB (*CAMP Responsive Element Binding Protein 1*) a MITF dochází k aktivaci genů důležitých pro diferenciaci melanocytů, zvýšenou produkci melaninu, sníženou proliferační aktivitu nebo depleci c-Myc (*MYC Proto-Oncogene*). Deplece tohoto proteinu má na svědomí další významné děje v buňce: hypofosforylaci RB (*Retinoblastoma*) proteinu (pozastavení buněčného cyklu a transkripce), zvýšenou expresi HLA (*Human Leukocyte Antigen*) proteinů a snížený výskyt PD-L1 (*Programmed Cell Death-1 Ligand 1*). To všechno následně zlepšuje odpověď pacienta s maligním melanomem na léčbu (Natale et al. 2018). GPER a „klasické“ estrogenové receptory  $\alpha$  a  $\beta$  byly hodnoceny také u melanomu vyskytující se v těhotenství oproti melanomu u netěhotných žen a mužů. Bylo zjištěno, že při pozitivním nálezu GPER je v 95 % případů pozitivně detekován i estrogenový receptor  $\beta$ . Tato dvojí pozitivní exprese je spojena s příznivější prognózou – nižší bývá hodnota Breslowa (viz kapitola 2.3.2) a mitotická aktivita, naopak vyšší bývá zánětlivá celulizace, tedy infiltrace peritumorálních lymfocytů (Fábián et al. 2017). Snížená exprese estrogenového receptoru  $\beta$  je nalezena u progresivnějších melanomů invadujících hlouběji do dermis (Schmidt et al. 2006).

### 2.3.2 Klasifikace a diagnostika

Maligní melanom je možno v humánní patologii dále rozdělit dle umístění primárního ložiska na kožní maligní melanom (zastoupený dále několika klinickými variantami), slizniční melanom a uveální melanom (Rabbie et al. 2019). V rámci této disertační práce bude pozornost věnována malignímu melanomu kůže, okulární a slizniční forma vykazuje klinicky i biologicky totiž v mnoha aspektech velmi odlišnou problematiku.

V dermatologii používaná klinická klasifikace (Štork et al. 2013) kožního maligního melanomu utilitárně umožňuje popisovat 4 základní klinické varianty:

- 1) lentigo maligna melanom,
- 2) superficiálně se šířící melanom,
- 3) nodulární melanom,
- 4) akrolentiginózní melanom.

Klinicky poněkud vzácnější variantou melanomu je lentigo maligna melanom vznikající v ložisku lentigo maligna. Tato léze složená z dysplastických melanocytů je chápána jako jeho prekanceróza (Iznardo et al. 2020). Lentigo maligna je klinicky nepravidelné pigmentované makulózní ložisko různé velikosti, které se nachází hlavně na sluncem exponovaných částech kůže, jakými jsou obličej a krk (Ward et al. 2017). Typicky se vyskytuje zejména v senu a pomalu progreduje v čase. Tato varianta tedy umožňuje nahlížet na melanom prizmatem klasické vícekrokové postupné karcinogeneze.

Dvě další, klinicky nejčastější, varianty, představují spíše než zcela svébytné jednotky dvě možné morfologické fáze růstu maligního melanomu. Tyto varianty mohou vznikat tzv. *de novo* na kůži bez předchozí léze typu prekancerózy, ale mohou vycházet i z transformace pigmentových névů, ať již kongenitálních, tak získaných. Právě toto téma malignizace melanocytárního névu je klinicky velmi ožehavým problémem, se kterým se pojí možnosti včasné detekce suspektních lézí pomocí epiluminiscenční dermatoskopie (Argenyi 1997). Přes nepopiratelný pokrok a zejména digitalizaci a automatizaci těchto diagnostických prostředků zůstává i nadále definitivní diagnostika melanomu na úrovni histologické.

Superficiálně se šířící melanom představuje iniciálně tenkou lézi. Ve fázi horizontálního (synonymum: radiálního) růstu dochází nejprve v epidermis (tedy *in situ*) k proliferaci atypických melanocytů tvořících atypická hnízda. Maligní melanocyty mohou migrovat do vyšších vrstev epidermis (tzv. pagetoidní šíření (Masterpol et al.

2013)) a do dermálních struktur vzdálených od místa primárního výskytu melanocytů při bazální membráně. Pro klinické posouzení a odlišení suspektních lézí vyžadujících další verifikaci se klinicky používá algoritmus označovaný akronymem ABCDE (složený z počátečních písmen jednotlivých kategorií – anglicky: *Asymmetry, Border, Color, Diameter, Evolving*) (Friedman et al. 1985; Abbasi et al. 2004).

U některých nádorů zaznamenáváme zejména fázi vertikálního růstu, melanocyty rychle invadují do dermis, kde se dále množí. Vznikající nádor tak časně klinicky nabývá charakter nodulární, tedy vyvýšené léze (Štork et al. 2013; Ward et al. 2017). U některých melanomů je dokumentována i velmi dlouhá předpokládaná doba pozvolné horizontální doby růstu (i roky), po které teprve dojde k nástupu vertikální růstové aktivity. Takové léze pak bývají označovány jako tzv. sekundárně nodulární (Krajsová 2018). Striktní odlišování těchto dvou variant tedy není biologicky opodstatněné, ale má nepopiratelnou klinickou hodnotu. Až vyklenování nad povrch okolní kůže upoutává pozornost a ve výsledku může tedy zkreslovat anamnestickou informaci o celkovém trvání procesu.

Poslední varianta, tzv. akrolentiginózní melanom, má vyšší incidenci na akrech, postihuje převážně plosky, dlaně a subunguální (podnehtové) partie. Tato kategorie je definována spíše distribučně, tedy anatomickou lokalizací. Klinicky a biologicky se ale také poněkud odlišuje od předchozích variant, nezřídka zcela pozbývá schopnost produkovat melanin a jeví se tedy jako tzv. amelanotický melanom (Štork et al. 2013; Basurto-Lozada et al. 2021).

Na histopatologické úrovni existuje velké množství variant maligního melanomu. K histologickému popisu rozsahu invaze melanomu byla využívána Clarkova klasifikace (Tab. 2), která morfologicky hodnotí prorůstání nádoru vrstvami kůže (Clark 1967; Clark et al. 1969). Tento přístup je možno dosti dobře aplikovat i na rutinně barveném tkáňovém řezu a historicky byl velmi cenným pokusem o určování prognózy na základě pokročilosti nádoru. Nicméně je tento utilitární přístup zatížen určitou mírou subjektivního hodnocení struktur patologem, dále je pak tuto diskrétně definovanou stratifikaci obtížné statisticky hodnotit, např. pro potřeby analýzy přežívání pacientů.

Z toho důvodu byl o něco později navržen metricky hodnocený parametr (index) metodicky popsán Breslowem. Tato hodnota (tzv. Breslow; vyjádřena v milimetrech, s přesností na desetinu mm) znamená perpendikulárně určenou vzdálenost nejhlouběji uložené nádorové struktury od *stratum granulosum* (Breslow 1970). Tento údaj se klinicky velmi dobře osvědčil jako jednoduchý a současně i spolehlivý prognostický biomarker, jehož vyšší hodnota odráží riziko biologicky nepříznivého vývoje onemocnění



(Štork et al. 2013). Nicméně v praxi je doposud Clarkova klasifikace často uváděna společně s hodnotou podle Breslowa, čímž je možné pro klinika zvýšit komplementárně vypovídací hodnotu těchto parametrů a invazi dát do vztahu ke struktuře okolní kůže.

<b>Klasifikace dle Clarka</b>	<b>Stádium</b>
<b>Intraepidermální výskyt</b>	I
<b>Výskyt ve <i>stratum papillare</i> dermis</b>	II
<b>Nádor zasahuje k papilárně-retikulárnímu přechodu</b>	III
<b>Výskyt ve <i>stratum reticulare</i> dermis</b>	IV
<b>Výskyt v podkožní tukové tkáni</b>	V

**Tab. 2 Klasifikace maligního melanomu dle Clarka.** Tabulka popisuje histologickou klasifikaci melanomu dle hloubky invaze vrstvami kůže (převzato a upraveno dle Hasney et al. 2008).

Americký výbor proti rakovině (anglicky: *American Joint Committee on Cancer*; AJCC) v poslední publikované tzv. TNM klasifikaci pro popis melanomu doporučuje tzv. základní popisnou charakteristiku nádorů (Balch et al. 2009, 7. vydání; Gershenwald et al. 2017, 8. vydání; Keung and Gershenwald 2018, přehled důležitých změn v 8. vydání oproti 7. vydání). V tomto konceptu parametr T popisuje velikost nádoru a stav povrchové ulcerace, parametr N postižení uzlin a parametr M přítomnost vzdálených metastáz a hladinu laktátdehydrogenázy (anglicky: *Lactate Dehydrogenase*; LDH) v séru (Keung and Gershenwald 2018). Tato klasifikace rozděluje melanomy do 4 klinicko-patologických stádií, kdy lze stručně říct, že stádia I a II popisují různě pokročilé fáze lokalizovaného onemocnění, stádium III označuje postižení lymfatických uzlin a stádium IV znamená výskyt vzdálených metastáz. Stádium 0 označuje melanom *in situ* (Clark I) (Štork et al. 2013; Gershenwald et al. 2017).

Pro potřeby rutinní klinické onkologie jsou však zmíněné klinicko-patologické klasifikace často nedostačující (Yang et al. 2020). Vyžadovány jsou stále se zpřesňující indikátory, biomarkery, které mohou v klinické praxi identifikovat například více ohrožené pacienty, či pacienty reagující příznivě na některou léčebnou modalitu. Zavedení těchto biomarkerů do praxe by umožnilo zlepšit prognózu pacientů.

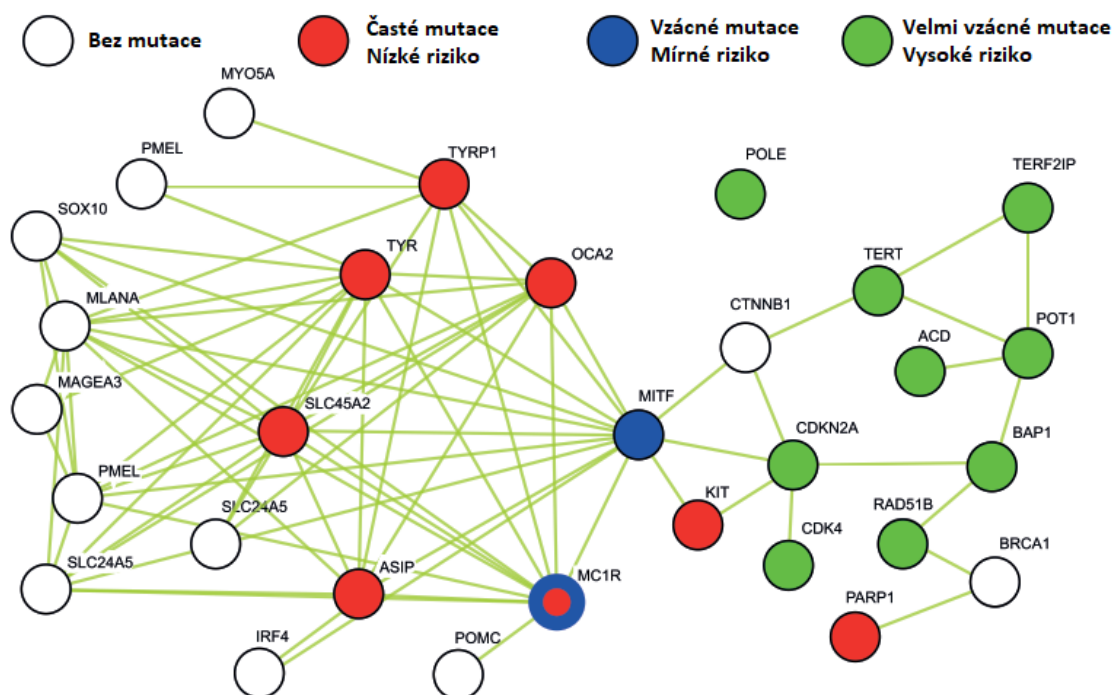
Jedním z příkladů takovýchto postupů aplikovaných v současnosti může být včasné určení genetického profilu melanomu a jeho molekulárně cílená léčba. Předpokladem takovéto stratifikace pacientů je znalost spektra mutací, které se u maligního melanomu vyskytují. Nejčastěji jsou mutace na velkých souborech pacientů identifikovány v genech

*BRAF* (*B-Raf Proto-Oncogene*), *NF-1* (*Neurofibromin 1*) a genové rodině *RAS* (*Rat Sarcoma gene*) – zde je nejčastější mutace v genu *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*). Čtvrtou skupinu představuje tzv. triple-wild type, u kterých jsou nalezeny *wildtype* (nemutované) formy genů *BRAF*, *NRAS* a *KIT* (Rebecca et al. 2020).

Za zmínku stojí i fakt, že geny s vysokou penetrancí a predispozicí pro vznik melanomu významně kontrolují buněčný cyklus. Jsou jimi *CDKN2A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) a *ARF* na stejné chromozomální oblasti 9p21, ale liší se v prvním exonu, nebo *CDK4* (*Cyclin Dependent Kinase 4*) (Pho et al. 2006).

Je zajímavé, že přestože morfologicky patologie typizuje například nádory vycházející z oka a z kůže do jedné kategorie souhrnně uváděné jako „melanom“, je při mutační analýze zjevné, že molekulárně jsou tato onemocnění diametrálně odlišná. Uveální melanom totiž vykazuje somatické mutace nejčastěji v genech *GNAQ* (*G protein Subunit Alpha Q*) a *GNA11* (*G protein Subunit Alpha 11*) (Tang et al. 2016). Některé mechanismy ale slizniční melanomy a kožní melanomy přesto sdílejí. Klinicko-patologická studie naznačuje, že zvýšená exprese c-KIT se objevuje u pacientek s melanomem vulvy a mohlo by se jednat o prognostický faktor tohoto typu melanomu (Heinzelmann-Schwarz et al. 2014).

Další možné genové mutace, které stojí za rizikem vzniku maligního melanomu, shrnuje obrázek 11 (Bertrand et al. 2020).



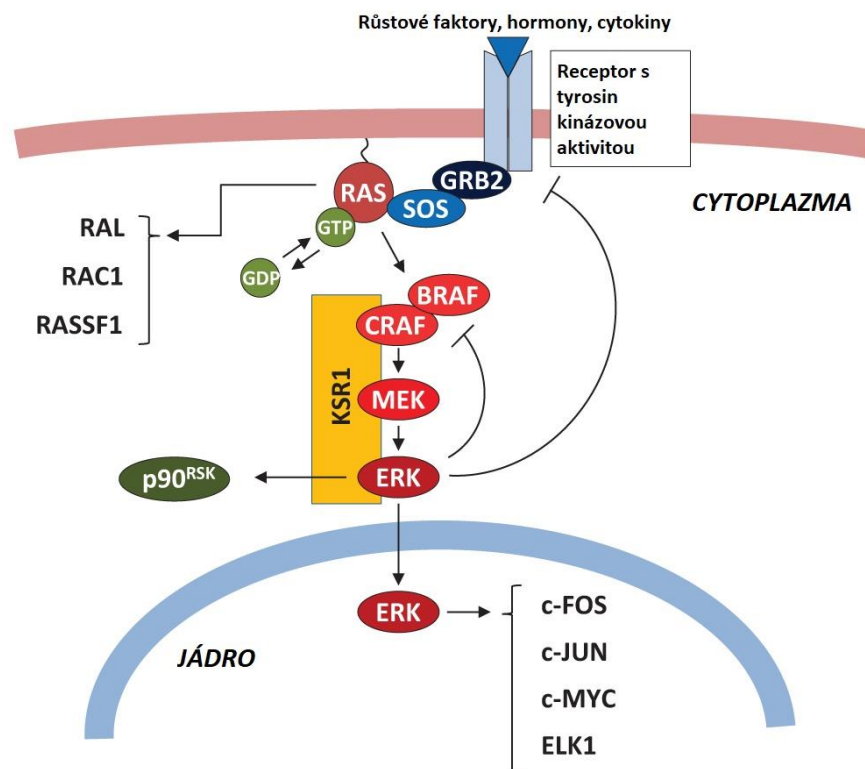
**Obr. 11 Mapa interakcí mezi geny vyskytující se v biologii melanocytů, které jsou spjaté s rizikem vzniku maligního melanomu.** Každý kruh reprezentuje jeden gen a každá čára pak přímou (fyzickou) nebo nepřímou (funkční) vazbu mezi proteiny, které jsou kódovány těmito geny. *Zeleně*: geny s velmi vzácnými mutačními variantami spojenými s vysokým rizikem vzniku maligního melanomu; *modře*: geny se vzácnými variantami spjaté s mírným rizikem vzniku maligního melanomu; *červeně*: geny s častými variantami asociované s nízkým rizikem vzniku maligního melanomu; *bíle*: geny zapojené v biologii melanocytů, které nevykazují známou mutační variantu asociovanou s maligním melanomem. Za zmínku stojí, že levý klastr shromažďuje hlavně geny melanogeneze, a pravý klastr pak geny buněčného cyklu, kontrolního mechanismu délky telomer a geny pro opravy DNA (převzato a upraveno dle Bertrand et al. 2020).

### 2.3.3 *Deregulace hlavních signálních drah vedoucí k vývoji maligního melanomu*

Maligní melanom vzniká většinou na podkladě mnoha získaných somatických genetických změn. Hereditární faktory mohou v tomto procesu sehrávat roli, ale klinický význam tohoto aspektu je v současnosti omezený. Zpravidla jsou poškozeny geny základních buněčných procesů, jako je proliferace, růst a metabolismus, apoptóza, kontrola buněčného cyklu nebo replikace. Tyto genové mutace vedou u melanomu k aberantní aktivaci dvou hlavních signálních drah: mitogenem aktivované proteinkinázy/extracelulárním signálem regulované proteinkinázy (anglicky: *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracelullar signal-Regulated Kinase*; MAPK/ERK) a fosfoinositol-3-kinázy (anglicky: *Phosphoinositol-3-Kinase*; PI3K) (Leonardi et al. 2018).

MAPK/ERK signální dráha (Obr. 12) je aktivována růstovými a stresovými faktory, hormony nebo cytokiny, které se váží s membránovým tyrosinkinázovým receptorem (anglicky: *Tyrosine Kinase Receptor*; RTK). Po vazbě dojde k přenesení signálu na adaptorový protein GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) interagující s faktory GEF (*Guanosine Exchange Factor*), převážně s faktorem SOS (*Son Of Sevenless*). Tím je zajištěna aktivace malé GTPázy RAS navázané na cytoplazmatické membráně (Buday and Downward 1993; Aronheim et al. 1994). Ta následně aktivuje protein z proteinové rodiny RAF (např. BRAF). RAF fosforyluje mitogenem aktivovanou proteinkinázu kinázu (anglicky: *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*; MEK) na serinových zbytcích. Fosforylovaný MEK aktivuje serin/threoninovou kinázu ERK fosforylací motivu threonin-kyselina glutamová-tyrosin. Fosforylovaná ERK působí v cytoplazmě nebo proniká do jádra a reguluje genovou expresi více jak 50 genů převážně zodpovědných za buněčný růst, dělení a diferenciaci. Tento mechanistický diagram má některé klinicky relevantní implikace. Příkladem změny v MAPK signální dráze je *BRAF*

mutace, kdy je nejčastěji valin (V) substituován za kyselinu glutamovou (E) na kodonu 600 –  $BRAF^{V600E}$ . Méně časté jsou substituce za lysin ( $BRAF^{V600K}$ ) nebo arginin ( $BRAF^{V600R}$ ). Takto mutovaný  $BRAF$  významně zvyšuje aktivitu BRAF kinázy a nekontrolovaně spouští další kroky této dráhy, což vede k nadměrné proliferaci neoplastických buněk a k progresi nádoru (Eroglu and Ribas 2016; Aasen et al. 2019; Czarnecka et al. 2020). Vysoká aktivita BRAF se zdála být tedy vhodným terapeutickým cílem u vhodně mutovaného maligního melanomu. Zlomem v léčbě melanomu bylo zavedení BRAF, posléze i MEK inhibitorů a jejich kombinace (viz kapitola 2.3.4.3). Tato léčiva o malé molekule vykazovala klinicky signifikantní efekt, nicméně až 20 % melanomů získá k této léčbě rezistenci, a to buď reaktivací MAPK dráhy nebo aktivací jiných signálních drah zahrnující např. PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), NF-1 nebo RAS (Czarnecka et al. 2020).



**Obr. 12 Přehled MAPK/ERK signální dráhy.** Po navázání ligandu na RTK je signál přenesen přes proteiny GRB2 a SOS na protein RAS. Po navázání GTP (*Guanosintrifosfát*) na RAS dochází k aktivaci dalších kináz v kaskádě (RAF – MEK – ERK). Fosforylovaná ERK působí v cytoplasmě, nebo je translokována do jádra. Následně je schopna stimulovat transkripční faktory, a ovlivnit tak transkripci genů pro různé buněčné procesy. c-Fos – *Fos Proto-Oncogene*, c-Jun – *Jun Proto-Oncogene*, c-Myc – *Myc Proto-Oncogene*, ELK1 – *ETS-Like Gene 1*, GDP – *Guanosindifosfát*, KSR1 – *Kinase Suppressor Of Ras 1*, RAC1 – *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, RAL – *Ras-like protein*, RASSF1 – *Ras association domain family 1* (převzato a upraveno dle Zaballo and Santisteban 2017).

PI3K/AKT signální dráha začíná opět vazbou ligandu na RTK, která aktivuje PI3K. Ta fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát aktivuje proteinkinázu B (anglicky: *Protein Kinase B*; AKT). *PTEN* je tumor-supresorový gen a jeho proteinový produkt se chová jako fosfatáza, která defosforyluje fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát, což vede k inhibici PI3K/AKT signální dráhy, a tím k blokaci buněčné proliferace. Ztráta funkčního PTEN je pozorována ve více jak 10 % všech případech melanomu a vede k aktivaci PI3K/AKT signální dráhy (Paraiso et al. 2011). V důsledku toho je nekontrolovatelně stimulováno přežití buněk, což je zároveň podporováno inhibicí apoptózy (Davies 2012; Aasen et al. 2019; Czarnecka et al. 2020). Studie z roku 2019 (Yoo et al. 2019) popisuje, že u maligního melanomu může důležitou roli pro dráhu PI3K/AKT hrát i malá GTPáza ARF6 (*Adenosine diphosphate-Ribosylation Factor 6*). ARF6 je potřebná pro aktivaci PI3K a AKT a podporuje vznik metastáz a zvýšenou progresi nádoru (Yoo et al. 2019).

#### 2.3.4 *Současné léčebné modality*

Základní modalitou v léčbě časného stadia melanomu zůstává chirurgie, tedy radikální operace včasné detekovaného primárního ložiska se zachováním dostatečného lemu zdravé kůže. U melanomů s tloušťkou nad 1 mm Breslowovy škály je pacient podroben i resekci sentinelové uzliny (Bajčiová 2016), byť tento výkon je spíše diagnostický a neovlivňuje ve výsledku přežívání pacienta. I v pokročilejších stádiích melanomu má chirurgická excize nálezu svůj význam, nicméně v případě metastazujícího melanomu vynětí primárního ložiska, popřípadě resekce spádové lymfatické oblasti (exenterace), nestačí, a je nutno u pacienta zvážit systémovou léčbu. Vzhledem ke značné radio- a chemorezistenci melanomu byly tyto konvenční metody spojeny s relativně nízkým kurativním efektem, dodnes ale například dakarbazin či kombinovaná chemoterapie s využitím platinových derivátů mají své místo v onkologických schématech. Do popředí se tak v léčbě maligního melanomu dostávaly od 80. let imunoterapeutika, zejména látky jako IFN $\alpha$ 2b (*Interferon- $\alpha$ -2b*) a IL-2 (*Interleukin-2*) (Gupta et al. 2017). V poslední dekádě pak nabyla imunoterapie zacilující kontrolní body imunity (checkpoints) značného významu, a stala se tak vedle cílené terapie také metodou volby v klinické praxi. Možnosti současné schválené léčby maligního melanomu shrnuje tabulka 3 (Khair et al. 2019).

Existuje nepřehledné množství experimentálních farmakologických přístupů léčby maligního melanomu, které jsou v různých fázích preklinického a klinického testování. S ohledem na téma předkládané disertační práce a aktuálnosti tohoto tématu je možno zmínit, že terapeutický potenciál vykazují i umělá analoga estrogenů – bazedoxifen a raloxifen. Tyto selektivní modulátory estrogenových receptorů jsou schváleny a klinicky využívány u žen po menopauze k léčbě osteoporózy (Pickar and Komm 2015). Dále se uvádí, že vedlejší mechanismus jejich působení zahrnuje i blokádu interakce IL-6 a jeho receptoru gp130 (*Membrane Glycoprotein 130*). Tento mechanismus by mohl mít v medicíně využití až již v onkologii, tak i v jiných odvětvích medicíny jako je revmatologie či při léčbě infekcí. Navozená blokáda by mohla nejen omezit šíření nádoru, ale omezit i rozvoj kachexie u onkologického pacienta. Mohly by tak zmírnit komplikace u nádorových (Yadav et al. 2017) nebo virem postižených pacientů, např. s onemocněním COVID-19, u kterých se rozvíjí cytokinová bouře (Smetana et al. 2020; Smetana and Brábek 2020).

Lék	Cíl	Mechanismus	Indikace	Rok schválení
<b>Monoterapie monoklonálními protilátkami</b>				
<b>Ipilimumab</b>	CTLA-4	Blokace lidskou IgG1 monoklonální protilátkou	Nereseckabilní pokročilý metastazující melanom	2011
<b>Nivolumab</b>	PD-1	Blokace lidskou IgG4 monoklonální protilátkou	Pokročilý metastazující melanom; refrakterní na ipilimumab	2014* *2017 schválen jako adjuvantní léčba melanomu s postižením lymfatických uzlin nebo u pacientů s metastatickým onemocněním, kteří podstoupili kompletní resekci
<b>Pembrolizumab</b>	PD-1	Blokace humanizovanou IgG4 monoklonální protilátkou	Nereseckabilní melanom – stádium III/IV	2014
<b>Kombinovaná terapie monoklonálními protilátkami</b>				
<b>Ipilimumab + nivolumab</b>	CTLA-4 + PD-1	Blokace monoklonálními protilátkami	Nereseckabilní melanom – stádium III/IV; PD-L1 negativní	2015
<b>Cílená léčba – monoterapie inhibitory tyrosinkináz</b>				
<b>Vemurafenib</b>	BRAF	BRAF inhibitor způsobující apoptózu v důsledku přerušení MAPK signální dráhy	Nereseckabilní melanom s mutací BRAF <sup>V600</sup>	2011
<b>Dabrafenib</b>	BRAF	BRAF inhibitor způsobující apoptózu v důsledku přerušení MAPK signální dráhy	Nereseckabilní melanom s mutací BRAF <sup>V600</sup> (není indikován pro <i>wild-type</i> BRAF melanom (Abraham and Stenger 2014))	2013

<b>Trametinib</b>	MEK	MEK1 a MEK2 inhibitor způsobující buněčnou smrt v důsledku přerušení MAPK signální dráhy	Neresekeabilní melanom s mutací BRAF <sup>V600E/K</sup> (nesmí být použit po BRAF inhibitoru)	2013
<b>Cílená léčba – kombinovaná terapie inhibitory tyrosinkináz</b>				
<b>Dabrafenib + trametinib</b>	BRAF + MEK	BRAF+MEK inhibice	Neresekeabilní melanom s mutací BRAF <sup>V600E/K</sup>	2013
<b>Vemurafenib + cobimetinib</b>	BRAF + MEK	BRAF+MEK inhibice	Melanom s mutací BRAF <sup>V600</sup>	2015**
**2018 schválen jako adjuvantní léčba u pacientů s melanomem s postižením lymfatických uzlin, kteří podstoupili kompletní resekci				
<b>Další možnosti cílené léčby a imunoterapie</b>				
<b>Interferon</b>	IFN $\alpha$ 2b	Imunostimulační účinky jako zvýšení nádorové infiltrace lymfocyty, snížení cirkulujících T-reg a modulace rovnováhy STAT1/STAT3	Adjuvantní terapie pro stádium III (bez melanomu, ale s vysokým rizikem rekurence); adjuvantní léčba pro stádium IIB nebo IIC s primární lézí melanomu; tloušťka > 4mm	1995
<b>Aldesleukin</b>	IL-2	Proliferace T lymfocytů a stimulace cytotoxicity CD8 + NK	Metastatický melanom	1998
<b>T-VEC</b>	Onkolytický herpes simplex virus	Lokální a přímá infekce a smrt nádorových buněk	Neresekeabilní melanom stádia IIIB, IIIC nebo IV	2015

**Tab. 3 Možnosti léčby maligního melanomu.** Tabulka shrnuje možnosti schválené cílené léčby, imunoterapie a další kombinované terapie v léčbě maligního melanomu (převzato a upraveno dle Khair et al. 2019).

