



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

**POUŽITÍ VÍCEKANÁLOVÉ
PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V
BIOMEDICÍNĚ A EXPERIMENTÁLNÍ
BIOLOGII**

Mgr. Linda Kideryová

Praha 2009

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Milan Elleder,
DrSc.

Školící pracoviště: 1. interní klinika VFN

Autor: Mgr. Linda Kideryová

Školitel: Prof. MUDr. Karel Smetana Jr. DrSc.,
Anatomický ústav 1. LF UK

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde
.....

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

1. SOUHRN	4
2. SUMMARY	5
3. ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	6
4. MATERIÁL A METODY	8
4.1 Průtoková cytometrie	8
4.1.1 Analýza stromálních fibroblastů metodou průtokové cytometrie.....	8
4.1.2 Zavedení stanovení CEC a EPC metodou průtokové cytometrie.....	9
4.2 Imunocytochemie	12
4.3 Buněčné kultury	14
4.3.1 Kultury stromálních fibroblastů a keratinocytů	14
4.3.2 Kultivace CFU-En a endotelových buněk.....	14
4.4 Pacienti trpící nádorovými onemocněními či poruchami mikrocirkulace.....	16
4.5 Statistické metody	17
5. DISKUZE VÝSLEDKŮ PRÁCE	18
5.1 Nádorové stroma jako niche moderující rozvoj tumoru	18
5.2 Metody a význam detekce cirkulujících endotelových buněk v diagnostice a predikci systémových onemocnění	20
6. ZÁVĚRY.....	24
7. PUBLIKOVANÉ PRÁCE AUTORKY SE VZTAHEM K DIZERTACI	25
8. PUBLIKOVANÉ PRÁCE AUTORKY BEZ VZTAHU K DIZERTACI	26
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	27

1. SOUHRN

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda umožňující kvantitativně i kvalitativně analyzovat velké množství buněk v suspenzi. Zprostředkovává informaci o jejich velikosti a granularitě, identifikuje buňky pomocí fluorescenčně značených protilátek specifických pro jejich povrchové i vnitrobuněčné receptory. Tento projekt byl zaměřen na buněčné populace, jejichž analýza je komplikována nejasným imunofenotypem či extrémně malým zastoupením ve zkoumaném vzorku.

Analýza stromálních fibroblastů zkoumaných tumorů (benigní a maligní histiocytomy, bazaliom, spinaliom) přispěla k pochopení regulace genové exprese způsobené nádorovým prostředím. Stromální fibroblasty zkoumaných nádorů vykazují schopnost vytvářet prostředí vážně modifikující fenotyp normálních epiteliálních keratinocytů, které získávají fenotyp podobný nádorovým buňkám.

Byla zavedena reprodukovatelná, rychlá a vysoce senzitivní metoda detekce extrémně vzácných nehematopoetických buněk. Počty CFU-En nekorelují s průtokově-cytometricky stanovenými počty CEC ani EPC. Tyto kolonie jsou utvářeny za součinnosti CD14+ monocytů a CD4+ T lymfocytů. Počty CEC a EPC jsou v úzkém vztahu s poškozením cévního endotelu působeného systémovými onemocněními. Jejich zastoupení se dále mění v reakci na aktuální stav onemocnění.

Naše pozorování mohou mít značný vliv v rozvoji terapeutických přístupů léčby nádorů kůže a přináší diagnosticko-prognostický potenciál do terapie systémových onemocnění.

2. SUMMARY

Flow-cytometry is a process on which large numbers of single cells are quantitatively and qualitatively analyzed. This method gives information about size, granularity surface or intracellular markers of every single cell in suspension. In modern biology is worthy to perform quick, objective multiparametric analyses of cell phenotype. This project was focused on cells, which analyses are complicated by extreme rareness or lack of clearly identifying specific markers.

Analysis of stromal cells of the investigated tumors (histiocytoma and tumor fibroblasts originating in squamous epithelium: basalioma (BCCF) and spinalioma (SCCF) elucidated alteration of gene expression induced by tumor cells. Tumor-derived stromal fibroblasts acquire distinct properties to shape a microenvironment conducive to altering the phenotypic characteristics of normal epithelial cells in vitro.

Reproducible, quick and highly sensitive method of detection extremely rare non-haematopoetic cells (EPC, CEC) was established. Numbers of CFU-En correlate neither with circulating endothelial progenitors nor with matured endothelial cells detected by flow-cytometry. These colonies are formed in cooperation of CD14 + and CD4+ cells. Numbers of endothelial progenitors and matured endothelial cells are closely related with vessel endothelium damage caused by system disease. They further change in response to disease state.