#### 2.3.4.1 Chemoterapie a radioterapie

Od 70. let 20. století byla primární léčbou metastatického melanomu chemoterapie v čele s alkylačním cytostatikem dakarbazinem, která vykazovala léčebnou odpověď pacientů mezi 15–25 % (Gogas et al. 2007). Pro zlepšení pacientovy odpovědi na léčbu melanomu byly prováděny studie s kombinovanými chemoterapeutickými režimy, tj. s kombinací různých chemoterapeutik v pravidelně opakované sekvenci, příkladem je trojkombinace cytostatik cisplatinu, vinblastinu a dakarbazinu (tzv. CVD režim), která vykazovala léčebnou odpověď kolem 40 % (Legha et al. 1989).

Radioterapie je u melanomu využívána především v adjuvantní léčbě, např. po vyjmutí primárního ložiska nebo sentinelových uzlin. Zároveň je hojně využívána v paliativní léčbě pro redukci symptomů nemoci a pro zlepšení kvality života (Strojan 2010). Jako forma lokální léčby může být použita v případě nedostatečné resekce u lentigo maligna nebo u metastatického melanomu, kde je problematické chirurgické odstranění metastáz, především v mozku (Bajčiová 2016).

#### 2.3.4.2 Imunoterapie cílená na kontrolní body imunity (*checkpoints*)

Přítomnost buněk imunitního systému v maligním melanomu byla na histologické úrovni známa již dlouho. Přestože tato infiltrace je u maligního melanomu poměrně nápadná, nebylo klinicky zřejmé, že by imunitní systém udržoval zhoubný nádor pod kontrolou. Velký význam byl v tradiční představě připisován T cytotoxickým lymfocytům a očekávalo se, že nádorová progresse je důsledkem jejich nedostatečné funkce.

Aktivace T lymfocytů je složitý několika krokový proces vyžadující specifické navázání T-buněčného receptoru (anglicky: *T-cell Receptor*; TCR) na hlavní histokompatibilní komplex (anglicky: *Major Histocompatibility Complex*; MHC) na cytoplazmatické membráně víceméně všech buněk lidského organismu (MHC typ I). MHC (typ II) má význačnou roli v prezentování antigenních peptidů vzniklých uvnitř patogenem napadené nebo neoplastické buňky nebo na antigen prezentujících buňkách (anglicky: *Antigen Presenting Cells*; APC). Kromě toho musí být k úplné aktivaci přítomen kostimulační signál, čímž je zpravidla vazba CD28 molekuly na povrchu T lymfocytů s molekulami CD80 a CD86 (oba patří do imunoglobulinové rodiny B7) na povrchu APC (Obr. 13) (Buchbinder and Desai 2016).

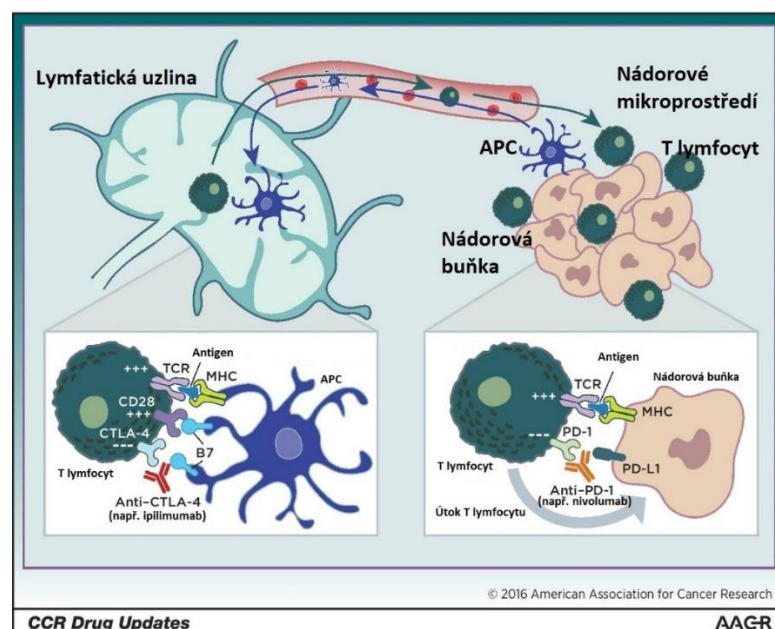
Ochranu organismu před nadměrnou aktivací T lymfocytů a celého imunitního systému zajišťují kontrolní body imunity, tzv. checkpointy, které tak brání vzniku autoimunitních nemocí. Druhou stranou mince tohoto mechanismu je ale umožnění navození nádorové tolerance, což ve výsledku nádorovým buňkám usnadňuje únik před T lymfocyty. Blokáda imunitních kontrolních bodů umožňuje obnovit proliferaci T lymfocytů a prodloužit jejich aktivaci, čímž je zesílena T lymfocytární imunitní reakce a imunitní dozor (Krajsová 2015). Mezi takové nejznámější imunitní kontrolní body patří CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4*) a receptor PD-1 (*Programmed Cell Death 1*) s ligandem PD-L1 (Obr. 13) (Ott et al. 2013). Jelikož kontrolní body imunity fungují



na principu interakce receptor-ligand, mohou být snadno blokovány protilátkami nebo modulovány rekombinantními formami těchto receptorů/ligandů (Pardoll 2012).

Dokladem klinické aplikovatelnosti tohoto terapeutického konceptu je terapeutická blokáda CTLA-4. CTLA-4 je inhibiční molekulou, která se váže s vyšší afinitou k molekulám CD80 a CD86 na APC než kostimulační CD28, takže nedochází k tvorbě aktivačního signálu, naopak dochází k potlačení T lymfocytární aktivity (Sobhani et al. 2021). Přesný mechanismus této inhibice nebyl ještě popsán, ale navrhovanými možnostmi jsou např. přímá inhibice TCR (Schneider et al. 2006) nebo odstranění ligandů CD80 a CD86 z APC trans-endocytózou (Qureshi et al. 2011). CTLA-4 reguluje proliferaci T lymfocytů v rané fázi imunitní odpovědi, primárně v lymfatických uzlinách nebo slezině (Buchbinder and Desai 2016).

Monoklonální protilátka proti CTLA-4 na T lymfocytech byla prvním schváleným lékem v oblasti imunoterapie maligního melanomu (Pardoll 2012; Buchbinder and Desai 2016; Carlino and Long 2016). Klinická studie hodnotící účinnost tohoto inhibitoru CTLA-4 s dakarbazinem vůči dakarbazinu s placebem odhalila, že monoklonální protilátka proti CTLA-4 zlepšila medián celkového přežití pacientů na 11,2 měsíce oproti 9,1 měsícům u kontroly (Robert et al. 2011).



**Obr. 13 Aktivace T lymfocytu s využitím monoklonálních protilátek proti CTLA-4 a PD-1.** Komplexní proces aktivace T lymfocytu zahrnuje vazbu TCR a MHC s navázaným antigenem a kostimulační vazba CD28 s molekulami z rodiny B7 (např. CD80 a CD86). Mimo to se na povrchu T lymfocytů vyskytují imunitní kontrolní body (CTLA-4, PD-1), které chrání organismus před nadměrnou aktivací imunitního systému. V případě anergie imunitního systému u onkologických pacientů byly vyvinuty inhibitory imunitních kontrolních bodů (např. ipilimumab, nivolumab) uplatňující se v protinádorové léčbě (Carlino and Long 2016).

PD-1 je dalším z imunitních checkpointů patřících do stejné imunoglobulinové rodiny jako CD28 a CTLA-4. Oproti CTLA-4 potlačuje T lymfocytární imunitní odpověď během efektorové fáze v periferních tkáních včetně nádorového mikroprostředí (Ott et al. 2013; Buchbinder and Desai 2016). Receptor PD-1 využívá, pro svou správnou funkci, dvou přirozeně se vyskytujících ligandů – PD-L1 a PD-L2 (*Programmed Cell Death 1 Ligand 2*). Dráha PD-1/PD-L1 podporuje apoptózu T lymfocytů (Zatloukalová et al. 2016). Vzhledem k účinnosti jsou v současné době anti PD-1 monoklonální protilátky preferovány jako standardní postup v první linii léčby. Klinická studie, v které byla hodnocena účinnost kombinace inhibitoru PD-1/PD-L1 s inhibitorem CTLA-4, prokázala zlepšení přežití bez progresu na 11,5 měsíce oproti monoterapiím (inhibitorem CTLA-4 – 2,9 měsíce; inhibitorem PD-1/PD-L1 – 6,9 měsíce) (Larkin et al. 2015).

#### 2.3.4.3 Cílená léčba

Odhalení mutací stojících za vznikem maligního melanomu v MAPK signální dráze vedla k vývoji BRAF inhibitorů, jako jsou vemurafenib a dabrafenib, jejichž cílem je hyperaktivovaná BRAF kináza, nebo MEK inhibitorů působících níže (*downstream*) v signální dráze, jako jsou trametinib a cobimetinib (Faghfuri et al. 2018). Nepříznivým aspektem jednotlivých inhibičních preparátů při léčbě melanomu je získaná rezistence s následnou progresí léčiv (Eroglu and Ribas 2016). Z toho důvodu byly klinicky zkoumány reakce pacientů na kombinaci BRAF a MEK inhibitorů (Ribas et al. 2014; Larkin et al. 2014; Ribas et al. 2020). Tyto studie ukázaly příznivý terapeutický přínos, a to i u pacientů, kteří v předchozí léčbě podstoupili monoterapii BRAF inhibitorem, jakožto jedinou dostupnou možností léčby v dřívějších letech.

#### 2.4 Nádorové mikroprostředí a jeho modelování

Nádorové mikroprostředí je důležitým faktorem ovlivňujícím chování nádoru a jeho biologické vlastnosti. Dominantní populaci nádorového mikroprostředí představují nádorově asociované fibroblasty (CAF). CAF produkují složky ECM a sekrecí cytokinů, chemokinů a jiných proteinů bioaktivní povahy stimulují progresi a šíření nádoru. Komplexní ekosystém nádoru doplňují ještě nejrůznější imunitní buňky, endotelové buňky, pericyty a z nich tvořené krevní a lymfatické cévy (Lacina et al. 2015; Lacina et al. 2018).

Chování buněk bývá běžně studováno v laboratorních dvojrozměrných kultivačních podmínkách, kdy buňky adherují na kultivační plastik. Jedná se o kultivaci v takzvaném monolayeru a je možné takto dosáhnout kultury jak primárních populací, tak spontánně vzniklých či cíleně immortalizovaných buněčných linií. Tyto podmínky však nepřinášejí věrný obraz fyziologie nádoru. Snahou je tak vytvářet trojrozměrné buněčné modely nebo organotypické kultury kůže simulující kromě nádoru i nádorové mikroprostředí a vzájemné buněčné interakce.

#### 2.4.1 Jednoduché modely mikroprostředí ve 2D

Adherentní primární buněčné kultury nebo ustanovené buněčné linie kultivované ve dvojrozměrných kultivačních podmínkách konvenčním přístupem nejsou dostatečně věrným obrazem složitého nádorového ekosystému. Buňky monokultury v takto redukováném prostředí ztrácejí možnosti interakce s jinými buněčnými typy, ale i interakce s nebuněčným prostředím, což jsou kritické aspekty pro regulaci jejich fyziologické funkce v každé tkáni (Xie et al. 2021). Snahou je tedy tyto planární buněčné modely modifikovat do té míry, aby lépe přiblížily prostředí a chování nádoru. Jednou z takových fyzikálně-chemických modifikací může být například modifikace kultivačního povrchu (například jeho tuhost, *stiffness*; povrchový reliéf, míra hydrofobicity, přítomnost adhezaných peptidů či proteinů), ale i nastavení fyzikálních parametrů kultivačního prostředí např. teploty, laminárního proudění média nebo hypoxie.

Zejména hypoxie pak pro studium nádorů představuje velmi významné téma. Jedná se o adaptaci solidních nádorů na nízký přísun kyslíku. V důsledku trvající intratumorální hypoxie je podpořena jejich agresivita a metastatický potenciál, dochází k novotvorbě cév, nádory vykazují nižší senzitivitu k radio- a chemoterapii a metabolicky se přepínají na využívání glukózy (Li et al. 2021). Při hypoxii v nádorové tkáni je snížena aktivita specifických prolyl hydroxyláz a naopak jsou aktivovány transkripční faktory indukované hypoxií (anglicky: *Hypoxia-Inducible Factor*; HIF) (Balamurugan 2016). Při vyřazení funkce genů (jejich umlčením, též silencingem, prostřednictvím různých genetických metod či chemických inhibitorů) pro HIF-1 $\alpha$  a jednu z miRNA (*MicroRNA*; miR) – miR-210 – byla na základě měření mitochondriální aktivity, produkce ROS a metabolických změn pozorována apoptóza u melanomové linie A375 (Špaková et al. 2021). Spojitost HIF-1 $\alpha$  a miR-210 byla ale pozorována, např. i u nádorů hlavy a krku (Huang et al. 2009).

Další možnou modifikací 2D kultivace, která zvyšuje komplexnost tohoto tradičního přístupu, může být vytvoření směsné kultury (tj. kokultivace). V tomto případě jeden typ buněk působí na typ druhý a dochází k velmi rozsáhlé interakci nejen fyzické (přímé), ale i prostřednictvím uvolňovaných biologicky aktivních molekul (tj. nepřímé, parakrinní). Tento prvek je v podstatě vždy přítomen u primárních buněčných kultur *in vitro*, kdy směs buněk putuje z kousků tkání zdravých či nádorových a ovlivňují se navzájem. V pozdějších vyšších pasážích ale často převládne jeden dominantní buněčný typ, což sníží výpovědní hodnotu experimentu.

Historicky velmi cenným pionýrským příkladem takové kokultivační techniky může být užití radiací nebo mitomycinem proliferace inaktivovaných fibroblastů jako podpůrné vrstvy (tzv. feederu) pro pěstování humánních keratinocytů *in vitro* (Rheinwald and Green 1975). Metoda díky interakci dvou buněčných typů umožnila i přípravu materiálu pro klinické aplikace v popáleninové medicíně.

V podobně koncipovaném experimentálním modelu bylo využito nádorově asociovaných fibroblastů pro studium jejich vlivu na primární humánní keratinocyty. Bylo zjištěno, že kokultivace stromálních fibroblastů z bazocelulárního karcinomu a zdravých keratinocytů pozměňuje vlastnosti zdravých keratinocytů a posouvá je směrem k fenotypu, který se objevuje u keratinocytů bazaliomu, např. exprese některých jednoduchých keratinů (např. keratin 19) (Lacina et al. 2007).

Pro potřeby analýzy vlivu kokultivace je možno sledované populace od sebe fyzicky oddělit pomocí tzv. insertové techniky. Buňky tedy ztrácejí možnost přímého fyzického kontaktu, ale prostřednictvím propustných membrán insertů dochází při definované porozitě materiálu i nadále ke kontinuálnímu prostupování uvolňovaných malých molekul aktivních látek přes póry této membrány. Použití insertu tedy akcentuje mechanismy, které se účastní regulace ve tkáni v parakrinním módu. Využití této metody pro jednoduché modelování mikroprostředí bylo použito i v publikaci (I), která je součástí této disertační práce (Jobe et al. 2018). Při použití insertů s většími póry (obvykle 8  $\mu\text{m}$ ) lze tuto metodu přetvořit v tzv. *transwell migration assay* pro studium buněčné migrace či invazivity (Justus et al. 2014), což činí metodiku atraktivní například pro studium buněk melanomu nebo jimi ovlivněných buněčných typů (Zhou et al. 2018; Dong et al. 2021).

Systém, který může být vnímán jako pomezí 2D kultur i 3D modelů, je mikrofluidika (Coluccio et al. 2019). Jedná se o techniky, ve kterých jsou vytvářeny pro studium buněk struktury s komplexy kanálků a komůrek osídlených buňkami, méně často tkáněmi či

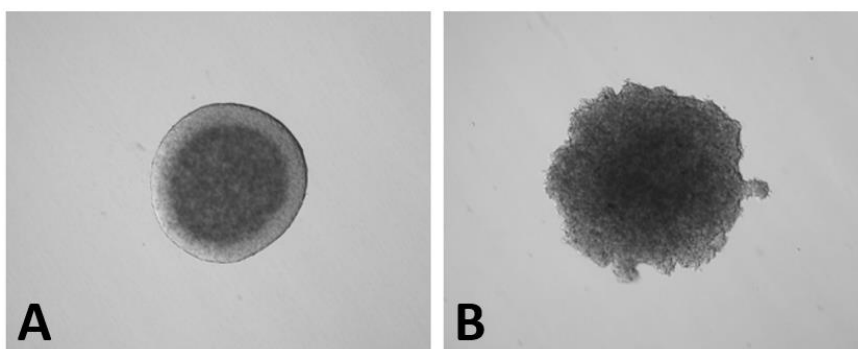
jejich explantáty. V kanálcích kontinuálně a orientovaně proudí kultivační médium (často je tok regulován na základě jednoduchých fyzikálních principů kapilárních sil). Tato zařízení umožňují přesnou kontrolu různých parametrů fyzikálních a chemických, např. koncentračních gradientů látek nebo tlaku (Mehling and Tay 2014). Mikrofluidní systémy umožňují i sledování interakcí v nádorovém mikroprostředí. Příkladem může být komunikace mezi imunitními splenocyty a buňkami melanomu oddělenými v komůrkách mikrofluidního zařízení, ale propojenými kanálky (Mattei et al. 2014). V tomto případě je výhodou kontinuální pomalý tok média a lze tedy na základě designu systému rozhodnout, která populace bude zdrojem a která cílem pro působení aktivních molekul.

#### *2.4.2 Jednoduché modely mikroprostředí ve 3D*

Nejjednodušším trojrozměrným modelem je přerůstání buněk z monolayeru do mnohovrstevné kultury, tzv. multilayeru (Benien and Swami 2014). V tomto případě nedochází zejména u nádorových imortalizovaných linií k zastavení mitotické aktivity kontaktní inhibicí. Fenomén proliferační zástavy v postkonfluentní fázi kultury buněk vzájemným kontaktem se uplatňuje ale spíše u buněk normálních, např. u fibroblastů. Vzniklá mnohovrstevná struktura pak může vykazovat velmi odlišné vlastnosti než klasické 2D kultury. V některých případech mohou vznikat u kultur ponechaných bez pasáže i sférické útvary uvolňované do média.

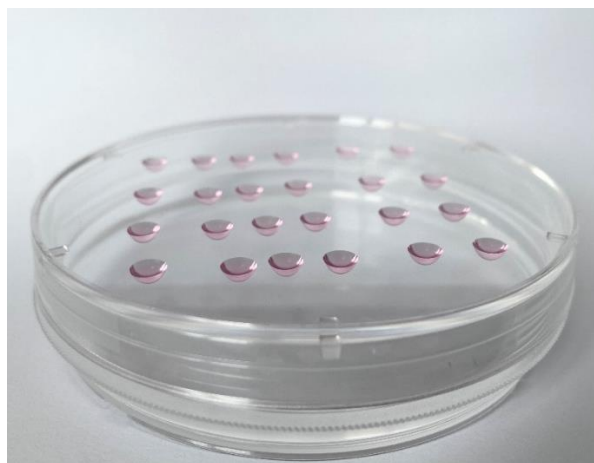
Dalším klasickým přístupem, který posouvá jednoduchý model k vyšší úrovni komplexnosti, je simulace extracelulární matrix pomocí hydrogelů ze zesíťovaných složek ECM. Kultivace buněk tak probíhá v přirozených, jednodruhových či komplexně definovaných hydrogelech (např. želatina, kolagen typu I, fibrin, laminin, kyselina hyaluronová, alginát, Matrigel<sup>®</sup>, atd.) (Vasile et al. 2020), nebo syntetických hydrogelech (např. polyethylenglykol a polyvinylalkohol) (Chen et al. 2018b; Bettahar et al. 2021; Zulkiflee and Fauzi 2021). Velmi populárním se stal při modelování 3D struktur Matrigel<sup>®</sup>, který je solubilizovanou maticí bazální membrány secernovanou buňkami myšího Engelbreth-Holm-Swarmova sarkomu. Tento produkt obsahuje převážně laminin, kolagen IV, heparan sulfátové proteoglykany a entaktin, tedy proteiny běžně se objevující v bazální membráně (Kleinman et al. 1982). Tyto modely umožňují například studium invaze nádorových buněk.

Hojně využívaným trojrozměrným modelem jsou sféroidy (Obr. 14). Jedná se o agregáty z buněk jednoho i více typů, vhodné pro simulaci převážně avaskulárních solidních nádorů a jejich mikroprostředí (Riffle and Hegde 2017).



**Obr. 14 Sféroidy.** Sféroidy vytvořené po 48 hod. metodou visící kapky z 50 000 buněk (A) linie dlaždicobuněčného karcinomu hypofaryngu FaDu (ATCC HTB-43™) a (B) linie maligního melanomu G-361 (ATCC CRL-1424™).

Technicky mohou být vytvořeny např. kultivací v peletě za využití centrifugace (Achilli et al. 2012), na neadhezivních kultivačních nádobách (Redondo-Castro et al. 2018), metodou visící kapky (Obr. 15) (Raghavan et al. 2015; Schmid et al. 2016; Gupta et al. 2021), pomocí rotačních kultur a bioreaktorů (Phelan et al. 2019), na základě mikrofluidního systému (Aijian and Garrell 2015; Aref et al. 2018) nebo magnetickou levitací (Ryu et al. 2019; Urbanczyk et al. 2020; Gaitán-Salvatella et al. 2021; Kotze et al. 2021).



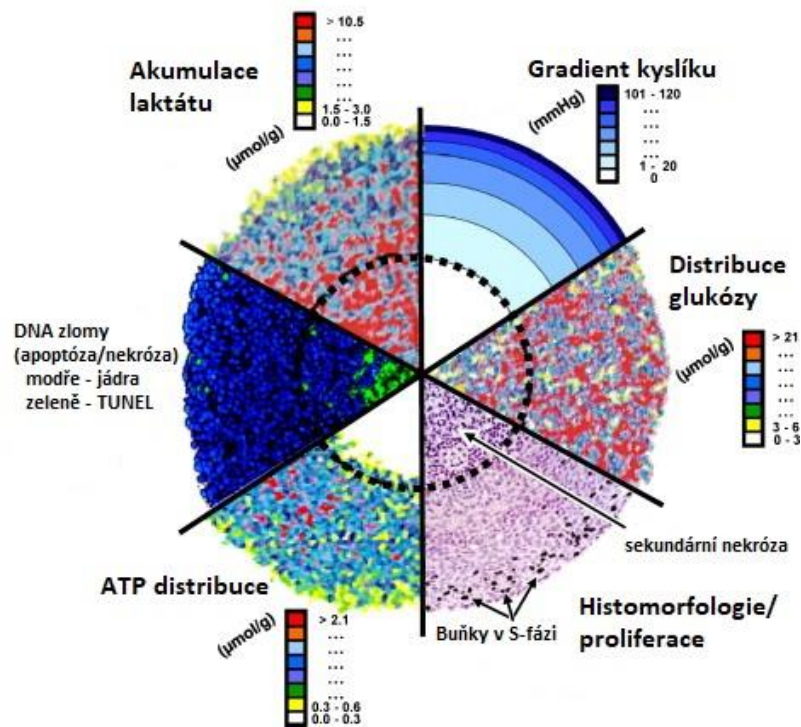
**Obr. 15 Metoda visící kapky.** Fotografie znázorňuje metodu visící kapky (z anglického *hanging drop method*). Tato metoda umožňuje vytvoření 3D modelu sféroidu (Obr. 14), čímž lze simulovat interakce různých buněčných typů v nádorovém mikroprostředí. Tato metoda byla využita v publikaci VIII, kde byly dva typy různě aktinicky poškozených fibroblastů jednotlivě smíchány s buňkami melanomové linie G-361 v poměru 1:1. Na spodní neadhezivní povrch víčka Petriho misky pak byly pomocí pipety umísťovány kapky o objemu 25  $\mu$ l a počtu 50 000 buněk na kapku z dané buněčné suspenze. Dno misky bylo naplněno 15 ml pufrovaným fyziologickým roztokem (anglicky: *Phosphate-Buffered Saline*; PBS) pro zachování humidity. Miska byla přikryta víčkem s visícími kapkami (viz fotografie) a inkubována (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) po dobu 60 hod. Zformované sféroidy byly následně přeneseny do kultivačního média v neadhezivní bakteriologické Petriho misce na dalších 48 hod. Podobně byla metoda visící kapky použita i v publikaci IX.

V současnosti se jako časově výhodná metoda pro tvorbu uniformních sféroidů jeví tzv. *bioprinting* (biotisk), kdy jsou jednotlivé buňky obalené v bioinkoustu extrudovány na kultivační plochu pomocí biotiskárny (Zhuang et al. 2021; Anada et al. 2019; De Moor et al. 2020; Swaminathan and Clyne 2020; Zhao et al. 2019; Williams et al. 2013). Schmidt *et al.*, (2019) použili buněčné linie maligního melanomu pro biotisk ve třech různých materiálech: Matrigelu<sup>®</sup> a dvou komerčně dostupných bioinkoustech s obsahem alginátu nebo metakrylované želatiny. Autoři zjistili, že buňky melanomu, v bioinkoustu vytvořeném na podkladě alginátu neproliferují, zatímco v metakrylátovém želatinovém bioinkoustu vytváří malé shluky buněk po 7 dnech kultivace. Kultivaci v Matrigelu<sup>®</sup>, který nejméně napodobuje přirozené podmínky, tolerovaly melanomové linie dobře, proliferovaly rychle a buňky byly schopné migrovat a prostupovat materiálem (Schmidt et al. 2019).

Nicméně možnosti bioprintingu pro onkologický výzkum se nadále rozšiřují. Jelikož vytvoření 3D buněčné formace v bioinkoustu trvá nějaký čas, Swaminathan *et al.*, (2019) se pokusili tisknout v bioinkoustu už přímo předem vytvořené sféroidy z lidské epitelové buněčné linie (karcinomu prsu). Sféroidy si zachovaly svůj tvar, funkci i životaschopnost. Na modelu byla následně testována účinnost chemoterapeutika paclitaxelu. Je velmi významné, že buňky ve sféroidu byly vůči působení paclitaxelu odolnější v porovnání s jednotlivými buňkami ve 2D kultuře. Další kvalitativní skok nastal tehdy, když byly sféroidy komponovány jako smíšeně buněčné, a kromě lidských epitelových maligních buněk obsahovaly i buňky endotelu. Jelikož paclitaxel je cytostatikem s anti-angiogenními účinky (Belotti et al. 1996; Schwartz 2009; Bocci et al. 2013), působil ve sféroidech smrt endotelových buněk, a došlo tak k dezintegraci struktury sféroidů a k rozptýlení viabilních epitelových buněk v bioinkoustu (Swaminathan et al. 2019).

Sféroidy mají obdobně jako nádory centrální oblast nedostatečně zásobenou kyslíkem a živinami (Obr. 16), jako to bylo popsáno např. u karcinomu prsu. Zpravidla se ve středu nalézá až nekrotická buněčná drť a málo aktivní buňky (Jimenez et al. 2001). Naproti tomu periferní zóna sestává hlavně z mitoticky aktivních buněk pozitivních na Ki-67 (*Marker of Proliferation Ki-67*) schopných proliferace a migrace ze sféroidu (Vörsmann et al. 2013). Sféroidy jsou sice vyráběny z relativně homogenní populace nádorových buněk, ale následná metoda kultivace ve 3D přináší diverzifikaci této populace, což dobře odpovídá heterogenitě vídané v tumorech. Chiew *et al.* (2017) analyzovali komunikaci mezi buňkami z karcinomu jater a endotelovými buňkami, které

tvořily komplexní kanály připomínající kapilární řečiště uvnitř hypoxického centra sféroidu. Na tomto modelu pak bylo možno hodnotit změněný cytotoxický efekt anti-angiogenních látek sorafenibu, sunitinibu a axitinibu. Bylo pak evidentní, že hypoxické jádro významně moduluje příjem léčiva, což ukazuje realističtější penetrační gradient ve srovnání s monolayerem (Chiew et al. 2017).



**Obr. 16 Charakteristika sféroidu.** Kombinací různých technik je vidět koncentrické uspořádání kyslíku, živin, proliferujících a viabilních buněk uvnitř sféroidu a směrem k jeho periferii (převzato a upraveno dle Hirschhaeuser et al. 2010). *TUNEL* – metoda pro detekci DNA zlomů značením 3'-hydroxylovaných konců ve dvouřetězcových DNA zlomech generovaných během apoptózy/nekrózy.

### 2.4.3 Organotypické modely kůže

Organotypické modely kůže představují pokusy o rekonstrukci kůže *in vitro* zapojením relevantních buněčných populací. V minimalistickém pokusu lze použít keratinocyty jako zdroj pro modelování epidermis a fibroblasty zalité v kolagenovém gelu jako jednoduchý model dermis. V širším pojetí lze pro zvýšení fyziologické relevance do modelu dosadit další buněčné typy nacházející se v kůži, např. melanocyty, Langerhansovy buňky, endotelové buňky nebo linie nádorové, a vytvořit tak komplexnější model (Oh et al. 2013). Výhodou je samozřejmě uniformita a reprodukovatelnost výsledků, zejména pokud je model založen na immortalizovaných buněčných liniích. To ale nutně vnáší do modelu také odchylky od standardních



fyziologických regulačních principů. Mnohem náročnější je využití primárních humánních buněčných populací s omezenou proliferační kapacitou. Tento přístup často vyžaduje pro udržení reprodukovatelnosti výsledků „poolování“ (tj. smíšení) primárních buněk od více dárců (Stoddart et al. 2012).

Trojrozměrné modelování se snaží více odrážet fyziologické prostředí a organotypické konstrukty strukturně odpovídají architektuře tkáně. Zároveň poskytují atraktivnější platformu pro studium nádorové senzitivity k léčivým přípravkům. V neposlední řadě je ale nutno vzít v úvahu, že v biomedicinském výzkumu je v poslední dekádě patrná snaha organotypické modely zařadit do rutinního testování s cílem významně nahradit či plně eliminovat modely zvířecí.

Význam hybridního modelu lze ilustrovat na melanomových sféroidech inkorporovaných do organotypického rekonstruktu kůže. Tento model prokázal významné rozdíly v terapeutickém výsledku při srovnání s konvenčními dvourozměrnými kulturami. Obě léčebné kombinace, TRAIL (*Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) + cisplatina a TRAIL + UVB záření, efektivně omezovaly životnost buněk melanomu ve 2D kultuře, zatímco u komplexního 3D modelu byly usmrceny pouze při použití kombinace TRAIL + cisplatina (Vörsmann et al. 2013). Jinou metodou vytvořený hybridní model doplněný ještě o krevní a lymfatické cévy umožňuje například komunikaci mezi nádorem a mikroprostředím. Na tomto modelu byl jako léčivo studován BRAF inhibitor vemurafenib, který podle předpokladu ovlivnil proliferaci a apoptózu melanomových buněk. Překvapivě ale byly pozorovány buňky schopné další proliferace i po vystavení vemurafenibem. Tyto se vyskytovaly hlavně v blízkosti fibroblastů, což demonstruje jejich podpůrný a ochranný účinek (Bourland et al. 2018).

#### 2.4.4 Zvířecí modely

Chování nádoru a jeho mikroprostředí je často studováno *in vivo* na zvířecích modelech, které poskytují ve srovnání s *in vitro* modely komplexnější obraz fyziologie a patologie, a jsou tedy předstupněm ke klinickým studiím. Oproti *in vitro* modelům se jedná ale o možnost eticky problematickou a cenově nejnáročnější.

Široce používanými modelovými organismy pro studium nádorové biologie jsou myši (*Mus musculus*), respektive jejich různě upravené kmeny (Szadvari et al. 2016; Poh et al. 2016; Kersten et al. 2017; Olson et al. 2018). Myš představuje výhodný savčí model, ale pro experimentální účely a pro jejich reprodukovatelnost je často nutno tohoto

živočicha výrazně modifikovat, například modifikovat jeho imunitní systém. Myš tak poskytuje relativně snadné možnosti tvorby vysoce definovaných imunologicky defektních kmenů, které zefektivňují xenotransplantace, např. humánních maligních buněčných linií (Morton et al. 2016). Limitem pro reprodukovatelnost výsledků je používání vysoce inbrední populace. S postupem doby ale bylo prokázáno, že lidský a myší imunitní systém nejsou plně funkčně identické (Mestas and Hughes 2004). Pro přiblížení lidským imunologickým procesům bylo nutno používat humanizované myší modely. Jedná se o imunodeficientní myši, které mají transplantované lidské geny, buňky či tkáň (Allen et al. 2019). Jedním z takových prvních modelů byla myš s geneticky podmíněnou těžkou kombinovanou imunodeficiencí (anglicky: *Severe Combined Immunodeficiency*; SCID) s transplantovaným lidským fetálním brzlíkem nebo lymfatickou uzlinou. U takto modifikovaných SCID myši byly nalezeny lidské T i B lymfocyty cirkulující v periférii (McCune et al. 1988). Nelze však zcela marginalizovat námitky (etické, genetické, bezpečnostní atd.) proti takovým úpravám.

Dalšími savčími modely, které nalézají své uplatnění v onkologickém výzkumu jsou například potkan (*Rattus norvegicus*) (Dennison et al. 2015), králík (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) (Ioannidi et al. 2018; Bai et al. 2021) nebo prase (*Sus scrofa f. domestica*) (Bourneuf 2017; Horak et al. 2019; van der Weyden et al. 2020). Mimo savce lze použít i některé jiné živočišné druhy, které jsou však fyziologicky vzdálenější. V tomto kontextu je možno zmínit jako modelové organismy např. octomilku (*Drosophila melanogaster*) (Rudrapatna et al. 2012) nebo rybu dánío pruhované (*Danio rerio*) (Bootorabi et al. 2017).

V obecně společenském pohledu je používání zvířecích modelů k vědeckým účelům často vnímáno jako eticky problematické a v budoucnu je plánováno od testování na zvířatech upouštět a využívat ne-animální modely, jak proklamuje Evropská komise<sup>4</sup> a další zodpovědné instituce ve Spojených státech amerických<sup>5</sup> nebo Velké Británii<sup>6</sup>. Z těchto důvodů se zdá jako vhodný model – disponující již vysokou mírou komplexnosti a současně respektující panující etické koncepty – ptačí chorioalantoïdní membrána (anglicky: *Chorioallantoic membrane*; CAM). Model založený na užití kuřecího embrya

---

<sup>4</sup><https://www.europarl.europa.eu/news/en/agenda/briefing/2021-09-13/7/ending-the-use-of-animals-in-research-and-testing>

<sup>5</sup><https://www.science.org/content/article/us-epa-eliminate-all-mammal-testing-2035>;  
<https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-09/documents/image2019-09-09-231249.pdf>

<sup>6</sup>[https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/417441/Delivery\\_Report\\_2015.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/417441/Delivery_Report_2015.pdf)

je často považován za eticky přijatelný, jelikož etické komise považují kuřecí zárodek do 17. dne vývoje za bolest nepocítující organismus (Ribatti 2016).

CAM vzniká během ptačího vývoje spojením mezodermálních vrstev alantois a choria a představuje membránu se sítí krevních kapilár. Funkčně obstarává výměnu plynů přes póry skořápky a příjem živin z bílku či skořápky. Tento model je přirozeně vývojově imunopermisivní a umožňuje studovat např. tkáňové štěpy (Klingenberg et al. 2014), hojení ran (Ribatti et al. 1999), provádět toxikologické analýzy (Kue et al. 2014) nebo aplikovat molekuly stimulující či inhibující angiogenezi (Ribatti 2008; Ribatti 2016; Kennedy et al. 2021). Na CAM byl studován i růst různých typů nádorů (Avram et al. 2017; Schmitd et al. 2019; Sharrow et al. 2020; Pinto et al. 2021). Inokulace buněčné linie melanomu na CAM způsobila tvorbu primárních i sekundárních nádorových mas se silnou angiogenní reakcí už 3. den od aplikace (Avram et al. 2017). Obdobné výsledky jsme pozorovali i v rámci experimentů publikace (V) této disertační práce (Strnadová et al. 2020).

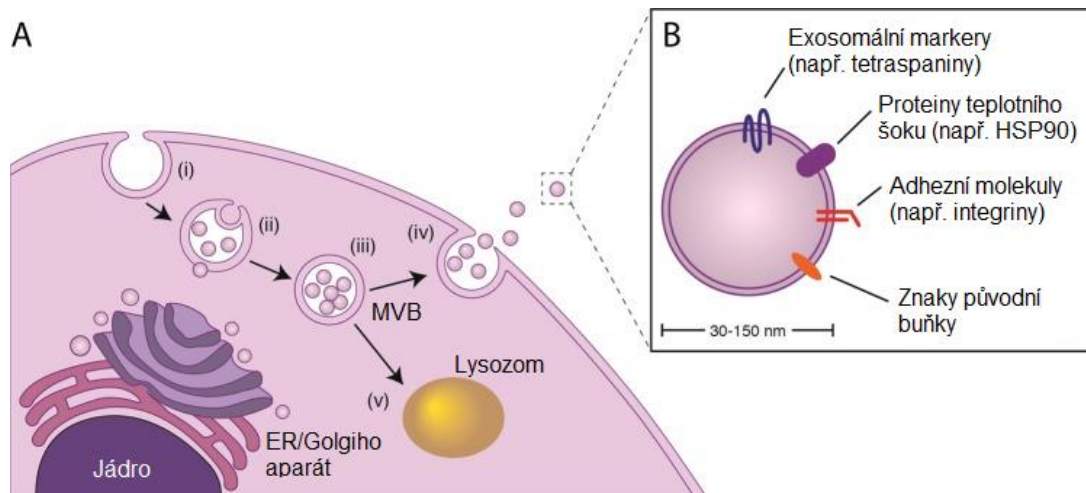
Dynamika změn chorioalantoidní membrány a vyvíjejícího se kuřete je precizně popsána klasickými morfologickými metodami a je detailně popsáno její fázování. Široce používán je koncept podle Hamburgera-Hamiltona, kteří v padesátých letech 20. století vytvořili soubor kreseb a fotografií zobrazujících 46 chronologických stádií vývoje kuřete od oplozeného vajíčka po plně vyvinuté kuře trvajícího 20–21 dní (Hamburger and Hamilton 1992). Koncept je možno ale dobře extrapolovat i na další ptáky, například kachnu (Li et al. 2019). Toto je velmi výhodné pro plánování časového rámce experimentů. Limitujícím faktorem pro tento model může být fyziologické trvání vývoje ptačího zárodka (Chu et al. 2022). Obtížnější na hodnocení může být i sledování vaskularizace a nádorového růstu na CAM, protože probíhá více směry a je obtížné žijící zárodek mechanicky stabilizovat bez omezení jeho vitality. I na tomto poli dochází k vývoji a rozvoji nových technologií. Velmi zajímavým technologickým zlepšením bylo zavedení ultrazvukového sledování skenerem *in ovo* (Eckrich et al. 2020), což obohatilo repertoár ultrazvukových metod. Již dříve bylo známo využití Dopplerovského principu s ultrazvukovým mikrovaskulárním zobrazením při studiu nádorové vaskularizace v ptačím embryu (Huang et al. 2019). Dále byly pro hodnocení modelů na CAM využity i metody jako magnetická rezonance (Kim et al. 2011) nebo výpočetní tomografie (CT) s použitím kontrastní látky při studiu morfogeneze ptačích embryí (Henning et al. 2011).

## 2.5 *Exosomy jako nástroj mezibuněčné komunikace u maligního melanomu*

Mezibuněčná komunikace je nezbytnou součástí fungování nádorového mikroprostředí. Tato komunikace byla dříve dichotomicky dělena na komunikaci na úrovni přímého kontaktu mezi buňkami anebo prostřednictvím chemických mediátorů na různou vzdálenost, tedy autokrinním, parakrinním či endokrinním způsobem. V posledních letech se kromě toho do popředí zájmu dostává i typ parakrinní mezibuněčné interakce zprostředkované nejrůznějšími extracelulárními váčky (vezikuly). Extracelulární vezikuly se dělí na několik typů. Při kategorizaci těchto tělísek se zohledňuje parametr jejich velikosti nebo původu.

Velikostně extracelulární vezikuly dělíme na apoptotická tělíska (50–5000 nm), mikrovezikuly (100–1000 nm) a nejmenší exosomy (30–150 nm). Apoptotická tělíska představují pozůstatky po apoptotickém rozpadu nepotřebných či jinak poškozených buněk v důsledku programované buněčné smrti. Mikrovezikuly, někdy též označované jako ektosomy, se uvolňují pučením z plazmatické membrány. Exosomy vznikají jako produkty aktivity endocytotické dráhy (Obr. 17) (Akers et al. 2013). Jejich sekreci do extracelulárního prostoru předchází vznik tzv. multivesikulárního tělíska (anglicky: *Multivesicular body*; MVB). To vzniká invaginací endosomální membrány do vlastního lumen endosomu, čímž dochází k tvorbě malých membránových intraluminálních váček. Obsahem intraluminálních váček jsou sekvestrované komponenty cytoplazmy původní buňky. Vzniklé MVB následně fúzuje s plazmatickou membránou, a buňka tak uvolňuje intraluminální váčky do mimobuněčného prostoru. Tento proces exocytózy je reflektován používanou nomenklaturou, kdy je zvykem, po dokončení exocytózy, intraluminální váčky nadále terminologicky označovat již jako exosomy (Van Niel et al. 2018). Kromě uvedené možnosti exocytózy může být alternativním osudem MVB jeho fúze s lysozomem a jeho následná degradace (Tancini et al. 2019).

Biogeneze exosomů je kontrolována různými molekulárními mechanismy, zpravidla závislými na tzv. komplexu endosomálního třídění potřebného pro transport (anglicky: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*; ESCRT) (Hurley 2010; Hurley and Hanson 2010). ESCRT je komplex proteinů, který napomáhá remodelovat membránu endosomu s cílem vytvořit intraluminální váčky s příslušným nákladem. Důležitou součástí exosomů jsou i membránové tetraspaniny, proteiny považované za charakteristické znaky exosomů a extracelulárních vezikul (Yáñez-Mó et al. 2015).



**Obr. 17 Biogeneze exosomů.** **A)** Exosomy vznikají na podkladě endocytotické dráhy. (i) Invaginace plazmatické membrány a vznik endosomu; (ii) Invaginace endosomální membrány se sekvestrovanými částmi cytoplazmy; (iii) Vznik multivesikulárního tělíska (MVB) s intraluminálními váčky; (iv) Fúze MVB s plazmatickou membránou a sekrece exosomů; (v) Degradace v lysozomu. **B)** Exosomy obsahují proteiny a jiné molekuly reflektující původní buňku. ER - endoplazmatické retikulum (převzato a upraveno dle de Couto, 2019).

Náklad exosomů (běžně je užíván anglický termín *cargo*) odráží fyziologický stav zdrojové buňky. Obecně se uvádí, že exosomy v sobě ukrývají části různých nukleových kyselin (DNA, RNA), různorodé proteiny a lipidy. Jako nosič informace se zdají velmi významné různé typy RNA, kromě klasických kódujících mRNA jsou to hlavně často zmiňované nekódující miRNA (Kalluri and LeBleu 2020). Mezi různými buňkami existují velmi podstatné rozdíly právě ve složení carga exosomů a tedy jeho analýza může dokonce poukazovat na původ či identitu zdroje. Dále je dokladováno, že exosomy v sobě střeďají i metabolity nebo poškozenou DNA, a zbavují tak parentální buňku odpadních látek pro udržení stálosti jejího vnitřního prostředí (Takahashi et al. 2017). Exosomy mohou cirkulovat a být detekovány v extracelulárních tekutinách, jako jsou krev, moč, sliny. *In vitro* jsou uvolňovány do kultivačních médií. Z těchto důvodů jsou exosomy považovány za další významné zprostředkovatele mezibuněčného kontaktu (Javeed and Mukhopadhyay 2017). Běžně užívanou metodou pro izolaci exosomů z tělních tekutin nebo kultivačních médií je ultracentrifugace s hustotním gradientem, též gradientová ultracentrifugace. Pro získání čistých frakcí izolovaných exosomů se využívá hustotního gradientu o různé koncentraci z roztoku sacharózy nebo iodixanolu, např. OptiPrep (Alere Technologies AS, Oslo, Norsko), který byl použit i v publikaci IX. Tato technika poskytuje dobrou výslednou kvalitu izolovaných exosomů (Duong et al. 2019).

Pro svůj potenciál významného komunikačního nástroje jsou exosomy v posledních letech inkorporovány i do schématu fungování nádorového mikroprostředí. Exosomy

byly primárně považovány za prostředek využívaný buňkami nádoru při regulaci nádorového mikroprostředí. Uvádí se, že nádorově asociované exosomy (anglicky: *Tumor-derived Exosomes*; TEX) se aktivně podílí na stimulaci angiogeneze, imunosuprese nebo vzniku metastáz za účelem progresu nádorového onemocnění (Whiteside 2016). Ne jinak je tomu u agresivního onemocnění kůže, maligního melanomu.

Bylo zjištěno, že exosomy z melanomových linií zvyšují aerobní glykolýzu a snižují oxidativní fosforylaci u lidských dermálních fibroblastů. To vede k extracelulární acidifikaci, která je známým fyzikálně-chemickým faktorem uplatňujícím se u nádorového mikroprostředí. Tento poznatek dobře odpovídá dlouho v onkologii studovanému Warburgově efektu (Pascale et al. 2020; Vaupel and Multhoff 2021). Zaměřením se na exosomy byla potvrzena důležitost jimi přenášených miRNA v cargu. Konkrétně se jednalo o miR-155 a miR-210, které hrály zásadní roli při výše zmíněných metabolických změnách (La Shu et al. 2018).

Exosomy z melanomu jsou schopny navodit transformaci fibroblastů v nádorově-asociované fibroblasty (Zhou et al. 2018; Hu and Hu 2019). U takto reprogramovaných fibroblastů byla exosomální miR-155 určena i jako spouštěč exprese proangiogenních faktorů v důsledku aktivace JAK2/STAT3 (*Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) signální dráhy, která podpořila produkci vaskulárního endotelového růstového faktoru A (anglicky: *Vascular Endothelial Growth Factor A*; VEGF-A), fibroblastového růstového faktoru 2 (anglicky: *Fibroblast Growth Factor 2*; FGF2) a MMP9 (Zhou et al. 2018).

S ohledem na mechanismus komunikace bylo významným zjištěním, že miR-21 byla horizontálním přenosem z buněk melanomu dopravena prostřednictvím exosomů a předána okolním fibroblastům, u kterých následně došlo k inhibici exprese TIMP3. Tím byla podpořena aktivita MMP účastnících se degradace ECM. To vysvětluje zvýšenou invazivitu fibroblastů a jejich putování v nádorovém mikroprostředí (Wang et al. 2020). Nádorově asociované fibroblasty často fungují jako navádějící buňky pro migraci nádorových maligních buněk.

Pro úspěšné zakládání metastáz je kromě invazivity buněk nádoru významná i jejich schopnost uchytit se ve vzdálených tkáních. Zdá se, že některé orgány umožňují tuto kolonizaci snadněji a spekuluje se o faktorech mikroprostředí, které pomáhají cirkulujícím nádorovým buňkám tuto kritickou etapu zvládnout. Předpokládá se, že rostoucí primární nádor může vykazovat systémový efekt, a ovlivňovat tak i vzdálené

tkáně a vytvářet tzv. pre-metastatická místa, tedy potenciální ložiska pro druhotné šíření nádoru při metastatické diseminaci. Kromě solubilních faktorů byla sledována i potenciální role exosomů. Metastatická diseminace byla podpořena exosomy z melanomu, ale i exosomy z progenitorových buněk kostní dřeně (Peinado et al. 2012).

Za důležitý znak invazivního chování nádorové buňky je považován i EMT. Tento děj je významný zejména u karcinomů, ale svou roli sehrává i u melanomu. Exosomy z melanomu dokázaly svým působením u primárních melanocytů snížit expresi E-cadherinu a naopak zvýšit expresi vimentinu. Vzhledem k tomu, že fenotyp melanocytů je odlišný od buněk karcinomů a že vimentin je jimi exprimován běžně, je podstatnější, že expozice exosomům dokázala významně zvýšit expresi klíčových regulátorů EMT – ZEB2 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2*) a Snail 2 (*Snail Family Transcriptional Repressor 2*) (Xiao et al. 2016). Podobný výsledek dokladovala i další recentní studie, což naznačuje, že TEX a jejich miRNA (např. let-7i, miR-106b-5p) jsou schopny měnit fenotyp melanocytů (Xiao et al. 2016; Luan et al. 2021). Cargo TEX tak může přispívat k progresi maligního melanomu.

Exosomální miRNA z melanomu chrání nádor i před agresivní imunitní reakcí, a to prostřednictvím snížení aktivity cytotoxických T lymfocytů. Toto je vysvětlováno poklesem jejich sekrece cytokinů a granzymu B (Vignard et al. 2020). Serinová proteáza granzym B totiž tvoří důležitou součást granul cytotoxických T lymfocytů a spouští kaspázami iniciovanou programovanou buněčnou smrt (Velotti et al. 2020).

V plazmě pacientů trpících generalizovaným maligním melanomem byly detekovány exosomy bohaté i na imunopresivně působící proteiny. Ty významně snížily proliferaci CD8+ T lymfocytů nebo přímo indukovaly jejich apoptózu. Exosomy potlačovaly i expresi NKG2D (*Killer Cell Lectin Receptor KI*) (Sharma et al. 2020), povrchového proteinu převážně na cytotoxických imunitních buňkách jako jsou CD8+ T lymfocyty nebo přirození zabíječi (anglicky: *Natural Killer cells*; NK) (Wensveen et al. 2018).

Role mikroprostředí je ale mnohem komplexnější. Většinou byl dosud studován regulační vliv TEX na buňky mikroprostředí. Ovšem mikroprostředí velmi silně determinuje také vlastnosti maligního tumoru. Bylo tak dokladováno několik miRNA, jejichž exprese je u samotných buněk maligního melanomu nepatrná, ale při vystavení vlivu mikroprostředí (např. v nepermissivním mikroprostředí) dojde u maligních buněk k omezení EMT, migrace a jejich invazivity (Liu et al. 2012; Rang et al. 2016). Tato změna

je regulována právě miRNA exogenního (tj. nemelanomového) původu z nádorového mikroprostředí.

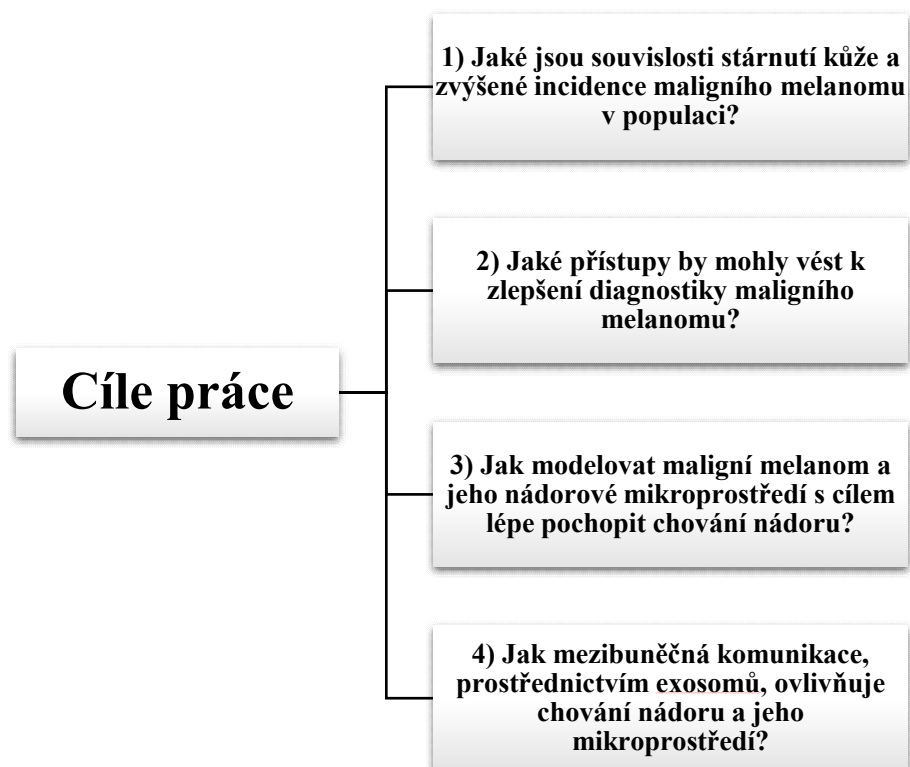
Exosomy nebo mechanismy jimi spouštěné, by tedy mohly být i klíčem k potenciálním novým terapeutickým přístupům, či by mohly příznivě modifikovat efektivitu terapeutických způsobů stávajících. Jak bylo uvedeno výše, imunoterapie představuje v současné době slibnou cestu v léčbě melanomu. Jedním z dominantně využívaných moderních terapeutických přístupů k léčbě melanomu je zacílení na PD-1/PD-L1. Právě zde ale exosomy sehrávají velmi pozoruhodnou roli. Exosomy z buněk melanomu nesou na svém povrchu ligand PD-L1, který se váže na receptor PD-1 vystavený na aktivovaných T lymfocytech. Tato vazba funkčně navozuje v mikroprostředí tumoru imunosupresi a buňky nádoru nejsou imunitním systémem eliminovány. Navíc bylo zjištěno, že IFN- $\gamma$ , který je za normálních okolností produkován CD8+ T lymfocyty, pozitivně stimuluje i obsah exosomálního PD-L1, čímž je paradoxně ale potlačena právě funkce CD8+ T lymfocytů a ve výsledku je pak podpořen i růst nádoru. Současně bylo u pacientů s maligním melanomem zjištěno, že hladina cirkulujícího exosomálního PD-L1 pozitivně koreluje s hladinou IFN- $\gamma$ , která však podléhá změnám v průběhu imunologické léčby anti-PD-1 (Chen et al. 2018a). Role exosomálního PD-L1 a současně IL-10 (*Interleukin-10*) při inhibici imunitní odpovědi CD8+ T lymfocytů byla potvrzena i v recentní studii (Shu et al. 2020). Potlačení této odpovědi je nezávislé na mutačním statutu genu *BRAF* u melanomových linií (Shu et al. 2020).

Lze tedy konstatovat, že buňky melanomu manipulují prostřednictvím exosomů s okolními buněčnými typy ve prospěch růstu a šíření nádoru. Potlačují odpověď imunitního systému, podporují novotvorbu cév pro dostatečné cévní zásobení nádoru nebo pro možnou invazi nádorových buněk (Kahlert and Kalluri 2013). Nepochybný je ale i vliv exosomů tvořených nemaligními populacemi nádorového mikroprostředí. Vědecké studie ohledně chování těchto malých extracelulárních vezikul tak dokladují jejich důležitost při mezibuněčné komunikaci v nádorovém mikroprostředí. Je zjevné, že zacílení exosomů a jejich carga by mohlo být potenciálně významným přístupem k léčbě širší skupiny pacientů.



### 3 Cíle práce

Ve své disertační práci jsem se zaměřila na tyto otázky:



## 4 Seznam publikovaných prací autorky se vztahem k tématu disertace

Součástí této disertační práce jsou níže uvedené chronologicky řazené publikace autorky (v textu jsou označeny římskou číslicí). Disertační práce sestává ze 6 originálních a 3 přehledových článků. Hodnota impakt faktoru (anglicky: *Impact Factor*; IF) daného časopisu je uvedena v závorce a vztahuje se k příslušnému roku, kdy byla publikace vydána. Výsledky disertační práce a komentáře k publikacím se nachází v kapitole 6. Součástí kapitoly je i citační ohlas jednotlivých článků. Kopie publikací jsou zařazeny na konec této disertační práce a jsou její nedílnou součástí.