Our findings can bring new approaches to skin cancers treatment and have certain potential in diagnosis/prognosis of system diseases

3. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda umožňující kvantitativně i kvalitativně analyzovat velké množství buněk v suspenzi. Zprostředkovává informaci o jejich velikosti a granularitě, identifikuje buňky pomocí fluorescenčně značených protilátek specifických pro jejich povrchové i vnitrobuněčné receptory. V moderní biologii je třeba provádět rychlé objektivní multiparametrické analýzy buněčného fenotypu. Od hematologicko-onkologického a imunologického výzkumu a diagnostiky se průtoková cytometrie stále častěji využívá i k analýze kompaktních tkání.

V projektu jsme se věnovali analýze fenotypu stromálních fibroblastů nádorů vycházejících z dlaždicových epitelů (bazaliom, spinaliom) a histiocytomu. Analýza stromálních buněk těchto nádorů poskytla informace o genové expresi pod vlivem nádorových buněk.

Dále jsme studovali cirkulující endotelové progenitory (EPC) související s fyziologickou i patologickou cévní novotvorbou a zralé cirkulující buňky (CEC) spojované s poškozením mikrocirkulace. Jedná se o populace nacházející se v periferní krvi s extrémně malou četností (0,01%-0,001%) (Khan a kol. 2005). Zaměřili jsme se na analýzu buněčných typů, jejichž stanovení je komplikováno nejasností fenotypu či extrémně malou četností ve vzorku.

Sledovali jsme následující cíle:

- Analýza fenotypu kompaktních tkání stromatu histiocytomu a stromálních fibroblastů nádorů vycházejících z dlaždicového epitelu (bazaliom a spinaliom)
- Konfrontace průtokově-cytometrických dat s histologickými a funkčními vlastnostmi
- Hodnocení vlivu stromálních fibroblastů na fenotyp epiteliálních buněk studovaných nádorů
- Zavedení metodiky fenotypizace extrémně vzácných nehematopoetických buněk, cirkulujících endotelových progenitorů (EPC) a cirkulujících zralých endotelových buněk (CEC) a její srovnání s kultivační metodou.
- Analýza fenotypu buněk, z nichž vznikají endotelové kolonie (CFU-En) v periferní krvi, jejich vztah k CEC a CEP. Objasnit eventuální potřebu jiných buněčných populací při tvorbě (CFU-En)
- Hodnocení význam monitorování cirkulujících endotelových prekurzorů u pacientů s cévními a nádorovými chorobami

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Průtoková cytometrie

4.1.1 Analýza stromálních fibroblastů metodou průtokové cytometrie

Bylo testováno široké spektrum markerů typických pro hematopoetické a kmenové buňky, pro diferenciaci, růst a adhezi za účelem co nejpřesnějšího popisu fenotypových změn probíhajících v rámci nádorového niche. Fibroblasty připravené z tumorů nebo normální lidské dermis byly po trypsinizaci analyzovány na přístroji FACSCalibur[®] equipment (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Analýza dat byla provedena za použití softwaru Summit[®] V3.3. Build 1024 (DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA). Suspenze jednotlivých buněk ve fosfátovém pufru (PBS) s přidavkem 2% fetálního telecího séra (FCS) byla testována na prezenci následujících markerů mezenchymových kmenových buněk a adhezivních molekul: CD29, CD44, CD49a, CD49c, CD49d, CD19e, CD63, CD90, CD106, CD105, CXCR4, hematopoetických buněk CD11c, CD11b, CD14, CD18, CD45, CD34, CD68, CD235a, diferenciačních a růstových markerů: CD166, CD71, alkalické fosfatázy (ALP), HLA DR, DQ, DP a HLA A, B, C. Všechna data byla srovnávána s negativní kontrolou tvořenou irelevantními imunoglobuliny daného izotypu. Nastavení fotonásobičů (PMT) a kompenzací bylo provedeno způsobem podrobně popsáním v následujícím oddílu. Plné charakteristiky použitých protilátek obsahují příložené publikace I, II a III.