- I. Jobe NP, Živicová V, Mířková A, Rösel D, Dvořánková B, Kodet O, Strnad H, Kolář M, Šedo A, Smetana K Jr, **Strnadová K**, Brábek J, Lacina L. Fibroblasts potentiate melanoma cells in vitro invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. *Histochem Cell Biol.* 2018 May;149(5):503-516. **(IF: 2.640)**
- II. **Strnadova K**, Sandera V, Dvorankova B, Kodet O, Duskova M, Smetana K, Lacina L. Skin aging: the dermal perspective. *Clin Dermatol.* 2019 Jul-Aug;37(4):326-335. **(IF: 2.458)**
- III. Kučera J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Lacina L, Krajsová I, Štork J, Kovářová H, Skalníková HK, Vodička P, Motlík J, Dundr P, Smetana K Jr, Kodet O. Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncol Rep.* 2019 Nov;42(5):1793-1804. **(IF: 3.417)**
- IV. Erzina M, Trelin A, Guselnikova O, Dvorankova B, **Strnadova K**, Perminova A, Ulbrich, P, Mares, D, Jerabek, V, Elashnikov, R, Svorcik, V, Lyutakov, O. Precise cancer detection via the combination of functionalized SERS surfaces and convolutional neural network with independent inputs. *Sensors and Actuators, B: Chemical.* 2020 Apr 1;308. 127660. **(IF: 7.335)**
- V. **Strnadová K**, Španko M, Dvořánková B, Lacina L, Kodet O, Shbat A, Klepáček I, Smetana K Jr. Melanoma xenotransplant on the chicken chorioallantoic membrane: a complex biological model for the study of

- cancer cell behaviour. *Histochem Cell Biol.* 2020 Aug;154(2):177-188. **(IF: 4.304)**
- VI. Kodet O, Kučera J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Štork J, Lacina L, Smetana K Jr. Cutaneous melanoma dissemination is dependent on the malignant cell properties and factors of intercellular crosstalk in the cancer microenvironment (Review). *Int J Oncol.* 2020 Sep;57(3):619-630. **(IF: 5.65)**
- VII. Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, Novotný J, Kolář M, Lacina L, Szabo P, **Strnadová K**, Rösel D, Dvořánková B, Smetana K Jr. Interleukin-6: Molecule in the Intersection of Cancer, Ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 26;21(21):7937. **(IF: 5.923)**
- VIII. Novotný J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Kocourková Š, Jakša R, Dundr P, Pačes V, Smetana K Jr, Kolář M, Lacina L. Single-Cell RNA Sequencing Unravels Heterogeneity of the Stromal Niche in Cutaneous Melanoma Heterogeneous Spheroids. *Cancers (Basel).* 2020 Nov 10;12(11):3324. **(IF: 6.639)**
- IX. **Strnadová K**, Pfeiferová L, Přikryl P, Dvořánková B, Vlčák E, Frýdlová J, Vokurka M, Novotný J, Šáchová J, Hradilová M, Brábek J, Šmigová J, Rösel D, Smetana K Jr., Kolář M, Lacina L. Exosomes produced by melanoma cells significantly influence the biological properties of normal and cancer-associated fibroblasts. *Histochem Cell Biol.* 2022;157(2):153–172. **(IF: 4.304)**

## 5 Materiál a metody

Veškerý biologický materiál byl pro řešení výzkumných prací získáván vždy s písemným informovaným souhlasem pacienta v souladu s etickými komisemi uvedených klinických pracovišť s plným respektem k Helsinské deklaraci z roku 1964. Biologický materiál, využitý v rámci této disertační práce, byl odebírán převážně na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN, Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole nebo Klinice plastické chirurgie FNKV.

V laboratořích Anatomického ústavu 1. LF UK byl biologický materiál následně zpracován pro histologickou analýzu, nebo byl využit jako zdroj pro kultivaci buněk a následné *in vitro* experimenty. Jednalo se hlavně o izolaci dermálních fibroblastů ze zdravých kontrolních tkání, nádorově-asociovaných fibroblastů z primárních nádorů či metastáz melanomu nebo buněk maligního melanomu z punktátů, např. z maligního ascitu pacienta. Keratinocyty byly izolovány z dodávané kůže a standardně kultivovány feederovou technikou na mitomycinem C ošetřených 3T3 myších fibroblastech (Rheinwald and Green 1975). Kromě toho byly v experimentech využívány i komerčně dostupné linie maligního melanomu (A2058, G-361). Melanomová linie BLM byla poskytnuta L. van Kempenem a J.H.J.M. van Kriekenem (Univerzita svatého Radbouda, Nijmegen, Nizozemské království). Kontrolou k buňkám maligního melanomu byly vysoce pigmentované melanocyty poskytnuté J. Vachtenheimem (Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK, Česká republika). Xenotransplantace buněk byly prováděny na embryích masných hybridů Ross 308 kura domácího (*Gallus gallus domestica*; Xaverov, Česká republika). Chorioalantoidní membrány kuřecích embryí byly využity i jako zdroj pro izolaci fibroblastů. Kontrolou byly fibroblasty izolované z kůže dospělých slepic.

Specifikace použitého materiálu a detailní popis metod a statistického hodnocení jsou uvedeny v jednotlivých článcích autorky, které jsou nedílnou součástí této disertační práce, proto nebudou v této kapitole blíže popsány.

Je však nutné zmínit, že některé metody uvedené v publikacích by nebylo možné provést bez spolupráce s jinými institucemi a jejich specializovanými pracovišti. Genomové metody a bioinformatická analýza (publikace I, VIII, IX) byly provedeny na Oddělení genomiky a bioinformatiky na Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky. Proteomické metody (např. Luminex xMAP<sup>®</sup> kuličková assay

v publikaci III) byly realizovány v Laboratoři aplikovaných proteomových analýz a výzkumného centra Pigmod na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky. Metoda gradientové ultracentrifugace pro izolaci exosomů (publikace IX) byla prováděna v Laboratoři nefrologické proteomiky a extracelulárních vezikul na Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Metody uvedené v publikaci IV (kromě přípravy biologického materiálu) byly provedeny na Ústavu inženýrství pevných látek VŠCHT v Praze a Katedře mikroelektroniky Fakulty elektrotechnické ČVUT v Praze. Intenzivní spolupráce (publikace I, VII, IX) probíhala také s Laboratoří invazivity nádorových buněk v BIOCEVu (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy).

## 6 Výsledky a diskuse publikovaných prací s citačním ohlasem

### 6.1 Tematický okruh: Stárnutí kůže a jeho vztah ke zvýšené incidenci melanomu

Autorská publikace II: **Strnadova K**, Sandera V, Dvorankova B, Kodet O, Duskova M, Smetana K, Lacina L. Skin aging: the dermal perspective. *Clin Dermatol*. 2019 Jul-Aug;37(4):326-335. (IF: 2.458)

**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 8**

Autorská publikace VII: Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, Novotný J, Kolář M, Lacina L, Szabo P, **Strnadová K**, Rösel D, Dvořánková B, Smetana K Jr. Interleukin-6: Molecule in the Intersection of Cancer, Ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 26;21(21):7937. (IF: 5.923)

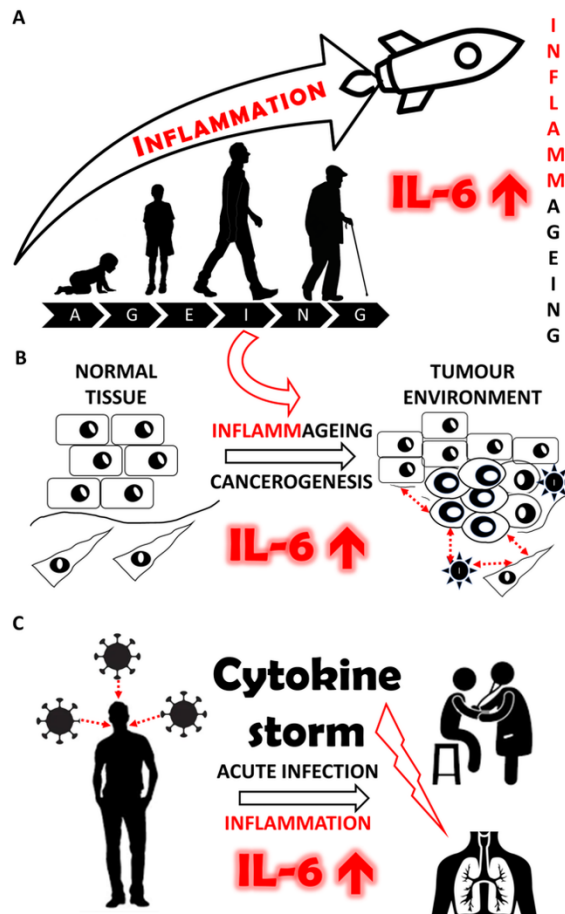
**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 14**

Oba uvedené přehledové články II a VII detailně prezentují známá data shrnutá v kapitole 2.1. Kůže, struktura a vývoj v literárním přehledu předkládané disertační práce.

Přehledový článek II se tematicky věnuje v širším pohledu známým faktorům stárnutí kůže a jejich podílu na zvýšení incidence nádorových onemocnění jako maligní melanom, bazocelulární nebo spinocelulární karcinom u stárnoucí populace. Klinicky výrazným rysem je alterace struktury epidermis a dermis v průběhu stárnutí, což může vést i k chronické kožní fragilitě stárnoucí kůže zvané dermatoporóza. Při narušení struktury kůže exogenními a endogenními vlivy sehrává důležitou roli mimo jiné populace dermálních fibroblastů, která se mění také funkčně, tedy zejména změnou skladby svého sekretu. V případě nádorové transformace pak spoluvytváří příhodné prostředí pro nádorový růst a invazi, toto umožňuje např. sekreci prozánětlivých molekul. Publikace VII se soustředí na jednu z těchto prozánětlivých molekul v průběhu fyziologického stárnutí a s ním souvisejících patologií, na IL-6 (Obr. 18).

V přehledovém článku VII jsou shrnuty poznatky o fyziologické funkci IL-6, jeho signální dráze a její regulaci. IL-6 se ale uplatňuje i při stárnutí či patologických situacích, jako jsou chronické zánětlivé choroby a nádorová onemocnění. Recentní pandemie onemocnění COVID-19 rovněž postavila IL-6 do popředí výzkumného zájmu a lze

diskutovat o možnostech jeho terapeutického cílení, jak přímého, tak pomocí protilátek, např. bazedoxifenu nebo raloxifenu, které cílí na receptor pro IL-6. IL-6, důležitá molekula nádorového mikroprostředí, proto představuje cíl při léčbě různých onemocněních.



**Obr. 18 Interleukin-6.** IL-6 je cytokin s různorodými účinky, jehož zvýšená hladina souvisí se stárnutím a nastavením chronického zánětlivého prostředí u starších osob (A), které je vhodným prostředím pro vznik nádorů. Tento cytokin dále uplatňuje svou roli při komunikaci mezi rakovinnými buňkami a dalšími buněčnými sousedy v rámci nádorového mikroprostředí (B) a v neposlední řadě je základním faktorem cytokinové bouře u pacientů s akutní infekcí, např. s onemocněním COVID-19 (C). Tento grafický abstrakt je součástí publikace VII od Brábek et al. (2020).

I když stárnutí není možno vnímat jako nemoc, je senium obdobím, kdy narůstá deregulace biologických procesů v organismu, což následně usnadňuje nástup mnohých chorob. Jedním z významných faktorů tohoto životního období je i nástup chronického prozánětlivého stavu v těle, který podporuje mimo jiné i potenciální rozvoj malignit. Vzhledem k narůstajícímu počtu lidí seniorského věku v populaci tak dochází k nárůstu případů diagnostikovaného nádorového onemocnění, včetně maligního melanomu.

## 6.2 Tematický okruh: Zlepšení časné detekce maligního melanomu

Autorská publikace III: Kučera J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Lacina L, Krajsová I, Štork J, Kovářová H, Skalníková HK, Vodička P, Motlík J, Dundr P, Smetana K Jr, Kodet O. Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncol Rep.* 2019 Nov;42(5):1793-1804. (IF: 3.417)

**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 3**

Kožní melanom v pokročilém stádiu nadále představuje onemocnění s omezenými terapeutickými možnostmi a relativně špatnými léčebnými výsledky. V posledních letech došlo k výraznému pokroku především v imunoterapii melanomu (kapitola 2.3.4.2), ale je i nadále obtížné predikovat terapeutickou odpověď. Z toho důvodu je snahou hledat a identifikovat molekuly, biomarkery, které by zlepšily, usnadnily, či zpřesnily diagnostiku a umožnily selekci ohroženého pacienta, nebo pomohly zvolit optimální terapii a případně byly i prognostickými faktory. Tato pilotní studie je srovnávací analýzou 31 sérových proteinů, jako jsou cytokiny, chemokiny a růstové faktory, provedenou na pacientech trpících maligním melanomem a na zdravých kontrolách.

Sérologická analýza ukázala, že přítomnost primárního nádoru je spojena se sníženými hladinami IL-2, IL-13 (*Interleukin-13*), RANTES (*C-C Motif Chemokine Ligand 5*) a zvýšenými hladinami IL1RA (*Interleukin 1 Receptor Antagonist*), MIP-1 $\beta$  (*C-C Motif Chemokine Ligand 4*) a epidermálního růstového faktoru (anglicky: *Epidermal Growth Factor*; EGF).

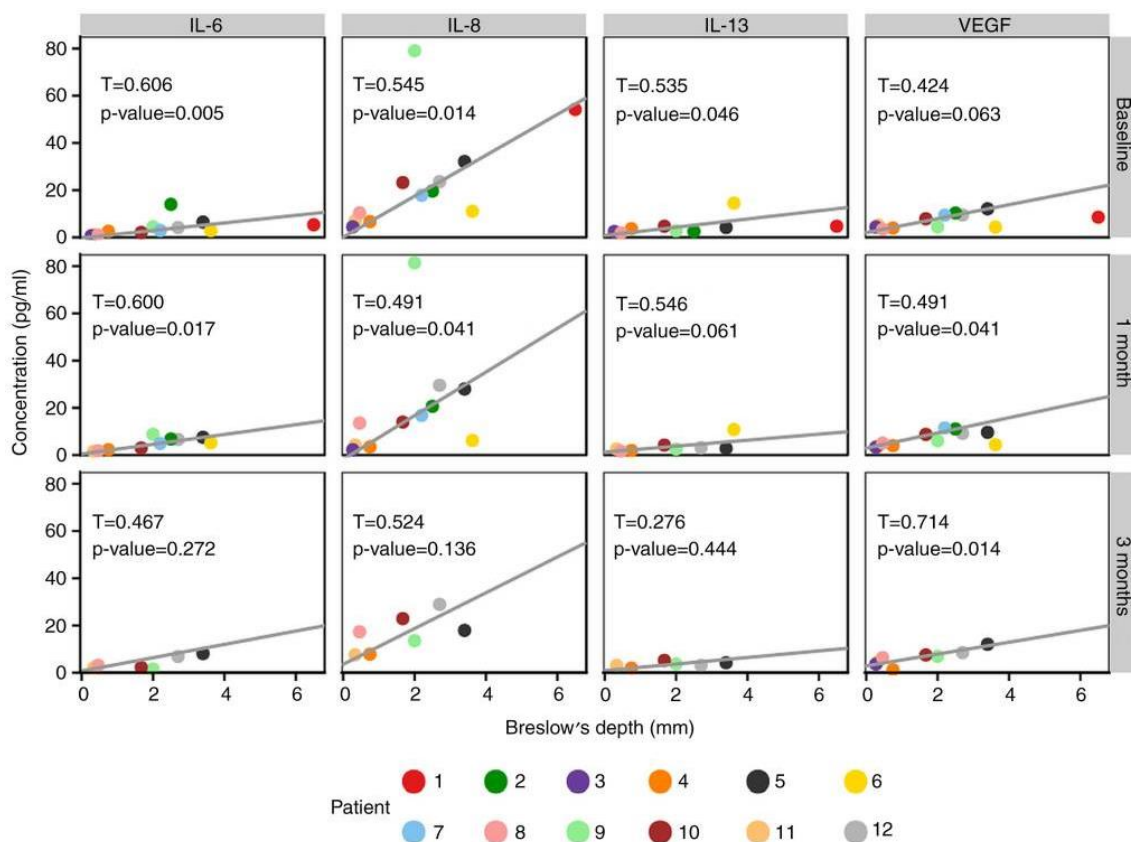
IL-2 aktivuje NK buňky i T lymfocyty a jako imunoterapeutický lék byl jeden z prvních použit v léčbě maligního melanomu (Rosenberg et al. 1998). Uvádí se, že snížená exprese tohoto interleukinu přispívá k nedostatečné indukci specifity cytotoxických T lymfocytů proti nádoru. Dalším důvodem se zdá být preferenční vazba IL-2 na receptory regulačních T lymfocytů (Sun et al. 2019). IL-13 je protizánětlivým cytokinem produkovaným CD4<sup>+</sup> T lymfocyty nebo makrofágy a žírnými buňkami (Wynn 2003). U prozánětlivého chemokinu RANTES bylo zjištěno, že je jedním z chemokinů důležitým pro přilákání aktivovaných CD8<sup>+</sup> T lymfocytů k metastázám melanomu (Harlin et al. 2009).

Další prozánětlivý chemokin MIP-1 $\beta$  přitahuje monocyty do lokálního mikroprostředí nádoru, které tvoří důležitou komponentu stromatu regulující nádorový



růst (Nath et al. 2006). Vyšší sérové hladiny MIP-1 $\beta$  a IL1RA u pacientů s melanomem korespondují s výsledky i z jiných studií (Paganelli et al. 2019; Wang et al. 2021). Zvýšení EGF v séru může pozitivně ovlivnit růst nádoru a podporovat vznik mikrometastáz v lymfatických uzlinách (Bracher et al. 2013). Tato data naznačují imunologickou deregulaci u pacientů s melanomem, která se odráží ve změnách sérové hladiny faktorů nezbytných pro stimulaci a inhibici růstu rakoviny.

Analýza séra dále ukázala, že hodnoty Breslowovy klasifikace naměřené v primárních nádorech pozitivně korelovaly se sérovými hladinami IL-6, CXCL8 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 8*; též IL-8), IL-13, VEGF-A (Obr. 19).



**Obr. 19 Korelace hodnot Breslowa se sérovými hladinami vybraných proteinů.** Analýza séra, ve třech časech odběru (před excízi primárního nádoru, měsíc nebo tři měsíce po excízi), ukázala zvyšující se naměřenou hladinu vybraných proteinů IL-6, IL-8, IL-13 a VEGF, čím vyšší byla hodnota Breslowa u primárního nádoru daného pacienta. Převzato a upraveno z publikace III od Kučera et al. (2019).

Vedle sérologické analýzy byla provedena imunohistochemická analýza primárních nádorů pacientů. Imunohistochemická analýza naznačuje značnou heterogenitu, ale lze souhrnně říci, že hepatocytární růstový faktor (anglicky: *Hepatocyte Growth Factor*; HGF), receptor 1 pro vaskulární endotelový růstový faktor (anglicky: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*; VEGFR1), IL-6 a jeho receptor nebo receptor

pro IL-8, zvaný CXCR1 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 1*), jsou široce v nádorech exprimovány.

V této pilotní studii byla prokázána přítomnost širokého spektra zánětlivých molekul v séru pacientů. Současně však tato studie odhalila obrovský rozsah interindividuálních rozdílů mezi testovanými pacienty a také intraindividuální kolísání hodnot. Z výsledků je patrné, že výskyt některých faktorů koreluje s nepříznivými hodnotami Breslowovy klasifikace. Zvýšená hladina VEGFA pozorovaná v séru pacientů naznačuje, jak vitálně nádor potřebuje bohaté cévní zásobení. Imunohistochemická analýza byla provedena u primárních melanomů a také u několika melanomových buněčných linií a fibroblastů asociovaných s melanomem a výsledná data korelují s výsledky ze sérologické analýzy.

V současnosti používané markery, jako LDH a S100 proteiny, mají „stagingový“ a prognostický význam, ale neodrážejí přesné chování organismu v době diagnózy nebo v průběhu progresu melanomu, takže strategie založená na kombinaci několika biomarkerů by mohla být v budoucnu přínosná a mohla by přispět k efektivnější detekci či terapii.

Autorská publikace IV: Erzina M, Trelin A, Guselnikova O, Dvorankova B, **Strnadova K**, Perminova A, Ulbrich, P, Mares, D, Jerabek, V, Elashnikov, R, Svorcik, V, Lyutakov, O. Precise cancer detection via the combination of functionalized SERS surfaces and convolutional neural network with independent inputs. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2020 Apr 1;308. 127660. (IF: 7.335)

**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 22**

V této publikaci jsou prezentovány pokročilé technologické přístupy a je diskutován jejich potenciál k implementaci do laboratorní medicínské diagnostiky. Blíže jsme se zaměřili na možnou detekci změn ve složení kultivačního média vyplývajících z metabolické a sekreční aktivity nádorových a nenádorových buněk. Tento přístup kombinuje několik metod z oblasti nanotechnologie, povrchové chemie, plazmoniky a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (anglicky: *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*; SERS) a jejich spojení s metodami umělé inteligence (tzv. konvolučních neuronových sítí). Hlavním cílem této pilotní práce bylo testovat užitnou hodnotu těchto technologií při analýze komplexních biologických vzorků, které by mohly imitovat diagnostické vzorky získané od pacientů.

V experimentech byla použita, jako komplexní biologické směsi, kultivační média získaná z kultur buněk melanomu, nádorově asociovaných fibroblastů, ale i normálních buněk. Iniciálně metoda SERS umožnila charakterizaci molekulárních rozdílů jednotlivých kondiciovaných kultivačních médií od nádorových i nenádorových buněk. Pro každý použitý druh kondiciovaného média byla sestavena spektra specifická a zároveň dostatečně senzitivně indikující změny související s výskytem nádoru. V dalším kroku pak byly testovány neznámé vzorky obdobného typu. Lze konstatovat, že i ve fázi randomizovaného experimentu došlo ve 100 % případů k přesné identifikaci vzorku.

Tato studie demonstruje potenciál SERS a umělé inteligence konvolučních neuronových sítí pro budoucí klinické využití. Lze vyvozovat, že tato metodika by mohla být klíčem k rychlé detekci nádorů či monitoringu maligního onemocnění. Biologicky je ale nutno uvážit, že nádorové onemocnění je u každého pacienta do značné míry velmi individuální, a navíc se mění v čase vzhledem k tendenci mutovat v průběhu času. Přes úspěch dosažený v tomto experimentu nelze zaručit absolutní spolehlivost této metody a její užitnou hodnotu v klinické praxi. K etablování této metody na poli diagnostiky bude ještě nutno zvýšit počet různorodých vzorků pro ověření senzitivity a specifity tohoto postupu, a bude tedy i nadále potřeba rozsáhlé interdisciplinární spolupráce.

### 6.3 *Tematický okruh: Modelování nádorového mikroprostředí*

Autorská publikace I: Jobe NP, Živicová V, Mířková A, Rösel D, Dvořánková B, Kodet O, Strnad H, Kolář M, Šedo A, Smetana K Jr, **Strnadová K**, Brábek J, Lacina L. Fibroblasts potentiate melanoma cells in vitro invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. *Histochem Cell Biol.* 2018 May;149(5):503-516. (IF: 2.640)

**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 11**

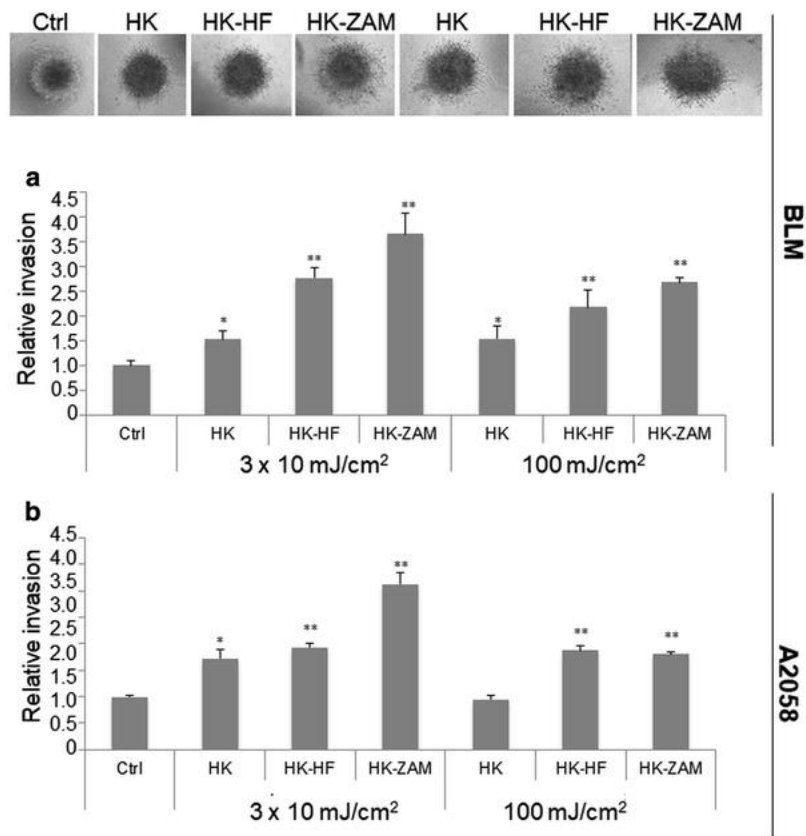
Jedním z největších rizikových faktorů pro vznik maligního melanomu je UV záření, jak bylo také popsáno v kapitole 2.3.1. V této publikaci je testován vliv UV radiace na normální keratinocyty a jejich následná interakce s normálními a nádorově-asociovanými fibroblasty z melanomu od různých donorů.

Expresní profily těchto fibroblastů ukázaly, že obecně se normální a nádorově-asociované fibroblasty z melanomu významně liší řádově ve stovkách genů (průměrně ve 402 genech). Současně je třeba upozornit na velmi významnou interindividuální variabilitu této deregulace mezi jednotlivými donory. U všech nádorově-asociovaných

fibroblastů byla ale pozorována zvýšená exprese genů pro cytokin IL-6 a chemokiny CXCL8 a CXCL1 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 1*), tedy proteiny podporující invazní potenciál buněk nádoru. Imunocytochemická analýza prokázala, že všechny tyto nádorově asociované fibroblasty vykazovaly expresi běžných intermediárních filament (např. vimentinu, typického znaku pro mezenchymální buňky). Velmi variabilně ale tyto stromální fibroblasty na úrovni proteinu exprimovaly  $\alpha$ -hladkosvalový aktin (anglicky:  *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*;  $\alpha$ SMA), který je typickým znakem pro nádorově-asociované fibroblasty. Jako teoretické východisko pro náš experiment jsme zvolili interakci epitelových buněk poškozených ultrafialovými paprsky s normálním či aktinicky změněným modelem dermis. Keratinocyty byly pro tyto účely ozářeny UVB, a to buď mírnějším frakcionovaným ozařováním simulujícím chronickou intermitentní expozici ( $3 \times 10 \text{ mJ/cm}^2$ ) nebo subletální dávkou simulující akutní zátěž ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ).

Nádorové mikroprostředí bylo v této publikaci modelováno pomocí insertového systému UVB-ozářených keratinocytů a neozářených fibroblastů. Bioaktivní látky produkované do kultivačního média v důsledku této kokultivace vytvořily kondicionované médium, které obsahovalo mediátory reakce na proběhlé poškození. U modelů časných maligních melanomů musí být brána v potaz nejen dermální komponenta stromatu, ale poněkud atypicky je třeba vzít v úvahu i keratinocyty, které jsou v přímém sousedství maligních či malignizujících buněk melanocytárního původu. Takto kondicionované komplexní médium bylo následně použito k ovlivnění dvou buněčných linií maligního melanomu (A2058 a BLM) zalitých v podobě sféroidů do kolagenového gelu.

Výsledky ukázaly, že bioaktivní látky z kokultury UVB-ozářených keratinocytů a nádorově asociovaných fibroblastů z melanomu signifikantně podporují invazi melanomových linií. Méně výrazný účinek na invazi měla kokultivace s normálními dermálními fibroblasty nebo tehdy, kdy byly ke kondicionování média užity jen ozářené keratinocyty samotné. Obecně lze shrnout, že vysoká dávka UVB záření u keratinocytů způsobila následné zpomalení invaze buněk melanomu oproti frakcionovanému ozařování nižší dávkou (Obr. 20). Tento výsledek do značné míry dobře ilustruje význam intermitentní expozice UV paprskům známé z klinické onkologie.



**Obr. 20 Invaze buněk melanomových linií BLM a A2058.** Bioaktivní látky kondicionovaných médií z kokultury UV-ozářených keratinocytů (HK) a nádorově-asociovaných fibroblastů (ZAM) nejvýrazněji podporují invazi buněk melanomu. Mírnější frakcionované ozařování HK ( $3 \times 10 \text{ mJ/cm}^2$ ) je pro invazi buněk melanomu více účinné než jednorázová subletální dávka ozáření HK ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ). Převzato a upraveno z publikace I od Jobe et al. (2018).

Opakované ozáření nízkými dávkami UVB v této publikaci připomíná opakované vystavení nechráněné pokožky slunci. Životaschopnost keratinocytů je zachována, ale i tato nízká dávka působí DNA poškození. Fibroblasty v dermis kůže komunikují s takto poškozenými keratinocyty parakrinní produkcí bioaktivních látek a z výsledků je patrné, že v případě výskytu ložiska melanomu podporují jeho schopnost invadovat.

Autorská publikace V: **Strnadová K**, Španko M, Dvořánková B, Lacina L, Kodet O, Shbat A, Klepáček I, Smetana K Jr. Melanoma xenotransplant on the chicken chorioallantoic membrane: a complex biological model for the study of cancer cell behaviour. *Histochem Cell Biol.* 2020 Aug;154(2):177-188. (IF: 3.57)

**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 2**

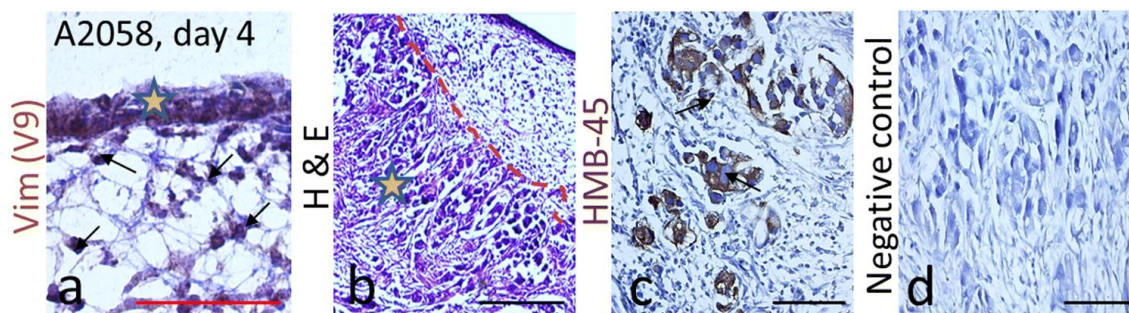
Kuřecí chorioalantoidní membrána je ptáčím homologem savčí placenty. Pro plnění své role při vývoji embrya je nutně vysoce vaskularizovanou tkání (blíže kapitola 2.4.4), což ji predisponuje k provádění některých typů biologických experimentů. Tato

publikace se zaměřuje na xenotransplantaci melanomových buněk na kuřecí CAM, jakožto komplexnější biologický model pro studium chování nádorových buněk.

V *in vitro* experimentech byly izolovány fibroblasty z CAM nebo kůže dospělých jedinců kura domácího a po jejich kultivaci bylo odebráno kondicionované médium. Následně byly studovány účinky těchto médií na růst a metabolismus buněk melanomových linií. Výsledky ukázaly, že bioaktivní látky produkované fibroblasty do média významně změnily kinetiku proliferace 3 sledovaných melanomových buněčných linií oproti kontrolnímu médiu. Toto pozorování zdůrazňuje závislost nádoru na jeho komunikaci s okolními buňkami mikroprostředí. Metabolická aktivita těchto buněk pak byla měřena a porovnána MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) testem. Před experimenty *in ovo* byla také provedena imunocytochemická analýza zaměřující se na možnosti spolehlivé detekce lidských melanomových buněk v kuřecí tkáni. Klíčem k řešení této otázky byla literárně udávaná a námi ověřená aplikace protilátky proti vimentinu, klon V9 (DAKO, Glostrup, Dánsko). Toto barvení bylo negativní u všech fibroblastů ptačího původu, ale spolehlivě značilo buňky obsahující vimentin lidského původu včetně buněk melanomu. Tento test se jevil jako spolehlivější než aplikace některých jiných melanomových markerů např. HMB-45 (Pmel17), který může být ovlivněn i kultivačními podmínkami.

Po xenotransplantaci melanomových buněk *in ovo* byly mikroskopicky pozorovány shluky těchto buněk na povrchu CAM. V pozdějších fázích experimentu, tj. po 6 dnech, byly tyto shluky viditelné i pouhým okem. Injekce modré pryskyřice (Mercox II Blue, Mercox-Japan Vilene, Tokyo, Japonsko) do cév embrya umožnila lepší optickou vizualizaci průběhu cév a vytváření vaskulárních struktur směřujících k shluku melanomových buněk. Dále bylo patrné, že cévy pouze masu buněk překrývaly, ale nepenetrovaly do ní.

Invaze nádorových buněk do stromatu CAM byla vzácná a histologicky byla potvrzena pouze u dvou vzorků ze 45. V těchto případech barvení vimentinem odhalilo rozptýlení melanomových buněk na povrchu CAM a také uvnitř stromatu. Jejich identita byla dále potvrzena barvením HMB-45 (Obr. 21).



**Obr. 21** Řez kuřecí chorioalantoidní membránou. Buňky melanomové linie A2058, značené vimentinem, jsou lokalizovány na povrchu CAM (hvězdička) s občasným výskytem ve stromatu CAM (šípky) (a). Pouze v jednom případě byla pozorována solidní masa melanomu ve stromatu (hvězdička) (b), tyto buňky byly barveny pozitivně na HMB-45 (c). Měřítka: 100, popř. 300  $\mu\text{m}$ . Převzato a upraveno z publikace V od Strnadová et al. (2020).

Je zřejmé, že bioaktivní látky produkované fibroblasty do média stimulují proliferaci nádorových buněk, i když je jejich původ odlišný. *In ovo* tvoří transplantované buňky melanomu shluky na CAM, které následně stimulují dostředivý růst cév do místa přihojení. Vzhledem k těmto vlastnostem je CAM tradičně používána jako vhodný nástroj pro studium vaskularizace a angiogeneze (Ribatti 2008; Nowak-Sliwinska et al. 2014; Burggren and Antich 2020). Omezení invazního potenciálu melanomových buněk může být způsobeno časovou restrikcí experimentu vynucenou rychlostí vývoje embrya kuřete nebo nepermissivními biologickými vlastnostmi CAM. I přes tyto limitace CAM kuřecího embrya nabízí v některých aspektech i nadále atraktivní *in vivo* biologický model pro studium chování melanomových buněk.

Autorská publikace VIII: Novotný J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Kocourková Š, Jakša R, Dundr P, Pačes V, Smetana K Jr, Kolář M, Lacina L. Single-Cell RNA Sequencing Unravels Heterogeneity of the Stromal Niche in Cutaneous Melanoma Heterogeneous Spheroids. *Cancers* (Basel). 2020 Nov 10;12(11):3324. **(IF: 6.639)**

**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 5**

Tento původní článek VIII je zaměřen na hodnocení funkční diverzity fibroblastů při interakcích s buňkami melanomu, a to na 3D modelu s využitím moderní metody single-cell RNA sekvenování.

Pro modelování diverzity dermálního mikroprostředí byly využity dva zdroje dermálních fibroblastů. Jednalo se o juvenilní fibroblasty z neozářené části kůže dítěte (anglicky: *Juvenile Dermal Fibroblasts*; JDF) a fibroblasty z fotoexponované kůže seniorního dárce (anglicky: *Photo-damaged Dermal Fibroblasts*; PDF). Heterogenní

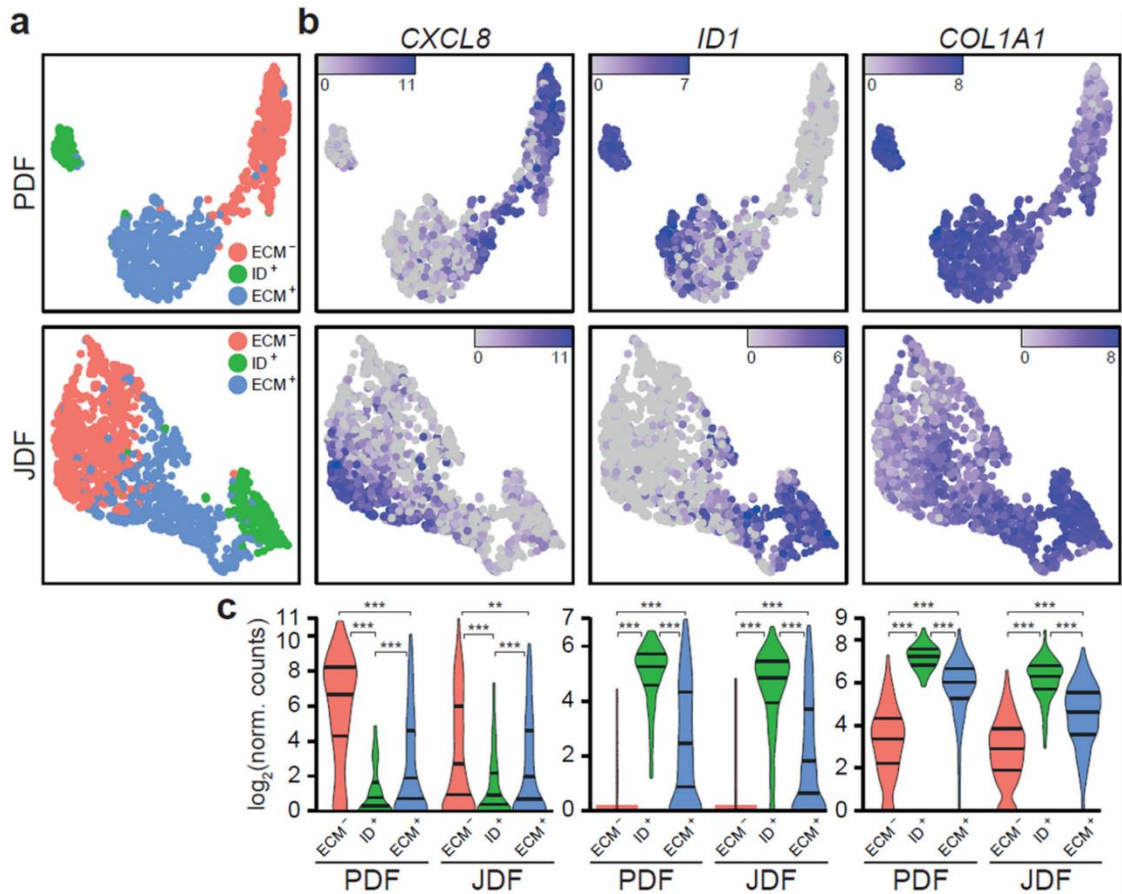
sféroidy složené z buněk melanomu a z daného typu fibroblastů (v poměru 1:1) utvořené metodou visící kapky představovaly pak 3D model simulující ekosystém nádoru. Klíčovou metodou, která měla rozlišit chování různě aktinicky poškozených fibroblastů při vytváření mikroprostředí melanomu, byla single-cell RNA analýza.

3D model heterogenních sféroidů s typickou morfologií byl vytvářen metodou visící kapky (Obr. 15) a ačkoli k inokulaci byla použita směs obou buněčných typů, byla pozorována v rámci sféroidu prostorová segregace. Imunohistologické barvení řezů těchto sféroidů pak umožnilo vizualizovat zajímavou distribuci obou typů buněk. Fibroblasty detekované specifickou protilátkou TE-7 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), se nacházely ve středu sféroidu, zatímco buňky melanomu značené protilátkami proti specifickým znakům melanocytů (HMB-45, S100 – obé DAKO, Glostrup, Dánsko) byly lokalizovány spíše na periferii.

Po disociaci sféroidů na suspenzi jednotlivých buněk byl model analyzován pomocí single-cell RNA sekvenování. Tento přístup ve spojení s biostatistickým přístupem umožnil od sebe rozdělit nejen dvě zdrojové populace, ale dále charakterizovat jejich případně vzniklou heterogenitu. Fibroblasty byly identifikovány podle exprese specifických genů, například genu pro fibroblastový aktivační protein (anglicky: *Fibroblast Activation Protein*; FAP). Naopak buňky melanomu byly od populace fibroblastů odlišeny genem pro Melan-A, který hraje roli při biogenezi melanosomů, a je tak typickým znakem melanocytů. Exprese těchto znaků byla potvrzena i na úrovni proteinu na histologických řezech.

Bioinformatická analýza primárních dermálních fibroblastů ze sféroidů ukázala, že oba typy fibroblastů lze shodně funkčně rozdělit do tří klastrů na základě jejich expresního profilu (Obr. 22). První skupina, označovaná jako ECM-, byla bohatá na expresi genů pro prozánětlivé faktory, jako jsou cytokiny a chemokiny. Zároveň postrádala přeepsané geny zodpovědné za produkci extracelulární matrix. Druhá skupina ID+ obsahovala transkripty genů zodpovědných za diferenciací a dediferenciací procesy, které se objevují v signální kaskádě superrodiny TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ). Příkladem je gen ID1 (*Inhibitor of Differentiation 1*). Třetí skupina ECM+ představuje klasický náhled na fibroblasty jakožto producenty složek mezibuněčné hmoty. Tato skupina hojně transkribovala geny pro extracelulární matrix např. kolagen 1. Rozdělení na tři funkčně odlišné skupiny bylo zřetelnější u PDF, tedy fotoexponovaných fibroblastů ze staršího pacienta.





**Obr. 22 Bioinformatická analýza JDF a PDF z heterogenních sféroidů.** (a) Oba typy fibroblastů se v blízkosti buněk melanomu ve sféroidu rozčlenily na 3 fenotypově odlišné shluky na základě jejich genové exprese. (b) Skupina fibroblastů ECM<sup>-</sup> výrazně exprimuje prozánětlivé cytokiny a chemokiny, např. *CXCL8*. Buňky skupiny ID<sup>+</sup> jsou identifikovány silnou expresí genů zodpovědných za diferenační a dediferenační procesy, např. *ID1*. ECM<sup>+</sup> je třetí skupinou fibroblastů hojně exprimujících transkripty genů ECM. (c) Klastery jsou v JDF i PDF ekvivalentní a vykazují statisticky významné rozdíly v expresi jejich markerových genů (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , Mann-Whitney U test). Převzato a upraveno z publikace VIII od Novotný et al. (2020).

Na podkladě biologické databáze KEGG (popisující vztahy mezi geny, potažmo jimi kódovanými proteiny, a propojující je funkčně do sítí) byly pozorovány významné rozdíly mezi klastery fibroblastové populace. Při srovnání skupiny ECM<sup>-</sup> vůči ID<sup>+</sup> byla u obou typů fibroblastů odhalena snížená exprese genů asociovaných s fokální adhezí, dále s interakcí receptorů a extracelulární matrix a s TGFβ signální dráhou. Specifické změny pro PDF ukazovaly zvýšenou expresi genů spjatých s interakcí cytokinů a jejich receptorů nebo se signálními drahami Nod-like a Toll-like receptorů. Ty jsou součástí vrozené imunitní odpovědi vedoucí k produkci cytokinů a chemokinů, např. IL-6, IL-1α, LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) nebo CXCL8 (Kawai and Akira 2011; Wicherska-pawłowska et al. 2021). Ustanovení chronického zánětlivého prostředí je jedním z hlavních aktivátorů nádorového růstu, čemuž podle těchto výsledků napomáhají hlavně

stárnoucí buňky stromatu. Zároveň byla u PDF detekována snížená exprese genů pro oxidativní fosforylaci, což bývá u buněk nádoru běžným jevem jdoucím ruku v ruce s aktivnější glykolýzou.

Při srovnání klastrů ECM- vůči ECM+ byla u obou typů fibroblastů pozorována opět snížená exprese genů spojená s TGF $\beta$  signální kaskádou. U PDF lze nalézt sníženou expresi genů pro fokální adhezi a genů pro interakci receptorů s extracelulární matrix. Exprese genů pro export proteinů je naopak zvýšena.

Při posledním srovnání klastrů ID+ vůči ECM+ byly pozorovány pouze marginální rozdíly v aktivitě signálních drah. Z těchto výsledků vyplývá, že rozdíly u aktinicky poškozených stárnoucích fibroblastů PDF se koncentrují v klastru ECM-.

Bioinformatická analýza byla provedena i u buněk melanomu z rozvolněných sferoidů. Analýza ukázala rozdělení pouze do dvou klastrů bez ohledu na typ užitých fibroblastů. Jeden z těchto klastrů byl transkripčně více aktivní, což je reprezentováno zvýšenou expresí *NEAT1* (*Nuclear Enriched Abundant Transcript 1*) a *MALAT1* (*Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*), což jsou geny dlouhých nekódujících RNA. Dlouhé nekódující RNA byly popsány v mnoha fyziologických a patologických procesech. Zmíněné geny jsou důležité např. při stabilizaci jaderných tělísek a sestřihu pre-mRNA a uvádí se, že stimulují migraci kožního i uveálního melanomu (Xia et al. 2019; Wu et al. 2020). Jelikož byla detekována exprese prozánětlivých faktorů ve specifických klastrech fibroblastů, cílem bylo zjistit, zda k této expresi dochází i u buněk melanomu. Data naznačují, že CXCL1 je převážně produkován buňkami melanomu, zatímco IL-6 a LIF jsou exprimovány fibroblasty. CXCL8 byl transkribován u obou buněčných populací, tedy u melanomu i dermálních fibroblastů. Tyto molekuly regulují nádorový ekosystém a podporují invazivní chování nádoru v něm.

Invazní potenciál buněk ze sféroidu byl také testován v kolagenovém gelu modelující extracelulární prostředí. Migrovaly zde nejprve jednotlivé fibroblasty následované buňkami melanomu v protáhlých výbězcích. Přidáním exogenního IL-6 do kultivačního média byla invaze buněk zvýšena a buňky melanomu migrovaly v masivních prstovitých čepech. Farmakologická inhibice tocilizumabem, který cílí na receptor IL-6, potvrdila očekávanou blokaci buněčné migrace.

Heterogenní sféroidy tvořené z melanomových buněk a fibroblastů v kombinaci se single-cell RNA sekvenováním představují velmi standardní model, který lze použít pro studium interakce fibroblastů s buňkami melanomu doplněný o velmi robustní analytický genetický přístup. Tento 3D model umožňuje lépe pochopit chování nádorového

ekosystému než konvenční 2D buněčné kultury. Tato studie potvrdila, že dermální fibroblasty nejsou homogenní skupinou, ale místo toho obsahují několik samostatných subpopulací s rozdílným expresním profilem. Právě metoda single-cell RNAseq umožňuje zachytit i subtilnější či méně početné populace, které ale mohou mít velký regulační potenciál. Tyto minoritní populace by v konvenčním sekvenování (tzv. bulk-seq) mohly uniknout pozornosti.

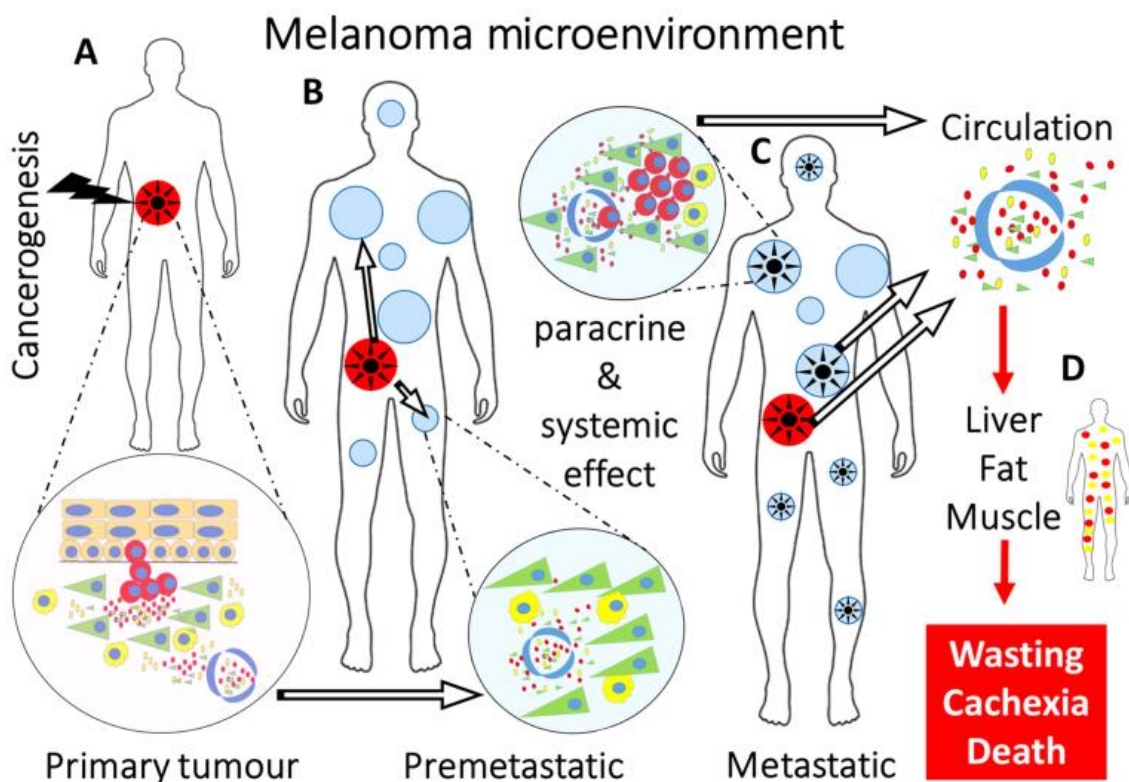
Endogenně a exogenně poškozené dermální fibroblasty (tedy změněné jak vlivem stárnutí, tak i UV ozáření) přispívají větší měrou k prozánětlivému prostředí, a stávají se tak důležitou komponentou určující charakter nádorového mikroprostředí. Jelikož jsou fibroblasty všude přítomnými buňkami, terapeutické cílení na celou populaci se obecně jeví jako riskantní a nereálný cíl. Hlubší znalosti heterogenity fibroblastů mohou představovat důležitý přínos a mohou mít dopad na vývoj nových přístupů v léčbě nádoru s cílením na jeden z klastrů s pro-nádorovým chováním.

#### *6.4 Tematický okruh: Mezibuněčná komunikace*

Autorská publikace VI: Kodet O, Kučera J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Štork J, Lacina L, Smetana K Jr. Cutaneous melanoma dissemination is dependent on the malignant cell properties and factors of intercellular crosstalk in the cancer microenvironment (Review). *Int J Oncol.* 2020 Sep;57(3):619-630. (IF: 5.24)

**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 4**

Jak bylo blíže ozřejmeno v kapitole 2.3.1., incidence maligního melanomu kůže stoupá. Tento přehledový článek VI se zaměřuje na interpretaci známých dat týkajících se vzniku kožního maligního melanomu a jeho následné diseminace, tedy rozsevu nádorových buněk do tkání a orgánů pacienta v průběhu progresu onemocnění (Obr. 23). Maligní melanom kůže vzniká na podkladě genetické mutace spojené s deregulací signálních drah. Invazní potenciál nádoru je ale také významně ovlivněn nádorovým mikroprostředím. Diseminace nádoru začíná nejprve vstupem do lumen intratumorálních cév a následnou cirkulací buněk nádoru v těle pacienta. Kritickým momentem pro metastazaci je ale dosažení nového vhodného, tzv. permisivního, prostředí v nějakém orgánu. Predilekční lokalizací pro buňky maligního melanomu při zakládání metastáz jsou zejména lymfatické uzliny, plíce a mozek.



**Obr. 23 Vznik, progres a systémový efekt kožního maligního melanomu.** (A) Vznik primárního nádoru ovlivňuje prostřednictvím parakrinní signalizace i okolní nerakovinné buňky (v růžovém kruhu je blíže znázorněno nádorové mikroprostředí). Tato parakrinní interakce stimuluje maligní potenciál nádoru. Signální molekuly následně difundují a unikají do krevního/lymfatického oběhu. (B) Cirkulace uvolněných cytokinů, chemokinů a růstových faktorů aktivuje normální vzdálené tkáně, které v nich formují vhodná premetastatická místa pro metastáze nádoru (detail v modře vyplněném kruhu). (C) V některých z těchto premetastatických nik se vytvoří sekundární (metastatické) nádory, což podmiňuje pozdější systémový efekt typický pro generalizované malignity. (D) Cirkulující bioaktivní látky vyvolávají fyzické a funkční orgánové změny vedoucí ke chřadnutí, nechutenství, a dokonce až k smrti pacienta. Převzato a upraveno z publikace VI od Kodet et al. (2020).

Důležitou součástí přehledového článku je shrnutí hlavních způsobů mezibuněčné komunikace v nádorovém mikroprostředí kožního maligního melanomu v průběhu jeho progresu.

Konkrétně je zaměřen na přímé mezibuněčné kontakty prostřednictvím kadherinů, dále na bioaktivní látky účastnící se parakrinní signalizace anebo na komunikaci využívající extracelulární tělíska – exosomy (kapitola 2.5). Tyto membránové váčky by neměly být v nádorové biologii opomíjeny, jelikož je stále lépe dokladováno, že hrají v mikroprostředí nádoru nezanedbatelnou roli (viz publikace IX).

V neposlední řadě je v této publikaci diskutováno, jak cirkulující bioaktivní látky jako cytokiny a chemokiny podporují vznik metastáz a jak navozují strukturální i funkční orgánové změny. Tento efekt se uplatňuje i na velké vzdálenosti a jde spíše již o systémový efekt. Takovéto působení na pacienta může vést ke kachexii, anorexii, celkovému strádání organismu a v nejhorším případě i k úmrtí. Přehledový článek také

zmiňuje význam možnosti cílené léčby v prevenci vzniku metastáz a reflektuje nový koncept léčiv – migrastatika (Gandalovičová et al. 2017). Migrastatika cílí terapeuticky totiž na invazivní schopnosti buněk. Kombinace migrastatik a tradičních onkologických léků by mohla být slibnou cestou v léčbě nádorových onemocnění.

Tento přehledový článek tedy shrnuje poznatky o vzniku kožního maligního melanomu, diskutuje jeho chování v prostředí nenádorových buněk, proces progresu a invaze nádoru až k jeho systémovému efektu na celý organismus.

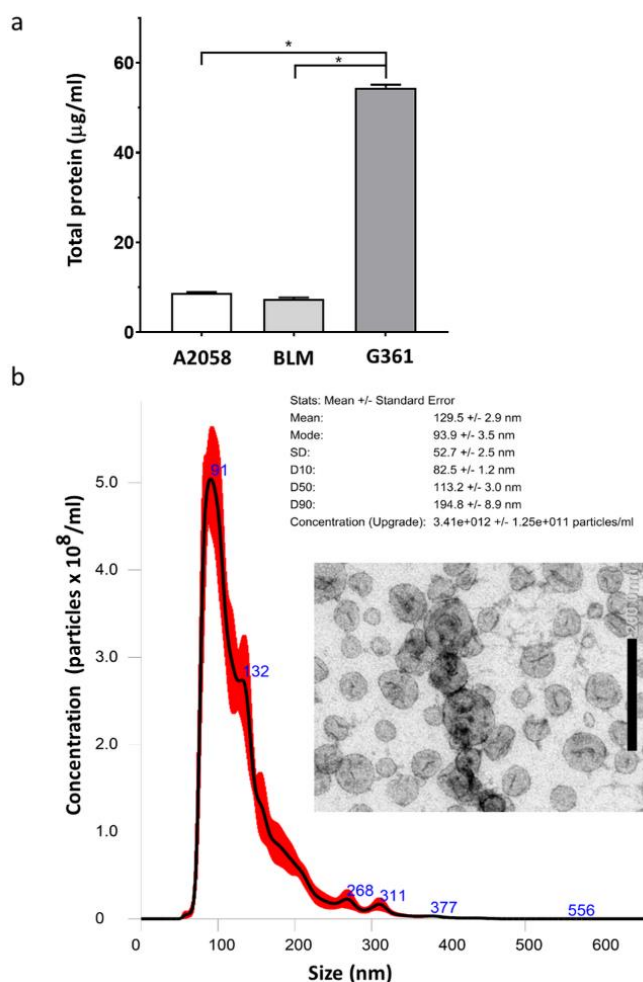
Autorská publikace IX: **Strnadová K**, Pfeiferová L, Příkryl P, Dvořánková B, Vlčák E, Frýdlová J, Vokurka M, Novotný J, Šáchová J, Hradilová M, Brábek J, Šmigová J, Rösel D, Smetana K Jr., Kolář M, Lacina L. Exosomes produced by melanoma cells significantly influence the biological properties of normal and cancer-associated fibroblasts. *Histochem Cell Biol.* 2022;157(2):153–172. (IF: 4.304)

**Citační ohlas podle Web of Science (mimo autocitace): 2**

Exosomy představují nástroj pro jednu z mnoha možných forem mezibuněčné komunikace. Mohou tedy ovlivňovat i chování nádoru a jeho mikroprostředí. Naše studie byla zaměřena na sledování vlivu exosomů izolovaných z buněk melanomu na funkční a fenotypové vlastnosti normálních lidských dermálních fibroblastů (anglicky: *Human Dermal Fibroblasts*; HDF) a nádorově-asociovaných fibroblastů izolovaných z maligního melanomu (anglicky: *Cancer-associated fibroblasts isolated from malignant melanoma*; mCAF).