4.1.2 Zavedení stanovení CEC a EPC metodou průtokové cytometrie

Při zavádění metody průtokově-cytometrické detekce cirkulujících endotelových buněk (CEC) a cirkulujících endotelových progenitorů (EPC) jsme soustředili naše úsilí na minimalizaci vlivu jednotlivých faktorů negativně ovlivňujících reprodukovatelnost výsledků měření extrémně vzácných událostí (0,1 - 0,0001%). Tyto rušící faktory hrají při analýze běžných populací zanedbatelnou roli, avšak analýza vzácných událostí je na ně vysoce citlivá. (Eghbali-Fatourechi a kol. 2005, Eghbali-Fatourechi a kol. 2003, Canalis a kol. 2005).

Rušivý vliv nespecifické fluorescence způsobené vazbou přes Fc γ receptory jsme omezili použitím vhodného blokačního agens (FcR blocking reagent, Miltenyi, Biotec) (Khan a kol. 2005). Pro oddělení erytrocytů jsme používali lyzační agens na bázi chloridu amonného, jedná se o metodu v literatuře preferovanou před separací na Ficoll gradientu (George a kol. 2006, Shmilovich a kol. 2007). Testovali jsme tři lyzační činidla, z nichž se nejlépe osvědčil BD FACS lysing solution (BD Biosciences). Velmi důležitou roli hraje výběr vhodného slepého kanálu (Lin), který obsahuje značenou protilátku proti znaku přítomnému na většině buněk zkoumaného souboru, nikoli však na hledaných vzácných buňkách. Výběru vhodných protilátek do tohoto slepého kanálu jsme věnovali značné úsilí. Od použití dříve preferované CD45 se nyní upouští. Některé populace endotelových buněk mohou slabě exprimovat CD45, což oslabuje průkaznost tohoto stanovení (Shaffer a kol. 2006). Proto jsme se soustředili na sestavení

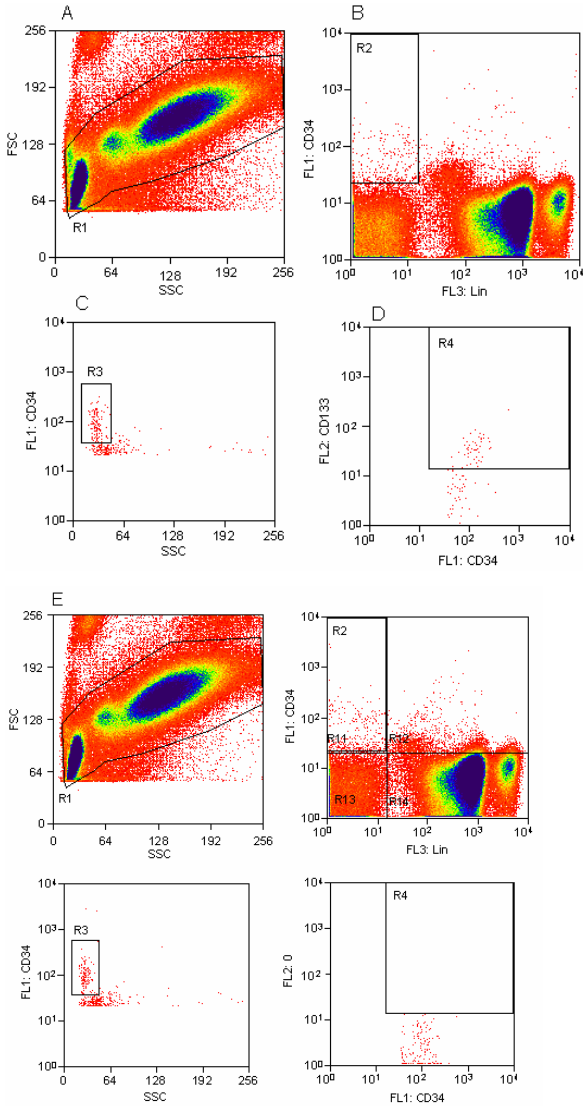
vhodného koktailu protilátek proti jednotlivým populacím krevních buněk. Ve slepém kanále jsme testovali nejprve trojici protilátek: anti-CD3 PerCP-Cy5.5, anti-CD19 PerCP-Cy5.5, anti-CD33 PerCP-Cy5.5. Tyto protilátky jsou dodávány v nízké koncentraci (3 μ g/ml, 5 μ g/ml, resp. 6,3 μ g/ml), což kladlo nároky na použité množství a potažmo finanční náročnost protilátek. Navíc tato kombinace nebyla optimální. Následně jsme do slepého kanálu vybrali čtyři konjugáty PE-Cy5: lymfocytární markery anti-CD3 PE-Cy5 a anti-CD19 PE-Cy5, monocytární marker anti-CD14 PE-Cy5 a anti-CD15 PE-Cy5 pro rozlišení granulocytů.