Z několika možných přístupů jsme pro dosažení optimálního výtěžku zvolili metodu ultracentrifugace s hustotním gradientem. Pro izolaci exosomů byly buňky melanomu ponechány v kultivačním médiu s 5% fetálním bovinním sérem (anglicky: *Foetal Bovine Serum*; FBS) zbaveného exosomů (A27208-01, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cílem tak bylo získat exosomy pouze od melanomových buněk. Kondicionované médium bylo stočeno v několika krocích s využitím roztoku pro hustotní gradient OptiPrep (Alere Technologies AS, Oslo, Norsko). Následně byl obsah zkumavky rozdělen na dvanáct mililitrových frakcí odshora dolů. Frakce 6, 7 a 8 obsahující purifikované exosomy byly spojeny dohromady, zředěny PBS a znovu odstředěny. Na závěr byly tyto koncentrované frakce resuspendovány v PBS a takto připravený vzorek byl použit pro další analýzu a experimenty.

Exosomy po izolaci gradientovou ultracentrifugací byly charakterizovány na základě velikosti a koncentrace částic (Obr. 24). Pro gradientovou ultracentrifugaci jako pro optimální izolační metodu svědčila i dokonalá morfologie potvrzená elektronovou mikroskopií izolátu, která potvrdila vysokou puritu exosomů a absenci jiných elementů, například proteinových agregátů (Obr. 24). V neposlední řadě bylo ultracentrifugací dosahováno i vysokého obsahu celkového proteinu, od kterého se odvozovalo použité množství exosomů při experimentech. Zjistili jsme, že proliferační aktivita obou typů studovaných fibroblastů závisí na použité proteinové koncentraci. Při zvyšující se koncentraci dochází k zpomalování buněčného množení. Podobně došlo i k zpomalení buněčné adheze (posuzované změnou impedance automatizovaného měřicího systému iCelligence).



**Obr. 24 Charakterizace exosomů izolovaných z melanomové linie G361.** (a) Graf znázorňuje kvantifikaci celkového proteinu exosomů izolovaných z tří melanomových linií, kdy pouze G361 produkovaly exosomy v takovém množství, které bylo dostačující pro následné experimenty (chybové úsečky představují standardní odchylky pozorovaných hodnot; statistická významnost byla vypočtena neparametrickým Tukeyho testem významnosti ( $p \leq 0.05$  byla považována za statisticky významnou)). (b) Exosomy z G361 vykazovaly typickou charakteristiku exosomů vzhledem k morfologii (elektronový mikroskop) a velikosti (*Nanoparticle tracking analysis*). Převzato a upraveno z publikace IX od Strnadová et al. (2022).

Vliv exosomů na fibroblasty byl dále studován na trojrozměrném modelu mimikujícím dermis. Krátkodobá kultivace s exosomy v médiu ukázala zrychlení invaze kolagenovým gelem jak v případě nádorově-asociovaných fibroblastů, tak u normálních dermálních fibroblastů.

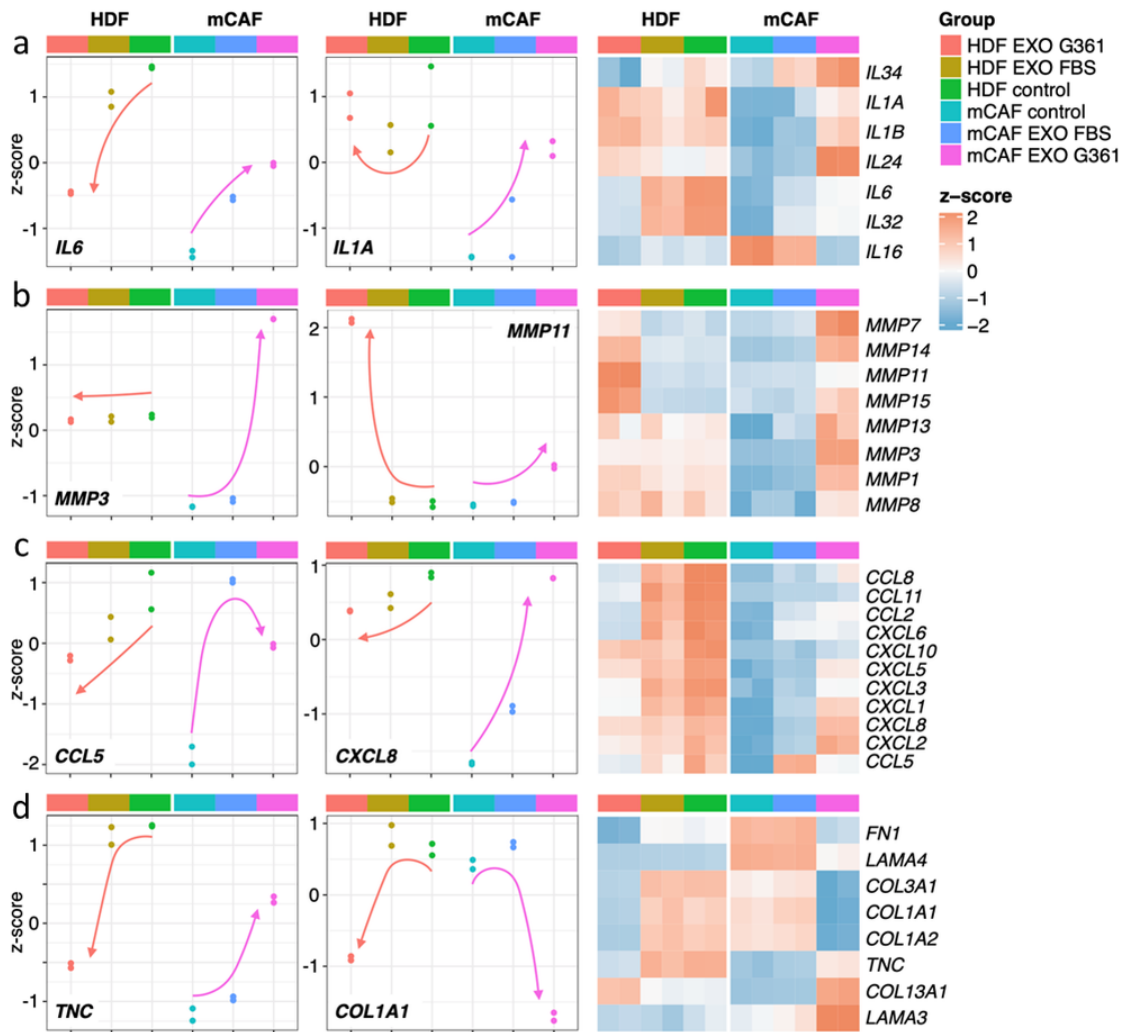
Ve 3D podmínkách byl efekt exosomů zkoumán i dlouhodoběji po dobu 7 dní. Kompozitní sféroidy vytvořené metodou visící kapky obsahovaly kromě fibroblastů i buňky melanomu a byly spolu s exosomy imobilizovány v kolagenovém gelu. Na snímcích z elektronového mikroskopu bylo pozorováno, že exosomy si uchovávají své strukturální vlastnosti mezi vlákny kolagenu. Invaze nádorových buněk pak ukázala, že model s nádorově asociovanými fibroblasty potencovaný přidanými exosomy zesiluje invazivní potenciál melanomových buněk signifikantně. V kontrolním případě s normálními fibroblasty však výsledky nedosáhly hranice pro signifikantní rozdíl.

Na molekulární úrovni byly fibroblasty hodnoceny na Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky. Po 72hodinové kultivaci obou typů fibroblastů s exosomy byla izolovaná jejich RNA. Transkriptomická analýza (Obr. 25) ukázala, že u obou typů fibroblastů dochází pod vlivem exosomů k reorganizaci genů pro extracelulární matrix, např. zvýšením exprese genů pro MMP. To koreluje s výsledky, kdy samotné fibroblasty zrychlují svou invazi kolagenovým gelem. Nádorově-asociované fibroblasty pod vlivem exosomů zvyšují expresi genů pro cytokiny a chemokiny, např. *IL-6* a *CXCL8*, čímž ustanovují prozánětlivý charakter nádorového mikroprostředí podporující progresi nádoru.

Zajímavým zjištěním byla rozdílná exprese dvou proteinů: IL1RA a thrombospondinu-1. IL1RA je receptorem pro IL-33 a je zvýšen pod vlivem exosomů u nádorově-asociovaných fibroblastů. Je znám pro svojí roli při nádorové progresi (Mantovani et al. 2018). Naopak thrombospondin-1 je u těchto fibroblastů pod vlivem exosomů snížen. Jiná data ukazují, že exprese tohoto proteinu u buněk melanomu inhibuje progresi nádoru. Na druhou stranu zvýšená exprese tohoto proteinu u stromálních buněk kožního melanomu je spjata se sníženým přežíváním (Trotter et al. 2003).

Hlavním výstupem této publikace tedy je, že exosomy hrají významnou roli v mezibuněčné komunikaci mezi nádorem a ostatními buňkami nádorového mikroprostředí. Bylo zjištěno, že tyto malé extracelulární váčky, izolované z buněk maligního melanomu, stimulují prozánětlivé chování nádorově-asociovaných fibroblastů a že změnou těchto vlastností podporují šíření nádoru. Publikace dále prokazuje, jak

dramaticky se mohou měnit biologické vlastnosti nádoru při použití 2D a 3D kulturačních technik.



**Obr. 25** Transkriptomická analýza HDF a mCAF pod vlivem exosomů. Grafy ukazují změny v genové expresi u HDF nebo mCAF, které byly stimulovány exosomy z G361 (EXO G361) nebo FBS (EXO FBS) po dobu 72 hod. Celkový trend je označen oranžovou (HDF) nebo růžovou (mCAF) šipkou. Panel (a) představuje genové změny s důrazem na interleukiny, kdy lze pozorovat např. nárůst exprese *IL6* u mCAF EXO G361. Panel (b) ukazuje změny v expresi matrix metaloproteináz. Převážně dochází ke zvýšené expresi u mCAF EXO G361, ale i u některých vybraných genů pro MMP lze pozorovat jejich zvýšenou expresi u HDF EXO G361. Panel (c) ukazuje změny v expresi chemokinů, jejichž zvýšená exprese je pozorována u stimulovaných mCAF. Panel (d) znázorňuje změny na úrovni mRNA pro molekuly extracelulární matrix. Opačný trend byl pozorován u genu pro *TNC* (*tenascin-C*), jehož protein je bohatou molekulou nádorového mikroprostředí mnoha nádorů. Převzato a upraveno z publikace IX od Strnadová et al. (2022).



## 7 Závěr a zhodnocení cílů

Tato disertační práce pojednává o fenotypu melanocytů za fyziologických a převážně patologických podmínek, které modelově představuje zhoubné onemocnění kůže – maligní melanom. O souvislostech změn kůže v průběhu stárnutí organismu a zvýšené incidence maligního melanomu nebo obecně nádorů v populaci pojednávají dva přehledové články II a VII. V nich je diskutováno, jak je stárnutí zapříčiněno exogenními a endogenními vlivy, přičemž stárnutí kůže významně ovlivňuje zejména fyzikální faktor UV záření. Stárnutí organismu a dlouhodobé vystavení těmto radiačním vlivům je následně doprovázeno poškozením DNA, deregulací biologických pochodů v tkáních těla, přechodem buněk do senescence a zvýšeným prozánětlivým laděním mikroprostředí organismu. V souvislosti s produkcí prozánětlivých molekul, např. IL-6, je vytvářen chronický zánět, který v lidském těle usnadňuje vznik nádorových procesů. Nádor si pak ve tkáni dále průběžně dotváří své mikroprostředí. Dominantní roli v tomto mikroprostředí mají nádorově-asociované fibroblasty, které podporují nádorovou progresi. Kvalitní lékařská péče umožňuje přežití lidí do vyššího věku, než tomu bylo v minulosti. Na druhou stranu dochází čím dál častěji k rozvoji civilizačních chorob, které odrážejí negativní vlivy moderního životního stylu, vystavení dlouhodobému stresu či nedostatku fyzické aktivity. Jedním z takových civilizačních břemen jsou i maligní nádory. Lze tedy říct, že zvýšená incidence maligního melanomu, či obecně nádorových onemocnění, souvisí se stárnutím populace, které je doprovázeno u jednotlivců buněčnými a tkáňovými změnami, které usnadňují vznik nádorů.

Včasná detekce maligního melanomu představuje do současnosti zásadní krok zlepšující prognózu pacienta. V publikaci III byla analyzována séra pacientů trpících maligním melanomem a byly identifikovány některé cytokiny (např. IL-6), chemokiny (např. IL-8) a růstové faktory (např. VEGF), které reflektují změny na úrovni organismu v době diagnózy nebo v průběhu progresu onemocnění. Bohužel, konvenčně používané diagnostické screeningové metody (např. různé varianty sérologie) u maligního melanomu nejsou v současnosti považovány za významně přínosné. Důraz je tedy v onkologickém výzkumu nutno klást také na inovativní technologie a mezioborovou spolupráci. V publikaci IV byly proto experimentálně sledovány změny kondiciovaných médií připravených z kultur nádorových a nenádorových buněk. Kondiciovaná média můžeme pokládat za analogii komplexních biologických tekutin analyzovaných

v klinické medicíně. Tato média byla studována inovativní technologií, s uplatněním plazmoniky a SERS.

Identifikace vhodných sérových biomarkerů a nových přístupů, které jsme vyzkoušeli v publikaci III a IV, by mohly obohatit dosavadní úzkou škálu diagnostických, či screeningových metod a přispět k rychlejšímu a správnějšímu rozhodování při diagnostice a léčbě například právě maligního melanomu.

Výše zmíněná kondiciovaná média jsou tradičním přístupem k získávání materiálu zejména pro biochemickou analýzu z tkáňových kultur. Úspěšné modelování maligního melanomu ale vyžaduje komplexní přístup a zapojení jeho nádorového mikroprostředí. V současnosti je tedy patrná tendence k optimalizaci kultur hlavně ve 3D podmínkách, protože ty optimálně odráží biologické chování nádoru. Ve studii I byl demonstrován vliv látek secernovaných nádorově-asociovanými fibroblasty spolu s ozářenými keratinocyty na invazi buněk melanomu v *in vitro* podmínkách. Bylo potvrzeno, že dlouhodobější vystavení UV záření v menších dávkách a sekrece aktivních biomolekul buňkami kůže zvyšuje invazi nádorových buněk z 3D modelu melanomu v podobě homogenních sféroidů. V publikaci VIII byly obdobně využity heterogenní sféroidy pro modelování melanomu s důrazem na interakce nádorové populace s juvenilními neozářenými či aktinicky poškozenými fibroblasty mimikujícími mikroprostředí. Prostřednictvím single-cell RNA sekvenování a bioinformatické analýzy bylo zjištěno, že fibroblasty vytváří v modelu nádoru různě diferencované skupiny na základě svých vlastností a chovají se v prostředí nádoru jinak. Převážná část populace fibroblastů je zodpovědná za produkci extracelulární matrix, druhá skupina se vymezuje expresí genů pro TGF $\beta$  signální kaskádu a třetí klastř fibroblastů je zajímavý pro svou expresi genů zánětu. Příkladem je produkce IL-6 podporující maligní chování nádoru.

V prostředí nádorových kultur může zvyšovat řízeně míru komplexity modelu jen do určité míry. Do současnosti platí, že z mnoha důvodů je pro mnoho experimentů kriticky významné jejich ověření na zvířecím modelu. V publikaci V bylo tedy nádorové mikroprostředí modelováno *in ovo* prostřednictvím CAM kuřete, na které byly transplantovány buňky melanomu. Výsledky naznačují, že komponenty CAM podporují nádor v růstu, ale jejich intravaskulární nebo intrastromální invazivní potenciál byl detekován pouze výjimečně. Důvodem může být krátkodobá kultivace z důvodu líhnutí kuřete nebo biologické vlastnosti CAM. Všechny tři uvedené modely napomáhají lépe pochopit chování nádoru, než je tomu u planárních kultivací *in vitro*.

Jestliže přehledový článek VI shrnuje poznatky o mezibuněčné komunikaci u kožního maligního melanomu a jeho diseminaci v těle pacienta, je na místě snažit se i o mechanistické sledování těchto dějů. V poslední publikaci zařazené do této disertační práce (publikace IX) jsme se tedy zaměřili na exosomy jako informační nosiče mezibuněčné komunikace. Exosomy vznikají exocytózou a umožňují předání informace z buňky zdrojové buňkám okolním. Exosomy mohou ale přecházet i do cirkulujících tělesných tekutin a ovlivňovat i struktury organismu značně vzdálené. Tato studie se zaměřila v kontextu této disertace zejména na rozdíly v chování zdravých fibroblastů a mCAF v přítomnosti exosomů z buněčné linie melanomu. mCAF se pod vlivem exosomů více aktivují a vzrůstá u nich exprese prozánětlivých molekul na úrovni mRNA.

Maligní melanom je jedno z nejagresivnějších maligních kožních onemocnění, které vzniká neoplastickou transformací a proliferací melanocytů. V této disertační práci byly sledovány souvislosti mezi stárnutím kůže a zvýšenou incidencí maligního melanomu. Solidní nádory vyžadují pro svůj růst a šíření specifické nádorové mikroprostředí, ve kterém dominantní roli sehrává populace nádorově-asociovaných fibroblastů. Mnoho z faktorů považovaných za typické rysy sekretomu v senescenci překvapivě sehrává významnou podpůrnou roli v nádorových procesech. Tento nádorový ekosystém jsme modelovali ve 3D podmínkách za použití různých fibroblastů a potvrdili jsme tak, jak značnou roli hraje exprese prozánětlivých molekul podporujících vhodné prostředí pro růst nádoru. Kromě této parakrinní komunikace solubilními molekulami je důležitou součástí informačního toku nádorového prostředí i komunikace prostřednictvím exosomů. Exosomy aktivují nádorově-asociované fibroblasty a napomáhají invazi nádorových buněk.

Diagnostika a léčba maligního melanomu je do současnosti považována klinickými onkology za mimořádně náročnou problematiku. Je tedy potřeba nacházet i nadále nové metody a přístupy, které by v tomto snažení napomohly. Některé tyto trendy by mohly mít východisko v publikacích prezentovaných v této disertační práci.

## 8 Souhrn

- Kůže je v průběhu života vystavována ultrafialovému záření a dalším fyzikálním, biologickým, či chemickým faktorům, které ji poškozují. Kumulativním působením těchto škodlivých vlivů dochází ke změnám na úrovni tkáně, buněk i

jejich genetické informace. Aktinické poškození kůže UV zářením je jednou z hlavních příčin pro vznik maligního melanomu. Důvodem, proč je populačně u starších jedinců větší riziko vzniku nádorového onemocnění včetně melanomu, je právě kumulace poškození tkáně v průběhu stárnutí. To vede navíc k chronicky prozánětlivému ladění tkáňového mikroprostředí, které rozvoj nádoru usnadňuje. S věkem také současně klesá i schopnost organismu se mutacím aktivně bránit jejich opravou.

- Sekretom UV ozářených keratinocytů a nádorově-asociovaných fibroblastů zvyšuje invazi buněk melanomu ze sféroidů v kolagenovém gelu. Tento model poukazuje na synergii vlivu nádorového mikroprostředí a UV radiace na progresi maligního melanomu.
- Model heterogenních sféroidů složených z buněk melanomu a rozdílně aktinicky zatížených fibroblastů byl podroben single-cell RNA sekvenování a bioinformatické analýze. Z té vyplývá, že fibroblasty se v přítomnosti nádorových buněk rozdělují do klastrů na základě své genové exprese. Fakt, že stárnutí a stres plynoucí z poškození buněk je důležitým faktorem pro vývoj maligního onemocnění včetně melanomu, dokladuje i nález, že jeden z klastrů aktinicky poškozených fibroblastů významně exprimuje geny prozánětlivých mediátorů.
- Chorioalantoidní membrána kuřete je vhodným komplexním modelem pro studium nádorové neovaskularizace, ale při studiu invazivního chování maligního melanomu má tento přístup své určité limity.
- Exosomy hrají významnou roli v mezibuněčné komunikaci mezi nádorem a ostatními buňkami nádorového mikroprostředí. Stimulují prozánětlivé chování nádorově-asociovaných fibroblastů, čímž podporují nádorový růst.
- Časná detekce maligního melanomu představuje lepší prognózu pacienta. Z analýzy sér pacientů s maligním melanomem vyplývá, že je přítomnost primárního nádoru významně spojena se sníženými hladinami IL-2, IL-13, RANTES a zvýšenými hladinami IL1RA, MIP-1 $\beta$  a EGF. Progrese nádoru je stimulována IL-6 a IL-8, jejichž výskyt koreluje s nepříznivými hodnotami Breslowovy klasifikace.

## 9 Summary

- The skin is exposed to ultraviolet radiation and other physical, biological, or chemical factors during life. The cumulative effect of these harmful effects leads to changes in the level of tissue, cells, and their genetic information. Actinic damage to the skin by UV radiation is one of the main causes of malignant melanoma. The elderly people have a greater risk of developing cancer because of the cumulative tissue damage during ageing. This leads to chronically proinflammatory tuning of the tissue microenvironment. Furthermore, the ability of a body to resist mutations is decreasing with age.
- Secretome of UV-irradiated keratinocytes and cancer-associated fibroblasts increased the invasion of melanoma cells from spheroids in the collagen gel. This model showed the influence of the tumour microenvironment and UV radiation on the progression of malignant melanoma.
- A model of heterogeneous spheroids composed of melanoma cells and otherwise actinically damaged fibroblasts was subjected to single-cell RNA sequencing and bioinformatic analysis. The fibroblasts were distinguished into clusters based on their gene expression in the presence of a tumour. The claim that ageing and endogenous cell damage are the important factors in the adverse development of malignant melanoma is confirmed by the fact that one of the clusters of actinically damaged fibroblasts expressed genes for inflammation.
- The chicken chorioallantoic membrane is a suitable model for the study of neovascularization, but it found its limits in the study of the invasive behavior of malignant melanoma.
- Exosomes play an important role in intercellular communication between the tumour and other cells of the tumour microenvironment. They stimulated the proinflammatory behavior of cancer-associated fibroblasts, thereby promoting the tumour growth.
- Early detection of malignant melanoma represents a better prognosis of the patient. Analysis of sera from patients with malignant melanoma showed that the presence of the primary tumour was significantly associated with decreased levels of IL-2, IL-13, RANTES and increased levels of IL1RA, MIP-1 $\beta$  and EGF. Tumour progression was stimulated by IL-6 and IL-8, the occurrence of which correlated with unfavorable Breslow classification values.

## 10 Seznam použité literatury

- Aasen S. N., Parajuli H., Hoang T., Feng Z., Stokke K., Wang J., Roy K., Bjerkgvig R., Knappskog S., Thorsen F. (2019) Effective treatment of metastatic melanoma by combining mapk and pi3k signaling pathway inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–19.
- Abbasi N. R., Shaw H. M., Rigel D. S., Friedman R. J., McCarthy W. H., Osman I., Kopf A. W., Polsky D. (2004) Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma Revisiting the ABCD Criteria. *JAMA* **292**, 2771–2776.
- Abdel-Malek Z., Scott M. C., Suzuki I., Tada A., Im S., Lamoreux L., Ito S., Barsh G., Hearing V. J. (2000) The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 156–162.
- Abraham J., Stenger M. (2014) Dabrafenib in advanced melanoma with BRAF V600E mutation. *J. community Support. Oncol.* **12**, 48–49.
- Achilli T. M., Meyer J., Morgan J. R. (2012) Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin. Biol. Ther.* **12**, 1347–1360.
- Acosta J. C., Banito A., Wuestefeld T., Georgilis A., Janich P., Morton J. P., Athineos D., Kang T., Lasitschka F., Andrulis M., Pascual G., Morris K. J., Khan S., Jin H., Dharmalingam G., Snijders A. P., Carroll T., Capper D., Pritchard C., Inman G. J., Longerich T., Sansom O. J., Benitah S. A., Zender L., Gil J. (2013) A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* **15**, 978–990.
- Aijian A. P., Garrell R. L. (2015) Digital Microfluidics for Automated Hanging Drop Cell Spheroid Culture. *SLAS Technol.* **20**, 283–295.
- Akers J. C., Gonda D., Kim R., Carter B. S., Chen C. C. (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* **113**, 1–11.
- Allen T. M., Brehm M. A., Bridges S., Ferguson S., Kumar P., Mirochnitchenko O., Palucka K., Pelanda R., Sanders-Beer B., Shultz L. D., Su L., PrabhuDas M. (2019) Humanized immune system mouse models: progress, challenges and opportunities. *Nat. Immunol.* **20**, 770–774.
- Amaro-Ortiz A., Yan B., D’Orazio J. A. (2014) Ultraviolet radiation, aging and the skin: Prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules* **19**, 6202–6219.
- Anada T., Pan C.-C., Stahl A., Mori S., Fukuda J., Suzuki O., Yang Y. (2019) Vascularized Bone-Mimetic Hydrogel Constructs by 3D Bioprinting to Promote Osteogenesis and Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1096.
- Ancans J., Tobin D. J., Hoogduijn M. J., Smit N. P., Wakamatsu K., Thody A. J. (2001) Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **268**, 26–35.
- Ansary T. M., Hossain M. R., Kamiya K., Komine M., Ohtsuki M. (2021) Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3974.
- Aoki H., Tomita H., Hara A., Kunisada T. (2015) Conditional deletion of kit in melanocytes: White spotting phenotype is cell autonomous. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 1829–1838.
- Aref A. R., Campisi M., Ivanova E., Portell A., Larios D., Piel B. P., Mathur N., Zhou C., Coakley R. V., Bartels A., Bowden M., Herbert Z., Hill S., Gilhooley S., Carter J., Cañadas I., Thai T. C., Kitajima S., Chiono V., Paweletz C. P., Barbie D. A., Kamm R. D., Jenkins R. W. (2018) 3D microfluidic ex vivo culture of organotypic tumor

- spheroids to model immune checkpoint blockade. *Lab Chip* **18**, 3129–3143.
- Argenyi Z. B. (1997) DERMOSCOPY (EPILUMINESCENCE MICROSCOPY) OF PIGMENTED SKIN LESIONS: Current Status and Evolving Trends. *Dermatol. Clin.* **15**, 79–95.
- Aronheim A., Engelberg D., Li N., Al-Alawi N., Schlessinger J., Karin M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* **78**, 949–961.
- Avram S., Coricovac D. E., Pavel I. Z., Pinzaru I., Ghiulai R., Baderca F., Soica C., Muntean D., Branisteanu D. E., Spandidos D. A., Tsatsakis A. M., Dehelean C. A. (2017) Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice. *Oncol. Rep.* **38**, 89–99.
- Aydin I. T., Hummler E., Smit N. P. M., Beermann F. (2012) Coat color dilution in mice because of inactivation of the melanoma antigen MART-1. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**, 37–46.
- Bai L. P., Lv J. X., Kong L. W., Cao H. Y., Jin Y. (2021) Application of modified closed biopsy in rabbit model of VX2-transplanted bone tumor. *J. Orthop. Surg. Res.* **16**, 1–8.
- Bajčiová V. (2016) Maligní melanom a nové možnosti jeho léčby. *Onkol. (Czech Republic)* **10**, 256–262.
- Balamurugan K. (2016) HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int. J. Cancer* **138**, 1058–1066.
- Balch C. M., Gershenwald J. E., Soong S. J., Thompson J. F., Atkins M. B., Byrd D. R., Buzaid A. C., Cochran A. J., Coit D. G., Ding S., Eggermont A. M., Flaherty K. T., Gimotty P. A., Kirkwood J. M., McMasters K. M., Mihm M. C., Morton D. L., Ross M. I., Sober A. J., Sondak V. K. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6199–6206.
- Basurto-Lozada P., Molina-Aguilar C., Castaneda-Garcia C., Vázquez-Cruz M. E., Garcia-Salinas O. I., Álvarez-Cano A., Martínez-Said H., Roldán-Marín R., Adams D. J., Possik P. A., Robles-Espinoza C. D. (2021) Acral lentiginous melanoma: Basic facts, biological characteristics and research perspectives of an understudied disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* **34**, 59–71.
- Belotti D., Vergani V., Drudis T., Borsotti P., Pitelli M. R., Viale G., Giavazzi R., Taraboletti G. (1996) The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin. Cancer Res.* **2**, 1843–9.
- Benien P., Swami A. (2014) 3D tumor models: History, advances and future perspectives. *Futur. Oncol.* **10**, 1311–1327.
- Bergqvist C., Ezzedine K. (2020) Vitiligo: A Review. *Dermatology* **236**, 571–592.
- Bertrand J. U., Steingrimsson E., Jouenne F., Bressac-De Paillerets B., Larue L. (2020) Melanoma risk and melanocyte biology. *Acta Derm. Venereol.* **100**, 272–283.
- Bettahar F., Bekkar F., Pérez-Álvarez L., Ferahi M. I., Meghabar R., Vilas-Vilela J. L., Ruiz-Rubio L. (2021) Tough Hydrogels Based on Maleic Anhydride, Bulk Properties Study and Microfiber Formation by Electrospinning. *Polymers (Basel)*. **13**, 972.
- Bissig C., Rochin L., Niel G. van (2016) PMEL Amyloid Fibril Formation: The Bright Steps of Pigmentation. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1438.
- Bocci G., Paolo A. Di, Danesi R. (2013) The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis* **16**, 481–492.
- Bondurand N., Pingault V., Goerich D. E., Lemort N., Sock E., Caignec C. Le, Wegner M., Goossens M. (2000) Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1907–1917.

- Böni R., Burg G., Doguoglu A., Ilg E. C., Schäfer B. W., Müller B., Heizmann C. W. (1997) Immunohistochemical localization of the Ca<sup>2+</sup> binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *Br. J. Dermatol.* **137**, 39–43.
- Bootorabi F., Manouchehri H., Changizi R., Barker H., Palazzo E., Saltari A., Parikka M., Pincelli C., Aspatwar A. (2017) Zebrafish as a model organism for the development of drugs for skin cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–15.
- Bourland J., Fradette J., Auger F. A. (2018) Tissue-engineered 3D melanoma model with blood and lymphatic capillaries for drug development. *Sci. Rep.* **8**, 1–13.
- Bourneuf E. (2017) The MeLiM minipig: An original spontaneous model to explore cutaneous melanoma genetic basis. *Front. Genet.* **8**, 1–12.
- Brábek J., Jakubek M., Vellieux F., Novotný J., Kolář M., Lacina L., Szabo P., Strnadová K., Rösel D., Dvořánková B., Smetana K. (2020) Interleukin-6: Molecule in the Intersection of Cancer, Ageing and COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7937.
- Bracher A., Cardona A. S., Tauber S., Fink A. M., Steiner A., Pehamberger H., Niederleithner H., Petzelbauer P., Gröger M., Loewe R. (2013) Epidermal growth factor facilitates melanoma lymph node metastasis by influencing tumor lymphangiogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 230–238.
- Breslow A. (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* **172**, 902–908.
- Brettmann E. A., Guzman Strong C. de (2018) Recent evolution of the human skin barrier. *Exp. Dermatol.* **27**, 859–866.
- Buchbinder E. I., Desai A. (2016) CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Am. J. Clin. Oncol.* **39**, 98–106.
- Buday L., Downward J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611–620.
- Burggren W., Antich M. R. (2020) Angiogenesis in the avian embryo chorioallantoic membrane: A perspective on research trends and a case study on toxicant vascular effects. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **7**, 1–18.
- Campisi J. (2005) Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell* **120**, 513–522.
- Carlino M. S., Long G. V. (2016) Ipilimumab combined with nivolumab: A standard of care for the treatment of advanced melanoma? *Clin. Cancer Res.* **22**, 3992–3998.
- Casalou C., Moreiras H., Mayatra J. M., Fabre A., Tobin D. J. (2022) Loss of ‘Epidermal Melanin Unit’ Integrity in Human Skin During Melanoma-Genesis. *Front. Oncol.* **12**, 1–14.
- Chambers E. S., Vukmanovic-Stejic M. (2020) Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* **160**, 116–125.
- Chamcheu J. C., Roy T., Uddin M. B., Banang-mbeumi S., Chamcheu R. N., Walker A. L., Liu Y., Huang S. (2019) Role and Therapeutic Targeting of the PI3K / Akt / mTOR Signaling Pathway in Skin Cancer : Natural and Synthetic Agents Therapy. *Cells* **8**, 1–33.
- Chen G., Huang A. C., Zhang W., Zhang G., Wu M., Xu W., Yu Z., Yang J., Wang B., Sun H., Xia H., Man Q., Zhong W., Antelo L. F., Wu B., Xiong X., Liu X., Guan L., Li T., Liu S., Yang R., Lu Y., Dong L., McGettigan S., Somasundaram R., Radhakrishnan R., Mills G., Lu Y., Kim J., Chen Y. H., Dong H., Zhao Y., Karakousis G. C., Mitchell T. C., Schuchter L. M., Herlyn M., Wherry E. J., Xu X., Guo W. (2018a) Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* **560**, 382–386.
- Chen Y. N., Jiao C., Zhao Y., Zhang J., Wang H. (2018b) Self-Assembled Polyvinyl



- Alcohol-Tannic Acid Hydrogels with Diverse Microstructures and Good Mechanical Properties. *ACS Omega* **3**, 11788–11795.
- Cheong K. A., Noh M., Kim C. H., Lee A. Y. (2014) S100B as a potential biomarker for the detection of cytotoxicity of melanocytes. *Exp. Dermatol.* **23**, 165–171.
- Chiew G. G. Y., Wei N., Sultania S., Lim S., Luo K. Q. (2017) Bioengineered three-dimensional co-culture of cancer cells and endothelial cells: A model system for dual analysis of tumor growth and angiogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 1865–1877.
- Chu P.-Y., Koh A. P.-F., Antony J., Huang R. Y.-J. (2022) Applications of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model for Cancer Studies. *Cells Tissues Organs* **211**, 222–237.
- Cichorek M., Wachulska M., Stasiewicz A., Tymińska A. (2013) Skin melanocytes: biology and development. *Adv. Dermatology Allergol.* **1**, 30–41.
- Clark W. H. (1967) A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and clinical behavior. *Adv. Biol. Ski. Pigment. Syst.* **8**, 621–645.
- Clark W. H., From L., Bernardino E. A., Mihm M. C. (1969) The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Res.* **29**, 705–727.
- Cole M. A., Quan T., Voorhees J. J., Fisher G. J. (2018) Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J. Cell Commun. Signal.* **12**, 35–43.
- Coluccio M. L., Perozziello G., Malara N., Parrotta E., Zhang P., Gentile F., Limongi T., Raj P. M., Cuda G., Candeloro P., Fabrizio E. Di (2019) Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectron. Eng.* **208**, 14–28.
- Couto G. de (2019) Macrophages in cardiac repair: Environmental cues and therapeutic strategies. *Exp. Mol. Med.* **51**, 1–10.
- Cui J., Shen L.-Y., Wang G. (1991) Role of Hair Follicles in the Repigmentation of Vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 410–416.
- Cui R., Widlund H. R., Feige E., Lin J. Y., Wilensky D. L., Igras V. E., D’Orazio J., Fung C. Y., Schanbacher C. F., Granter S. R., Fisher D. E. (2007) Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853–864.
- Czarnecka A. M., Bartnik E., Fiedorowicz M., Rutkowski P. (2020) Targeted therapy in melanoma and mechanisms of resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–21.
- D’Alba L., Shawkey M. D. (2019) Melanosomes: Biogenesis, properties, and evolution of an ancient organelle. *Physiol. Rev.* **99**, 1–19.
- D’Mello S. A. N., Finlay G. J., Baguley B. C., Askarian-Amiri M. E. (2016) Signaling pathways in melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–18.
- Davies M. A. (2012) The Role of the PI3K-AKT Pathway in Melanoma. *Cancer J.* **18**, 142–147.
- Dennison K. L., Samanas N. B., Harenda Q. E., Hickman M. P., Seiler N. L., Ding L., Shull J. D. (2015) Development and characterization of a novel rat model of estrogen-induced mammary cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **22**, 239–248.
- Donato R., Cannon B., Sorci G., Riuzzi F., Hsu K., J. Weber D., L. Geczy C. (2012) Functions of S100 Proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24–57.
- Dong X., Wang Y., Qu Y., Liu J., Feng X., Xu X. (2021) MicroRNA-603 Promotes Progression of Cutaneous Melanoma by Regulating TBX5. *Comput. Math. Methods Med.* **2021**, 1–11.
- Dreesen O. (2020) Towards delineating the chain of events that cause premature senescence in the accelerated aging syndrome Hutchinson–Gilford progeria (HGPS). *Biochem. Soc. Trans.* **48**, 981–991.
- Duong P., Chung A., Bouchareychas L., Raffai R. L. (2019) Cushioned-Density Gradient

- Ultracentrifugation (C-DGUC) improves the isolation efficiency of extracellular vesicles. *PLoS One* **14**, 1–16.
- Dyck R. H., Bogoch I. I., Marks A., Melvin N. R., Teskey G. C. (2002) Enhanced epileptogenesis in S100B knockout mice. *Mol. Brain Res.* **106**, 22–29.
- Eberle J., Hossini A. (2008) Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. *Curr. Genomics* **9**, 409–419.
- Eckert R. L., Broome A. M., Ruse M., Robinson N., Ryan D., Lee K. (2004) S100 proteins in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 23–33.
- Eckrich J., Kugler P., Buhr C. R., Ernst B. P., Mendler S., Baumgart J., Brieger J., Wiesmann N. (2020) Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. *Sci. Rep.* **10**, 1–14.
- Erdag G., Chowdhuri S. R., Fetsch P., Erickson D., Hughes M. S., Filie A. C. (2013) KBA.62 and S100 protein expression in cytologic samples of metastatic malignant melanoma. *Diagn. Cytopathol.* **176**, 847–851.
- Eroglu Z., Ribas A. (2016) Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: Latest evidence and place in therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **8**, 48–56.
- Fábián M., Rencz F., Krenács T., Brodszky V., Hársing J., Németh K., Balogh P., Kárpáti S. (2017) Expression of G protein-coupled oestrogen receptor in melanoma and in pregnancy-associated melanoma. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **31**, 1453–1461.
- Faghfuri E., Nikfar S., Niaz K., Faramarzi M. A., Abdollahi M. (2018) Mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitors to treat melanoma alone or in combination with other kinase inhibitors. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **14**, 317–330.
- Fitzpatrick T. B., Breathnach A. S. (1963) [THE EPIDERMAL MELANIN UNIT SYSTEM]. *Dermatol. Wochenschr.* **147**, 481–489.
- Friedman R. J., Rigel D. S., Kopf A. W. (1985) Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA. Cancer J. Clin.* **35**, 130–151.
- Fu C., Chen J., Lu J., Yi L., Tong X., Kang L., Pei S., Ouyang Y., Jiang L., Ding Y., Zhao X., Li S., Yang Y., Huang J., Zeng Q. (2020) Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). *Mol. Med. Rep.* **21**, 1421–1430.
- Fuse N., Yasumoto K. I., Suzuki H., Takahashi K., Shibahara S. (1996) Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 702–707.
- Gaitán-Salvatella I., López-Villegas E. O., González-Alva P., Susate-Olmos F., Álvarez-Pérez M. A. (2021) Case Report: Formation of 3D Osteoblast Spheroid Under Magnetic Levitation for Bone Tissue Engineering. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 1–10.
- Gandalovičová A., Rosel D., Fernandes M., Veselý P., Heneberg P., Čermák V., Petruželka L., Kumar S., Sanz-Moreno V., Brábek J. (2017) Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends in Cancer* **3**, 391–406.
- Gandini S., Sera F., Cattaruzza M. S., Pasquini P., Picconi O., Boyle P., Melchi C. F. (2005) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur. J. Cancer* **41**, 45–60.
- Gershenwald J. E., Scolyer R. A., Hess K. R., Sondak V. K., Long G. V., Ross M. I., Lazar A. J., Faries M. B., Kirkwood J. M., McArthur G. A., Haydu L. E., Eggermont A. M. M., Flaherty K. T., Balch C. M., Thompson J. F. (2017) Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 472–492.

- Gogas H. J., Kirkwood J. M., Sondak V. K. (2007) Chemotherapy for metastatic melanoma: Time for a change? *Cancer* **109**, 455–464.
- Gupta A., Gomes F., Lorigan P. (2017) The role for chemotherapy in the modern management of melanoma. *Melanoma Manag.* **4**, 125–136.
- Gupta P., Kar S., Kumar A., Tseng F. G., Pradhan S., Mahapatra P. S., Santra T. S. (2021) Pulsed laser assisted high-Throughput intracellular delivery in hanging drop based three dimensional cancer spheroids. *Analyst* **146**, 4756–4766.
- Guyonneau L., Murisier F., Rossier A., Moulin A., Beermann F. (2004) Melanocytes and Pigmentation Are Affected in Dopachrome Tautomerase Knockout Mice. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3396–3403.
- Hamburger V., Hamilton H. L. (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.* **195**, 231–272.
- Harlin H., Meng Y., Peterson A. C., Zha Y., Tretiakova M., Slingluff C., McKee M., Gajewski T. F. (2009) Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8+ T-Cell Recruitment. *Cancer Res.* **69**, 3077–3085.
- Hasney C., Butcher R. B., Amedee R. G. (2008) Malignant melanoma of the head and neck: A brief review of pathophysiology, current staging, and management. *Ochsner J.* **8**, 181–185.
- Hawkes J. E., Truong A., Meyer L. J. (2016) Genetic predisposition to melanoma. *Semin. Oncol.* **43**, 591–597.
- Hayflick L., Moorhead P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621.
- Hearing V. J., Jiménez M. (1987) Mammalian tyrosinase-The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **19**, 1141–1147.
- Heinzelmann-Schwarz V. A., Nixdorf S., Valadan M., Diczbalis M., Olivier J., Otton G., Fedier A., Hacker N. F., Scurry J. P. (2014) A clinicopathological review of 33 patients with vulvar melanoma identifies c-KIT as a prognostic marker. *Int. J. Mol. Med.* **33**, 784–794.
- Hellström A. R., Watt B., Fard S. S., Tenza D., Mannström P., Narfström K., Ekestén B., Ito S., Wakamatsu K., Larsson J., Ulfendahl M., Kullander K., Raposo G., Kerje S., Hallböök F., Marks M. S., Andersson L. (2011) Inactivation of Pmel Alters Melanosome Shape But Has Only a Subtle Effect on Visible Pigmentation. *PLoS Genet.* **7**, e1002285.
- Henning A. L., Jiang M. X., Yalcin H. C., Butcher J. T. (2011) Quantitative three-dimensional imaging of live avian embryonic morphogenesis via micro-computed tomography. *Dev. Dyn.* **240**, 1949–1957.
- Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C., West J., Mueller-Klieser W., Kunz-Schughart L. A. (2010) Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15.
- Hoashi T., Tamaki K., Hearing V. J. (2010) The secreted form of a melanocyte membrane-bound glycoprotein (Pmel17/gp100) is released by ectodomain shedding. *FASEB J.* **24**, 916–930.
- Horak V., Palanova A., Cizkova J., Miltrova V., Vodicka P., Kupcova Skalnikova H. (2019) Melanoma-Bearing Libechov Minipig (MeLiM): The Unique Swine Model of Hereditary Metastatic Melanoma. *Genes (Basel).* **10**, 915.
- Hornebeck W. (2003) Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol. Biol.* **51**, 569–573.
- Hossain M. R., Ansary T. M., Komine M., Ohtsuki M. (2021) Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation. *Int. J. Mol. Sci.* **22**.

- Hu T., Hu J. (2019) Melanoma-derived exosomes induce reprogramming fibroblasts into cancer-associated fibroblasts via Gm26809 delivery. *Cell Cycle* **18**, 3085–3094.
- Huang C., Lowerison M. R., Lucien F., Gong P., Wang D., Song P., Chen S. (2019) Noninvasive Contrast-Free 3D Evaluation of Tumor Angiogenesis with Ultrasensitive Ultrasound Microvessel Imaging. *Sci. Rep.* **9**, 1–11.
- Huang X., Ding L., Bennewith K. L., Tong R. T., Welford S. M., Ang K. K., Story M., Le Q.-T., Giaccia A. J. (2009) Hypoxia-Inducible mir-210 Regulates Normoxic Gene Expression Involved in Tumor Initiation. *Mol. Cell* **35**, 856–867.
- Hurley J. H. (2010) The ESCRT complexes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 463–487.
- Hurley J. H., Hanson P. I. (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 556–566.
- Imokawa G. (2019) Melanocyte activation mechanisms and rational therapeutic treatments of solar lentigos. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3666.
- Ioannidi L., Seliniotakis K., Bontzos G., Sourvinos G., Haniotis V., Tsiapa I., Maris T. G., Detorakis E. T. (2018) Surface-Coil MRI for Small Peripheral Choroidal Melanoma: Imaging in a Rabbit Eye Model. *Ocul. Oncol. Pathol.* **4**, 364–369.
- Iznardo H., Garcia-Melendo C., Yélamos O. (2020) Lentigo maligna: Clinical presentation and appropriate management. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **13**, 837–855.
- Javeed N., Mukhopadhyay D. (2017) Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: A comprehensive review. *J. Biomed. Res.* **31**, 386–394.
- Jimenez R. E., Wallis T., Visscher D. W. (2001) Centrally necrotizing carcinomas of the breast : A distinct histologic subtype with aggressive clinical behavior. *Am. J. Surg. Pathol.* **25**, 331–337.
- Jobe N. P., Živicová V., Miřková A., Rösel D., Dvořánková B., Kodet O., Strnad H., Kolář M., Šedo A., Smetana K., Strnadová K., Brábek J., Lacina L. (2018) Fibroblasts potentiate melanoma cells in vitro invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. *Histochem. Cell Biol.* **149**, 503–516.
- Joshi S. S., Tandukar B., Pan L., Huang J. M., Livak F., Smith B. J., Hodges T., Mahurkar A. A., Hornyak T. J. (2019) CD34 defines melanocyte stem cell subpopulations with distinct regenerative properties. *PLoS Genet.* **15**, 1–25.
- Justus C. R., Leffler N., Ruiz-Echevarria M., Yang L. V. (2014) In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J. Vis. Exp.* **88**, 1–8.
- Kahlert C., Kalluri R. (2013) Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med.* **91**, 431–437.
- Kalluri R., LeBleu V. S. (2020) The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science.* **367**.
- Karagas M. R., Zens M. S., Nelson H. H., Mabuchi K., Perry A. E., Stukel T. A., Mott L. A., Andrew A. S., Applebaum K. M., Linet M. (2007) Measures of cumulative exposure from a standardized sun exposure history questionnaire: A comparison with histologic assessment of solar skin damage. *Am. J. Epidemiol.* **165**, 719–726.
- Kawai T., Akira S. (2011) Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **34**, 637–650.
- Kennedy D. C., Coen B., Wheatley A. M., McCullagh K. J. A. (2021) Microvascular Experimentation in the Chick Chorioallantoic Membrane as a Model for Screening Angiogenic Agents including from Gene-Modified Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 452.
- Kersten K., Visser K. E., Miltenburg M. H., Jonkers J. (2017) Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol. Med.* **9**, 137–153.
- Keung E. Z., Gershenwald J. E. (2018) The eighth edition American Joint Committee on

- Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **18**, 775–784.
- Khair D. O., Bax H. J., Mele S., Crescioli S., Pellizzari G., Khiabany A., Nakamura M., Harris R. J., French E., Hoffmann R. M., Williams I. P., Cheung A., Thair B., Beales C. T., Touizer E., Signell A. W., Tasnova N. L., Spicer J. F., Josephs D. H., Geh J. L., Ross A. M. K., Healy C., Papa S., Lacy K. E., Karagiannis S. N. (2019) Combining immune checkpoint inhibitors: Established and emerging targets and strategies to improve outcomes in melanoma. *Front. Immunol.* **10**, 1–20.
- Kim H., Kim M., Im S.-K., Fang S. (2018) Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab. Anim. Res.* **34**, 147.
- Kim J. S., Min J., Recknagel A. K., Riccio M., Butcher J. T. (2011) Quantitative Three-Dimensional Analysis of Embryonic Chick Morphogenesis Via Microcomputed Tomography. *Anat. Rec.* **294**, spc1–spc1.
- Kleinman H. K., McGarvey M. L., Liotta L. A., Robey P. G., Tryggvason K., Martin G. R. (1982) Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188–6193.
- Klingenberg M., Becker J., Eberth S., Kube D., Wilting J. (2014) The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC Cancer* **14**, 339.
- Kodet O., Kučera J., Strnadová K., Dvořánková B., Štork J., Lacina L., Smetana K. (2020) Cutaneous melanoma dissemination is dependent on the malignant cell properties and factors of intercellular crosstalk in the cancer microenvironment (Review). *Int J Oncol* **57**, 619–630.
- Kotze L. A., Beltran C. G. G., Lang D., Loxton A. G., Cooper S., Meiring M., Koegelenberg C. F. N., Allwood B. W., Malherbe S. T., Hiemstra A. M., Glanzmann B., Kinnear C., Walzl G., Plessis N. du (2021) Establishment of a Patient-Derived, Magnetic Levitation-Based, Three-Dimensional Spheroid Granuloma Model for Human Tuberculosis. *mSphere* **6**, 1–21.
- Krajsová I. (2015) Imunoterapie metastazujícího melanomu. *Onkologie* **9**, 183–187.
- Krajsová I. (2018) Diagnostika melanomu a současná doporučení pro léčbu a sledování. *Čes-slov Derm* **1**, 4–16.
- Kučera J., Strnadová K., Dvořánková B., Lacina L., Krajsová I., Štork J., Kovářová H., Skalníková H. K., Vodička P., Motlík J., Dundr P., Smetana K., Kodet O. (2019) Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncol. Rep.* **42**, 1793–1804.
- Kue C. S., Tan K. Y., Lam M. L., Lee H. B. (2014) Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): An alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Exp. Anim.* **64**, 129–138.
- Lacina L., Kodet O., Dvořánková B., Szabo P., Smetana K. (2018) Ecology of melanoma cell. *Histol. Histopathol.* **33**, 247–254.
- Lacina L., Plzak J., Kodet O., Szabo P., Chovanec M., Dvorankova B., Smetana K. (2015) Cancer microenvironment: What can we learn from the stem cell niche. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 24094–24110.
- Lacina L., Smetana K., Dvořánková B., Pytlík R., Kideryová L., Kučerová L., Plzánková Z., Štork J., Gabius H. J., André S. (2007) Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **156**, 819–829.
- Lago J. C., Puzzi M. B. (2019) The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PLoS One* **14**, 1–14.
- Larkin J., Ascierto P. A., Dréno B., Atkinson V., Liskay G., Maio M., Mandalà M.,

- Demidov L., Stroyakovskiy D., Thomas L., la Cruz-Merino L. de, Dutriaux C., Garbe C., Sovak M. A., Chang I., Choong N., Hack S. P., McArthur G. A., Ribas A. (2014) Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutated Melanoma . *N. Engl. J. Med.* **371**, 1867–1876.
- Larkin J., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Jacques Grob J., Lao C. D., Schadendorf D., Dummer R., Smylie M., Rutkowski P., Francesco Ferrucci P., Hill A., Wagstaff J., Carlino M. S., Wolchok J. D., Hodi S., Jdw D. (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Previously Untreated Melanoma Corresponding authors. *N Engl J Med* **373**, 23–34.
- Legha S. S., Ring S., Papadopoulos N., Plager C., Chawla S., Benjamin R. (1989) A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer* **64**, 2024–2029.
- Leonardi G. C., Falzone L., Salemi R., Zanghì A., Spandidos D. A., Mccubrey J. A., Candido S., Libra M. (2018) Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int. J. Oncol.* **52**, 1071–1080.
- Li N., Fukunaga-Kalabis M., Yu H., Xu X., Kong J., Lee J. T., Herlyn M. (2010) Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *J. Cell Sci.* **123**, 853–860.
- Li S., Bai S., Qin X., Zhang J., Irwin D. M., Zhang S., Wang Z. (2019) Comparison of whole embryonic development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the chicken (*Gallus gallus*). *Poult. Sci.* **98**, 3278–3291.
- Li Y., Zhao L., Li X. F. (2021) Hypoxia and the Tumor Microenvironment. *Technol. Cancer Res. Treat.* **20**, 1–9.
- Liu S., Kumar S. M., Lu H., Liu A., Yang R., Pushparajan A., Guo W., Xu X. (2012) MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF-κB1-Snail1 pathway in melanoma. *J. Pathol.* **226**, 61–72.
- Lu C. Y., Lee H. C., Fahn H. J., Wei Y. H. (1999) Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **423**, 11–21.
- Luan W., Ding Y., Xi H., Ruan H., Lu F., Ma S., Wang J. (2021) Exosomal miR-106b-5p derived from melanoma cell promotes primary melanocytes epithelial-mesenchymal transition through targeting EphA4. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **40**, 1–15.
- Ma Y., Yoo J. (2021) History of sunscreen: An updated view. *J. Cosmet. Dermatol.* **20**, 1044–1049.
- Mak S. S., Moriyama M., Nishioka E., Osawa M., Nishikawa S. I. (2006) Indispensable role of Bcl2 in the development of the melanocyte stem cell. *Dev. Biol.* **291**, 144–153.
- Mantovani A., Barajon I., Garlanda C. (2018) IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol. Rev.* **281**, 57–61.
- Marks R. (2000) Epidemiology of melanoma. *Clin. Exp. Dermatol.* **25**, 459–463.
- Masterpol K. S., Primiani A., Duncan L. M. (2013) Benign Melanocytic Proliferations with Pagetoid Spread BT - Atlas of Essential Dermatopathology, eds. Masterpol K. S., Primiani A., Duncan L. M., pp. 98–99, Springer London, London.
- Mattei F., Schiavoni G., Ninno A. De, Lucarini V., Sestili P., Sestigi A., Fragale A., Sanchez M., Spada M., Gerardino A., Belardelli F., Businaro L., Gabriele L. (2014) A multidisciplinary study using in vivo tumor models and microfluidic cell-on-chip approach to explore the cross-talk between cancer and immune cells. *J. Immunotoxicol.* **11**, 337–346.
- McCune J., Namikawa R., Kaneshima H., Shultz L., Lieberman M., Weissman I. (1988)

- The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* (80-. ). **241**, 1632–1639.
- Mehling M., Tay S. (2014) Microfluidic cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **25**, 95–102.
- Mestas J., Hughes C. C. W. (2004) Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738.
- Mittal M., Siddiqui M. R., Tran K., Reddy S. P., Malik A. B. (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants Redox Signal.* **20**, 1126–1167.
- Moor L. De, Fernandez S., Verduyck C., Tytgat L., Asadian M., Geyter N. De, Vlierberghe S. Van, Dubruel P., Declercq H. (2020) Hybrid Bioprinting of Chondrogenically Induced Human Mesenchymal Stem Cell Spheroids. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1–20.
- Mort R. L., Jackson I. J., Patton E. E. (2015) The melanocyte lineage in development and disease. *Development* **142**, 620–632.
- Morton J. J., Bird G., Refaeli Y., Jimeno A. (2016) Humanized Mouse Xenograft Models: Narrowing the Tumor–Microenvironment Gap. *Cancer Res.* **76**, 6153–6158.
- Mostafa W. Z., Hegazy R. A. (2013) Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J. Adv. Res.* **6**, 793–804.
- Muñoz-Espín D., Serrano M. (2014) Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496.
- Narita M., Lowe S. W. (2005) Senescence comes of age. *Nat. Med.* **11**, 920–922.
- Natale C. A., Li J., Zhang J., Dahal A., Dentchev T., Stanger B. Z., Ridky T. W. (2018) Activation of G protein-coupled estrogen receptor signaling inhibits melanoma and improves response to immune checkpoint blockade. *Elife* **7**, 1–19.
- Nath A., Chattopadhyaya S., Chattopadhyay U., Sharma N. K. (2006) Macrophage inflammatory protein (MIP)1 $\alpha$  and MIP1 $\beta$  differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 1534–1541.
- Nguyen N. T., Fisher D. E. (2019) MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res.* **32**, 224–236.
- Niel G. Van, D’Angelo G., Raposo G. (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228.
- Nordlund J. J. (2007) The Melanocyte and the Epidermal Melanin Unit: An Expanded Concept. *Dermatol. Clin.* **25**, 271–281.
- Novotný J., Strnadová K., Dvořánková B., Kocourková Š., Jakša R., Dundr P., Pačes V., Smetana K., Kolář M., Lacina L. (2020) Single-cell RNA sequencing unravels heterogeneity of the stromal niche in cutaneous melanoma heterogeneous spheroids. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–22.
- Nowak-Sliwinska P., Segura T., Iruela-Arispe M. L. (2014) The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* **17**, 779–804.
- Oh J. W., Hsi T.-C., Guerrero-Juarez C. F., Ramos R., Plikus M. V. (2013) Organotypic Skin Culture. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1–4.
- Olson B., Li Y., Lin Y., Liu E. T., Patnaik A. (2018) Mouse models for cancer immunotherapy research. *Cancer Discov.* **8**, 1358–1365.
- Opferman J. T., Kothari A. (2018) Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.* **25**, 37–45.
- Ott P. A., Hodi F. S., Robert C. (2013) CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: New immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5300–5309.