Podstatné je také nastavení kompenzací jednotlivých fluorescenčních kanálů cytometru. Testovali jsme použití umělých kompenzačních kuliček konjugovaných s fluorochromem (SpektraComp Kit 3, Dako). Avšak kuličky konjugované s tandemem (PE-Cy5) nebyly stálé. Používali jsme tedy vzorky periferní krve značené anti-CD8, připravené stejným způsobem jako vlastní vzorky.

Velkým úskalím stanovení CEC a EPC stále zůstává volba vhodných markerů. Dosud nebyly stanoveny znaky odpovídající jednotlivým stupňům vývojové hierarchie endotelových prekurzorů a zralých endotelových buněk (Ighram a kol. 2004, Yoder a kol. 2007) a situace je nadále komplikována existencí monocytární populace, která za určitých okolností může nabýt některých vlastností endotelových buněk (tzv. endotel-like monocytů, Rehman a kol. 2003, Fujiyama a kol. 2003). V průběhu testování četných protilátek jsme sestavili panel, kde pro determinaci CEC byly buňky značeny CD146 FITC a CD31 PE. EPC byly

identifikovány jako dvojitě pozitivní pro znaky CD34 FITC a CD133 PE, resp. CD34+ FITC a anti-VEGFR2 PE. Vše za současné negativity pro slepý kanál (Lin-). Jako negativní kontroly byly použity izotypové imunoglobuliny. Plné charakteristiky použitých protilátek obsahují příložené publikace IV a V.

PMT rozmezí pro jednotlivé kanály bylo nastaveno pomocí Fluorospheres 8 Peaks (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). U každého měření CEC či CEP bylo načteno minimálně 500 000 buněk na přístroji FACSCalibur (Becton-Dickinson) s 488 nm argonovým laserem. U extrémně vzácných událostí výsledek zásadně ovlivňuje i použitá gatovací strategie. Námí vyvinutá strategie je ve shodě s tou, která byla v nedávné studii srovnávající šest nejpoužívanějších metod „gatingu“ jako označena za plně vyhovující (Van Craenenbroeck a kol. 2008). Tato strategie spočívá v několikastupňovém vylučování majoritní populace, buněčné drti a nespecifické vazby. V prvním kroku je na FSC-SSC profilu zahrnuta jen leukocytární populace bez buněčné drti (obr.1A), druhý „gate“ slouží k zahrnutí jen buněk pozitivních na CD34 resp. CD146 a zároveň negativních ve znacích slepého kanálu (obr. 1B), tímto krokem se minimalizuje nespecifická fluorescence. Třetí „gate“ pak zahrnuje jen buňky pozitivní na CD34 resp. CD146 s nízkým SSC (obr. 1C). Na závěr je odečteno množství dvojitě pozitivních buněk negativních pro znaky slepého kanálu (CD34⁺CD133⁺Lin⁻, CD34⁺VEGFR2⁺Lin⁻ resp. CD146⁺CD31⁺Lin⁻) (obr. 1D). Vyloučení nespecifické vazby bylo dále potvrzeno kontrolním měřením obsahujícím protilátky pouze prvního (CD34 resp. CD146) a slepého kanálu (obr. 1E).



Obrazek 1: Gatovací strategie pro detekci EPC za použití protilátek anti-CD34FITC, anti-CD133PE a slepého kanálu.

4.2 Imunocytochemie

Epidermální vzorky byly parafinizovány a rutinně barveny na prezenci panelu keratinů, keratinu 19 a galektinu. Fibroblasty byly charakterizovány za použití následujících znaků: makrofágový „tandem-repeat-type“ manóзовý receptor, CD14, CD45, CD34, CD68, CD71, vimentin, hladký svalový aktin, Ki67 a nukleostemin. U keratinocytů byla testována presence keratinů za použití polyklonálních králičích protilátek. Keratin 8 a 19 byly detegovány za použití myších protilátek. Epitelomesenchymová transformace byla definována na základě koexprese keratinů, vimentinu a transkripčního faktoru snail. Dále byla sledována exprese Nukleosteminu a Ki67. Polyklonální králičí anti-lidský galektin 1 byl používán jako marker nádorového stromatu. Získaná data byla srovnávána s negativními kontrolami, kde specifické protilátky byly nahrazeny irelevantními protilátkami (u monoklonálních protilátek shodného izotypu). DNA byla vizualizována DAPI. Vlastní pozorování byla provedena na fluorescenčním mikroskopu Eclipse 90i (Nikon, Prague, Česká republika) vybaveném CCD fotoaparátem (Vosskühler Cool-1300Q; Vosskühler, Osnabrück, Germany) a grafickým analyzerem (LUCIA 5.10; Laboratory Imaging, Prague, Česká republika). Plné charakteristiky použitých protilátek obsahují publikace I, II a III.