- Paganelli A., Garbarino F., Toto P., Martino G. Di, D'Urbano M., Auriemma M., Giovanni P. Di, Panarese F., Staniscia T., Amerio P., Paganelli R. (2019) Serological landscape of cytokines in cutaneous melanoma. *Cancer Biomarkers* **26**, 333–342.
- Paraiso K. H. T., Xiang Y., Rebecca V. W., Abel E. V., Chen Y. A., Munko A. C., Wood E., Fedorenko I. V., Sondak V. K., Anderson A. R. A., Ribas A., Palma M. D., Nathanson K. L., Koomen J. M., Messina J. L., Smalley K. S. M. (2011) PTEN Loss Confers BRAF Inhibitor Resistance to Melanoma Cells through the Suppression of BIM Expression. *Cancer Res.* **71**, 2750–2760.
- Pardoll D. M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264.
- Park H. Y., Kosmadaki M., Yaar M., Gilchrest B. A. (2009) Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1493–1506.
- Pascale R. M., Calvisi D. F., Simile M. M., Feo C. F., Feo F. (2020) The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery. *Cancers (Basel)*. **12**, 2819.
- Passeron T., Coelho S. G., Miyamura Y., Takahashi K., Hearing V. J. (2007) Immunohistochemistry and in situ hybridization in the study of human skin melanocytes. *Exp. Dermatol.* **16**, 162–170.
- Peinado H., Alečković M., Lavotshkin S., Matei I., Costa-Silva B., Moreno-Bueno G., Hergueta-Redondo M., Williams C., García-Santos G., Ghajar C. M., Nitadori-Hoshino A., Hoffman C., Badal K., Garcia B. A., Callahan M. K., Yuan J., Martins V. R., Skog J., Kaplan R. N., Brady M. S., Wolchok J. D., Chapman P. B., Kang Y., Bromberg J., Lyden D. (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–891.
- Pham D. M., Guhan S., Tsao H. (2020) Kit and melanoma: Biological insights and clinical implications. *Yonsei Med. J.* **61**, 562–571.
- Phelan M. A., Gianforcaro A. L., Gerstenhaber J. A., Lelkes P. I. (2019) An Air Bubble-Isolating Rotating Wall Vessel Bioreactor for Improved Spheroid/Organoid Formation. *Tissue Eng. - Part C Methods* **25**, 479–488.
- Pho L., Grossman D., Leachman S. A. (2006) Melanoma genetics: A review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* **18**, 173–179.
- Pickar J. H., Komm B. S. (2015) Selective estrogen receptor modulators and the combination therapy conjugated estrogens/bazedoxifene: A review of effects on the breast. *Post Reprod. Heal.* **21**, 112–121.
- Pillai S., Oresajo C., Hayward J. (2005) Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - A review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**, 17–34.
- Pinto M. T., Ribeiro A. S., Conde I., Carvalho R., Paredes J. (2021) The chick chorioallantoic membrane model: A new in vivo tool to evaluate breast cancer stem cell activity. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–15.
- Poh A. R., O'Donoghue R. J. J., Ernst M., Putoczki T. L. (2016) Mouse models for gastric cancer: Matching models to biological questions. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **31**, 1257–1272.
- Qiu W., Chuong C., Lei M. (2019) Regulation of melanocyte stem cells in the pigmentation of skin and its appendages: Biological patterning and therapeutic potentials. *Exp. Dermatol.* **28**, 395–405.
- Quan T., Qin Z., Xia W., Shao Y., Voorhees J. J., Fisher G. J. (2009) Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **14**, 20–24.



- Quevedo W. C. (1972) Epidermal melanin units melanocyte-keratinocyte interactions. *Integr. Comp. Biol.* **12**, 35–41.
- Qureshi O. S., Zheng Y., Nakamura K., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E. M., Baker J., Jeffery L. E., Kaur S., Briggs Z., Hou T. Z., Futter C. E., Anderson G., Walker L. S. K., Sansom D. M. (2011) Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science (80-. )*. **332**, 600–603.
- Rabbie R., Ferguson P., Molina-Aguilar C., Adams D. J., Robles-Espinoza C. D. (2019) Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J. Pathol.* **247**, 539–551.
- Raghavan S., Ward M. R., Rowley K. R., Wold R. M., Takayama S., Buckanovich R. J., Mehta G. (2015) Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. *Gynecol. Oncol.* **138**, 181–189.
- Raimondi S., Suppa M., Gandini S. (2020) Melanoma epidemiology and sun exposure. *Acta Derm. Venereol.* **100**, 250–258.
- Rang Z., Yang G., Wang Y. W., Cui F. (2016) MIR-542-3p suppresses invasion and metastasis by targeting the proto-oncogene serine/threonine protein kinase, PIM1, in melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **474**, 315–320.
- Raposo G., Marks M. S. (2007) Melanosomes — dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 786–797.
- Raposo G., Tenza D., Murphy D. M., Berson J. F., Marks M. S. (2001) Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J. Cell Biol.* **152**, 809–823.
- Rebecca V. W., Somasundaram R., Herlyn M. (2020) Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. *Nat. Commun.* **11**, 1–9.
- Redondo-Castro E., Cunningham C., Cain S., Allan S., Pinteaux E., Miller J. (2018) Generation of Human Mesenchymal Stem Cell 3D Spheroids Using Low-binding Plates. *Bio-Protocol* **8**, 1–10.
- Rheinwald J. G., Green H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331–343.
- Ribas A., Daud A., Pavlick A. C., Gonzalez R., Lewis K. D., Hamid O., Gajewski T. F., Puzanov I., Wongchenko M., Rooney I., Hsu J. J., Yan Y., Park E., McArthur G. A. (2020) Extended 5-Year Follow-up Results of a Phase Ib Study (BRIM7) of Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutant Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **26**, 46–53.
- Ribas A., Gonzalez R., Pavlick A., Hamid O., Gajewski T. F., Daud A., Flaherty L., Logan T., Chmielowski B., Lewis K., Kee D., Boasberg P., Yin M., Chan I., Musib L., Choong N., Puzanov I., McArthur G. A. (2014) Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAFV600-mutated melanoma: A phase 1b study. *Lancet Oncol.* **15**, 954–965.
- Ribatti D. (2008) The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **49**, 131–135.
- Ribatti D. (2016) The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech. Dev.* **141**, 70–77.
- Ribatti D., Nico B., Vacca A., Roncali L., Presta M. (1999) Endogenous and exogenous fibroblast growth factor-2 modulate wound healing in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis* **3**, 89–95.
- Riffle S., Hegde R. S. (2017) Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 1–10.

- Rittié L., Fisher G. J. (2015) Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, 1–14.
- Robert C., Thomas L., Bondarenko I., O’Day S., Weber J., Garbe C., Lebbe C., Baurain J.-F., Testori A., Grob J.-J., Davidson N., Richards J., Maio M., Hauschild A., Miller W. H., Gascon P., Lotem M., Harmankaya K., Ibrahim R., Francis S., Chen T.-T., Humphrey R., Hoos A., Wolchok J. D. (2011) Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2517–2526.
- Robert L., Labat-Robert J., Robert A. M. (2009) Physiology of skin aging. *Pathol. Biol.* **57**, 336–341.
- Roger M., Fullard N., Costello L., Bradbury S., Markiewicz E., O’Reilly S., Darling N., Ritchie P., Määttä A., Karakesisoglou I., Nelson G., Zglinicki T. von, Dicolandrea T., Isfort R., Bascom C., Przyborski S. (2019) Bioengineering the microanatomy of human skin. *J. Anat.* **234**, 438–455.
- Rosenberg S. A., Yang J. C., White D. E., Steinberg S. M. (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: Identification of the antigens mediating response. *Ann. Surg.* **228**, 307–319.
- Rudrapatna V. A., Cagan R. L., Das T. K. (2012) Drosophila cancer models. *Dev. Dyn.* **241**, 107–118.
- Ryu N. E., Lee S. H., Park H. (2019) Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells* **8**, 1–13.
- Sadler T. W. (2011) *Langmanova lékařská embryologie = [Orig.: Langman’s medical embryology]*, (ed. Brabec J.). Grada, Praha.
- Sample A., He Y.-Y. (2018) Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **34**, 13–24.
- Schartl M., Larue L., Goda M., Bosenberg M. W., Hashimoto H., Kelsh R. N. (2016) What is a vertebrate pigment cell? *Pigment Cell Melanoma Res.* **29**, 8–14.
- Schmid Y. R. F., Bürgel S. C., Misun P. M., Hierlemann A., Frey O. (2016) Electrical Impedance Spectroscopy for Microtissue Spheroid Analysis in Hanging-Drop Networks. *ACS Sensors* **1**, 1028–1035.
- Schmidt A. N., Nanney L. B., Boyd A. S., King L. E., Ellis D. L. (2006) Oestrogen receptor- $\beta$  expression in melanocytic lesions. *Exp. Dermatol.* **15**, 971–980.
- Schmidt S. K., Schmid R., Arkudas A., Kengelbach-Weigand A., Bosserhoff A. K. (2019) Tumor Cells Develop Defined Cellular Phenotypes After 3D-Bioprinting in Different Bioinks. *Cells* **8**, 1295.
- Schmidt L. B., Liu M., Scanlon C. S., Banerjee R., D’Silva N. J. (2019) The Chick Chorioallantoic Membrane In Vivo Model to Assess Perineural Invasion in Head and Neck Cancer. *J. Vis. Exp.* **176**, 139–148.
- Schneider H., Downey J., Smith A., Zinselmeyer B. H., Rush C., Brewer J. M., Wei B., Hogg N., Garside P., Rudd C. E. (2006) Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4. *Science (80- )*. **313**, 1972–1975.
- Schwartz E. L. (2009) Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2594–2601.
- Scott A., Khan K. M., Cook J. L., Duronio V. (2004) What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? *Br. J. Sports Med.* **38**, 248–249.
- Seiberg M. (2001) Keratinocyte-Melanocyte Interactions During Melanosome Transfer. *Pigment Cell Res.* **14**, 236–242.
- Sharma P., Diergaarde B., Ferrone S., Kirkwood J. M., Whiteside T. L. (2020) Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci. Rep.* **10**, 1–11.
- Sharrow A. C., Ishihara M., Hu J., Kim I. H., Wu L. (2020) Using the Chicken

- Chorioallantoic Membrane In Vivo Model to Study Gynecological and Urological Cancers. *J. Vis. Exp.* **176**, 139–148.
- Shrestha P., Muramatsu Y., Kudeken W., Mori M., Takai Y., Ilg E. C., Schafer B. W., Heizmann C. W. (1998) Localization of Ca<sup>2+</sup>-binding S100 proteins in epithelial tumours of the skin. *Virchows Arch.* **432**, 53–59.
- Shu S. La, Matsuzaki J., Want M. Y., Conway A., Benjamin-Davalos S., Allen C. L., Koroleva M., Battaglia S., Odunsi A., Minderman H., Ernstoff M. S. (2020) An Immunosuppressive Effect of Melanoma-derived Exosomes on NY-ESO-1 Antigen-specific Human CD8 + T Cells is Dependent on IL-10 and Independent of BRAF V600E Mutation in Melanoma Cell Lines. *Immunol. Invest.* **49**, 744–757.
- Shu S. La, Yang Y., Allen C. L., Maguire O., Minderman H., Sen A., Ciesielski M. J., Collins K. A., Bush P. J., Singh P., Wang X., Morgan M., Qu J., Bankert R. B., Whiteside T. L., Wu Y., Ernstoff M. S. (2018) Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts by melanoma exosome microRNA favours a pre-metastatic microenvironment. *Sci. Rep.* **8**, 1–14.
- Silver D. L., Pavan W. J. (2006) The origin and development of neural crest-derived melanocytes. *From Melanocytes to Melanoma Progress. to Malig.*, 3–26.
- Slominski A., Tobin D. J., Shibahara S., Wortsman J. (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **84**, 1155–1228.
- Smalley K. S. (2018) Why do women with melanoma do better than men? *Elife* **7**, 1–3.
- Smetana K., Brábek J. (2020) Role of Interleukin-6 in Lung Complications in Patients With COVID-19: Therapeutic Implications. *In Vivo (Brooklyn)*. **34**, 1589–1592.
- Smetana K., Rösel D., Brábek J. (2020) Raloxifene and Bazedoxifene Could Be Promising Candidates for Preventing the COVID-19 Related Cytokine Storm, ARDS and Mortality. *In Vivo (Brooklyn)*. **34**, 3027–3028.
- Sobhani N., Tardiel-Cyril D. R., Davtyan A., Generali D., Roudi R., Li Y. (2021) CTLA-4 in regulatory T cells for cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–18.
- Špaková I., Rabajdová M., Mičková H., Graier W. F., Mareková M. (2021) Effect of hypoxia factors gene silencing on ROS production and metabolic status of A375 malignant melanoma cells. *Sci. Rep.* **11**, 1–14.
- Stoddart M., Richards R., Alini M. (2012) In vitro experiments with primary mammalian cells: To Pool or not to Pool? *Eur. Cells Mater.* **24**, i–ii.
- Štork J., Arenberger P., Pizinger K., Semrádová V., Vosmík F. (2013) *Dermatovenerologie*. Galén, Praha.
- Strnadová K., Pfeiferová L., Příkryl P., Dvořánková B., Vlčák E., Frýdlová J., Vokurka M., Novotný J., Šáchová J., Hradilová M., Brábek J., Šmigová J., Rösel D., Smetana K., Kolář M., Lacina L. (2022) Exosomes produced by melanoma cells significantly influence the biological properties of normal and cancer-associated fibroblasts. *Histochem. Cell Biol.* **157**, 153–172.
- Strnadova K., Sandera V., Dvorankova B., Kodet O., Duskova M., Smetana K., Lacina L. (2019) Skin aging: the dermal perspective. *Clin. Dermatol.* **37**.
- Strnadová K., Španko M., Dvořánková B., Lacina L., Kodet O., Shbat A., Klepáček I., Smetana K. (2020) Melanoma xenotransplant on the chicken chorioallantoic membrane: a complex biological model for the study of cancer cell behaviour. *Histochem. Cell Biol.* **154**, 177–188.
- Strojan P. (2010) Role of radiotherapy in melanoma management. *Radiol. Oncol.* **44**, 1–12.
- Sun Z., Ren Z., Yang K., Liu Z., Cao S., Deng S., Xu L., Liang Y., Guo J., Bian Y., Xu H., Shi J., Wang F., Fu Y.-X., Peng H. (2019) A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8+ T-cell response and effective

- tumor control. *Nat. Commun.* **10**, 3874.
- Swaminathan S., Clyne A. M. (2020) Direct Bioprinting of 3D Multicellular Breast Spheroids onto Endothelial Networks. *J. Vis. Exp.* **176**, 139–148.
- Swaminathan S., Hamid Q., Sun W., Clyne A. M. (2019) Bioprinting of 3D breast epithelial spheroids for human cancer models. *Biofabrication* **11**, 025003.
- Szadvari I., Krizanova O., Babula P. (2016) Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol. Res.* **65**, S441–S453.
- Takahashi A., Okada R., Nagao K., Kawamata Y., Hanyu A., Yoshimoto S., Takasugi M., Watanabe S., Kanemaki M. T., Obuse C., Hara E. (2017) Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat. Commun.* **8**, 15287.
- Tancini B., Buratta S., Sagini K., Costanzi E., Delo F., Urbanelli L., Emiliani C. (2019) Insight into the role of extracellular vesicles in lysosomal storage disorders. *Genes (Basel)*. **10**, 1–21.
- Tang T., Eldabaje R., Yang L. (2016) Current status of biological therapies for the treatment of metastatic melanoma. *Anticancer Res.* **36**, 3229–3241.
- Tassabehji M., Newton V. E., Read A. P. (1994) Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.* **8**, 251–255.
- Tobin D. J. (2017) Introduction to skin aging. *J. Tissue Viability* **26**, 37–46.
- Tomaszewska K., Kozłowska M., Kaszuba A., Lesiak A., Narbutt J., Zalewska-Janowska A. (2020) Increased Serum Levels of IFN-  $\gamma$  , IL-1  $\beta$  , and IL-6 in Patients with Alopecia Areata and Nonsegmental Vitiligo. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 1–5.
- Trotter M. J., Colwell R., Tron V. A. (2003) Thrombospondin-1 and cutaneous melanoma. *J. Cutan. Med. Surg.* **7**, 136–141.
- Urbanczyk M., Zbinden A., Layland S. L., Duffy G., Schenke-Layland K. (2020) Controlled heterotypic pseudo-islet assembly of human  $\beta$ -cells and human umbilical vein endothelial cells using magnetic levitation. *Tissue Eng. - Part A* **26**, 387–399.
- Vachtenheim J., Borovanský J. (2010) “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: Central role of MITF. *Exp. Dermatol.* **19**, 617–627.
- Vasile C., Pamfil D., Stoleru E., Baican M. (2020) New developments in medical applications of hybrid hydrogels containing natural polymers. *Molecules* **25**, 1539.
- Vaupel P., Multhoff G. (2021) Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J. Physiol.* **599**, 1745–1757.
- Velarde M. C., Flynn J. M., Day N. U., Melov S., Campisi J. (2012) Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany. NY)*. **4**, 3–12.
- Velotti F., Barchetta I., Cimini F. A., Cavallo M. G. (2020) Granzyme B in Inflammatory Diseases: Apoptosis, Inflammation, Extracellular Matrix Remodeling, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis. *Front. Immunol.* **11**, 1–9.
- Vicente R., Mausset-Bonnefont A. L., Jorgensen C., Louis-Pence P., Brondello J. M. (2016) Cellular senescence impact on immune cell fate and function. *Aging Cell* **15**, 400–406.
- Victorelli S., Lagnado A., Halim J., Moore W., Talbot D., Barrett K., Chapman J., Birch J., Ogrodnik M., Meves A., Pawlikowski J. S., Jurk D., Adams P. D., Heemst D., Beekman M., Slagboom P. E., Gunn D. A., Passos J. F. (2019) Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *EMBO J.* **38**, 1–18.
- Videira I. F. dos S., Moura D. F. L., Magina S. (2013) Mechanisms regulating melanogenesis\*. *An. Bras. Dermatol.* **88**, 76–83.
- Vignard V., Labbe M., Marec N., Andre-Gregoire G., Jouand N., Fonteneau J. F., Labarriere N., Fradin D. (2020) MicroRNAs in tumor exosomes drive immune

- escape in melanoma. *Cancer Immunol. Res.* **8**, 255–267.
- Vörsmann H., Groeber F., Walles H., Busch S., Beissert S., Walczak H., Kulms D. (2013) Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. *Cell Death Dis.* **4**, e719.
- Wang C., Wang Y., Chang X., Ba X., Hu N., Liu Q., Fang L., Wang Z. (2020) Melanoma-derived exosomes endow fibroblasts with an invasive potential via mir-21 target signaling pathway. *Cancer Manag. Res.* **12**, 12965–12974.
- Wang J. X., Fukunaga-Kalabis M., Herlyn M. (2016) Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *J. Cell Commun. Signal.* **10**, 191–196.
- Wang S., Zhou M., Lin F., Liu D., Hong W., Lu L., Zhu Y., Xu A. (2014) Interferon- $\gamma$  induces senescence in normal human melanocytes. *PLoS One* **9**, 1–9.
- Wang X., Montoyo-Pujol Y. G., Bermudez S., Corpas G., Martin A., Almazan F., Cabrera T., López-Nevot M. A. (2021) Serum Cytokine Profiles of Melanoma Patients and Their Association with Tumor Progression and Metastasis. *J. Oncol.* **2021**, 1–9.
- Ward W. H., Lambreton F., Goel N., Yu J. Q., Farma J. M. (2017) Clinical Presentation and Staging of Melanoma. In: *Cutan. Melanoma Etiol. Ther.*, eds. Ward W. H., Farma J. M., Vol. 6, pp. 79–89, Codon Publications.
- Wensveen F. M., Jelenčić V., Polić B. (2018) NKG2D: A master regulator of immune cell responsiveness. *Front. Immunol.* **9**.
- Weyden L. van der, Brenn T., Patton E. E., Wood G. A., Adams D. J. (2020) Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma. *J. Pathol.* **252**, 4–21.
- Whiteside T. L. (2016) Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. In: *Physiol. Behav.*, Vol. 176, pp. 103–141.
- Wicherska-pawłowska K., Wróbel T., Rybka J. (2021) Toll-like receptors (TLrs), nod-like receptors (nlrs) and rig-i-like receptors (rlrs) in innate immunity. tlrs, nlrs and rlrs ligands as immunotherapeutic agents for hematopoietic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 13397.
- Williams S. K., Touroo J. S., Church K. H., Hoying J. B. (2013) Encapsulation of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells in Alginate Hydrogel Spheroids Using a Direct-Write Three-Dimensional Printing System. *Biores. Open Access* **2**, 448–454.
- Wlaschek M., Maity P., Makrantonaki E., Scharffetter-Kochanek K. (2021) Connective Tissue and Fibroblast Senescence in Skin Aging. *J. Invest. Dermatol.* **141**, 985–992.
- Wu S., Chen H., Zuo L., Jiang H., Yan H. (2020) Suppression of long noncoding RNA MALAT1 inhibits the development of uveal melanoma via microRNA-608-mediated inhibition of HOXC4. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **318**, C903–C912.
- Wynn T. A. (2003) IL-13 effector functions. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 425–456.
- Xia J., Wang Y., Li F., Wang J., Mu Y., Mei X., Li X., Zhu W., Jin X., Yu K. (2016) Expression of microphthalmia transcription factor, s100 protein, and HMB-45 in malignant melanoma and pigmented nevi. *Biomed. Reports* **5**, 327–331.
- Xia Y., Zhou Y., Han H., Li P., Wei W., Lin N. (2019) lncRNA NEAT1 facilitates melanoma cell proliferation, migration, and invasion via regulating miR-495-3p and E2F3. *J. Cell. Physiol.* **234**, 19592–19601.
- Xiao D., Barry S., Kmetz D., Egger M., Pan J., Rai S. N., Qu J., McMasters K. M., Hao H. (2016) Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial–mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **376**, 318–327.
- Xie H., Appelt J. W., Jenkins R. W. (2021) Going with the flow: Modeling the tumor microenvironment using microfluidic technology. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–26.
- Yaar M., Gilchrist B. A. (2007) Photoageing: Mechanism, prevention and therapy. *Br. J.*

- Dermatol.* **157**, 874–887.
- Yadav A., Kumar B., Teknos T. N., Kumar P. (2017) Bazedoxifene enhances the anti-tumor effects of cisplatin and radiation treatment by blocking IL-6 signaling in head and neck cancer. *Oncotarget* **8**, 66912–66924.
- Yamaguchi Y., Brenner M., Hearing V. J. (2007) The regulation of skin pigmentation. *J. Biol. Chem.* **282**, 27557–27561.
- Yamaguchi Y., Hearing V. J., Maeda A., Morita A. (2010) NADPH:Quinone oxidoreductase-1 as a new regulatory enzyme that increases melanin synthesis. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 645–647.
- Yamamura K., Kamada S., Ito S., Nakagawa K., Ichihashi M., Tsujimoto Y. (1996) Accelerated disappearance of melanocytes in bcl-2-deficient mice. *Cancer Res.* **56**, 3546–3550.
- Yáñez-Mó M., Siljander P. R. M., Andreu Z., Zavec A. B., Borràs F. E., Buzas E. I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-Da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J. M., Ghobrial I. M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N. H. H., Hendrix A., Kierulf P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Krämer-Albers E. M., Laitinen S., Lässer C., Lener T., Ligeti E., Line A., Lipps G., Llorente A., Lötvall J., Manček-Keber M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Nolte-’t Hoen E. N. M., Nyman T. A., O’Driscoll L., Oliván M., Oliveira C., Pállinger É., Portillo H. A. Del, Reventós J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sánchez-Madrid F., Santarém N., Schallmoser K., Ostfeld M. S., Stoorvogel W., Stukelj R., Grein S. G. Van Der, Helena Vasconcelos M., Wauben M. H. M., Wever O. De (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 1–60.
- Yang K., Oak A. S. W., Slominski R. M., Brożyna A. A., Slominski A. T. (2020) Current molecular markers of melanoma and treatment targets. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3535.
- Yang X., Yan L., Ha D., Qu L., Liu L., Tao Y. (2018) Changes in sICAM-1 and GM-CSF levels in skin tissue fluid and expression of IL-6, IL-17 and TNF- $\alpha$  in blood of patients with vitiligo. *Exp. Ther. Med.* **17**, 408–412.
- Yardman-Frank J. M., Fisher D. E. (2021) Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells. *Exp. Dermatol.* **30**, 560–571.
- Yoo J. H., Brady S. W., Acosta-Alvarez L., Rogers A., Peng J., Sorensen L. K., Wolff R. K., Mleynek T., Shin D., Rich C. P., Kircher D. A., Bild A., Odelberg S. J., Li D. Y., Holmen S. L., Grossmann A. H. (2019) The Small GTPase ARF6 Activates PI3K in Melanoma to Induce a Prometastatic State. *Cancer Res.* **79**, 2892–2908.
- Yoshida H., Grimm T., Nishimura E. K., Nishioka E., Nishikawa S.-I., Kunisada T. (2001) Review: Melanocyte Migration and Survival Controlled by SCF/c-kit Expression. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **6**, 1–5.
- Zaballos M. A., Santisteban P. (2017) Key signaling pathways in thyroid cancer. *J. Endocrinol.* **235**, R43–R61.
- Zatloukalová P., Pjechová M., Babčanová S., Hupp T. R., Vojtěšek B. (2016) The Role of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Antitumor Immune Response. *Klin. Onkol.* **29**, 4S72-4S77.
- Zecca L., Tampellini D., Gerlach M., Riederer P., Fariello R. G., Sulzer D. (2001) Substantia nigra neuromelanin: Structure, synthesis, and molecular behaviour. *J. Clin. Pathol. - Mol. Pathol.* **54**, 414–418.
- Zhang X. T., Wei K. J., Chen Y. Y., Shi Z. C., Liu L. K., Li J., Zhang G. R., Ji W. (2018) Molecular cloning and expression analysis of tyr and tyrp1 genes in normal and albino yellow catfish *Tachysurus fulvidraco*. *J. Fish Biol.* **92**, 979–998.
- Zhao L., Xiu J., Liu Y., Zhang T., Pan W., Zheng X., Zhang X. (2019) A 3D Printed

- Hanging Drop Dropper for Tumor Spheroids Analysis Without Recovery. *Sci. Rep.* **9**, 1–14.
- Zhou X., Yan T., Huang C., Xu Z., Wang L., Jiang E., Wang H., Chen Y., Liu K., Shao Z., Shang Z. (2018) Melanoma cell-secreted exosomal miR-155-5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 1–15.
- Zhuang P., Chiang Y. H., Fernanda M. S., He M. (2021) Using Spheroids as Building Blocks Towards 3D Bioprinting of Tumor Microenvironment. *Int. J. Bioprinting* **7**, 1–26.
- Zulkiflee I., Fauzi M. B. (2021) Gelatin-polyvinyl alcohol film for tissue engineering: A concise review. *Biomedicines* **9**, 979.

### **Webové odkazy:**

- *Internetová jazyková příručka* [online] (2008–2021). Praha: Ústav pro jazyk český AV ČR, [cit. 1. 4. 2022]. Dostupné z: <https://prirucka.ujc.cas.cz/>
- *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online] (2018). Národní zdravotnický informační systém (NZIS), [cit. 9. 1. 2022]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018>
- *Ending the use of animals in research and testing* [online] (2021). European Parliament [cit. 12. 3. 2022]. Dostupné z: <https://www.europarl.europa.eu/news/en/agenda/briefing/2021-09-13/7/ending-the-use-of-animals-in-research-and-testing>
- *U.S. EPA to eliminate all mammal testing by 2035* [online] (2019). Science [cit. 12. 3. 2022]. Dostupné z: <https://www.science.org/content/article/us-epa-eliminate-all-mammal-testing-2035>
- *Memorandum. Directive to Prioritize Efforts to Reduce Animal Testing* [online] (2019). United States Environmental Protection Agency [cit. 12. 3. 2022]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-09/documents/image2019-09-09-231249.pdf>
- *Working to reduce the use of animals in scientific research. Delivery report* [online] (2015). [cit. 12. 3. 2022]. Dostupné z: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/417441/Delivery\\_Report\\_2015.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/417441/Delivery_Report_2015.pdf)

## **11 Soubor publikovaných prací autorky**