4.3 Buněčné kultury

4.3.1 Kultury stromálních fibroblastů a keratinocytů

Normální dermální fibroblasty (DF) a keratinocyty byly připraveny ze zbytkové kůže pacientů podstupujících zákroky plastické chirurgie a splňovaly všechna zákonná etická nařízení. Kožní štěpy byly inkubovány přes noc v roztoku 0,3% trypsinu při teplotě 4 °C. Dermis a epidermis byly odseparovány, *in vitro* expanze keratinocytů byla provedena v souladu s modifikovaným protokolem podle Rheinwald–Greena (Matoušková 1989). Fibroblasty migrující z dermis byly sklizeny pro expanzi v Dulbecco's modified Eagle's medium s 10% fetálního bovinního séra (obojí, Biochrom, Berlin, SRN) v 37 °C a 5% CO₂. Fibroblasty stromatu tumorů byly připraveny a kultivovány ve shodě s modifikovanou metodou podle Grando a kol 1996. Do experimentů byly zahrnuty buňky vykazující normální vzhled od šesté pasáže, kultivované aspoň 41 dní. Buněčná linie LEP pocházející od SevaPharma (Praha, Česká republika) byla kultivována v bezsérém médiu EPL (Seva-Pharma), v uzavřeném systému při 37 °C. 3T3 buňky byly kultivovány v H-MEM (SevaPharma) s 10% hovězího séra (ZVOS, Hustopeče, Česká republika) při 37 °C a 3,3% CO₂. Všechny typy fibroblastů byly před kokultivací s keratinocyty ošetřeny mitomicinem C (Sigma) v dávce 25 μg mL⁻¹ po dobu 3 h.

4.3.2 Kultivace CFU-En a endotelových buněk

Stanovení CFU-En bylo provedeno v souladu s protokolem popsáním v Hill et al. 2003 a v souladu

s doporučením výrobce k použití Endocult™ média. 20ml nesrážlivé periferní krve s heparinem bylo centrifugováno na Ficoll-Hypaque (Ammersham, Upsalla, Švédsko). Získaná mononukleární frakce byla dvakrát promyta ve fosfátovém pufru a resuspendována ve 2ml média Endocult™ (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada), počet buněk byl stanoven na hematologickém analyzátoru (AcTDiff2, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). 10×10^6 buněk ve 4ml media Endocult™ bylo rozděleno do dvou jamek BD BioCoat™ Gelatin 6-well plate (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) a kultivováno po 48 hodin při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5% CO₂. Následně byla odebrána neadherentní frakce z každé jamky spolu s médiem a dále nasazena v dubletu po 1×10^6 buňkách na jamku BD BioCoat™ Fibronectin 24-well. Od každého vzorku tedy byly do závěrečné kultivace nasazeny 4 jamky po 1×10^6 buněk. Po 72 hodinách kultivace byly odečteny endotelové kolonie (CFU-En) pod inverzním mikroskopem. CFU-En byly identifikovány jako kolonie tvořící alespoň 20 buněk obsahující kulovité středové buňky obklopené větvenovitými buňkami. Odborný personál laboratoře odečítající počty CFU-En nebyl seznámen s diagnózou ani stavem sledovaných pacientů.

V kokultivačních experimentech monocytární frakce a lymfocytárních subpopulací byly buňky separovány na MiniMACS nebo MidiMACS kolonách (Miltényi Biotec) pomocí imunomagnetických kuliček v souladu s pokyny výrobce. Byly používány následující separační reagenty: Monocyte Isolation Kit II, CD4 Microbeads and CD8 MicroBeads, CD34 MicroBeads (vše Miltenyi Biotec). Izolované buňky byly intravitálně

barveny PKH26 RED resp. PKH67 GREEN Fluorescent Cell Linker Mini Kits (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). Po výše popsané kultivaci v médiu Endocult™, byly odečteny CFU-En kolonie pod invertovaným fluorescenčním mikroskopem.

„Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ (HUVEC) (Department of Vascular Endothelium and Microcirculation, Medical Theoretical Centre, Dresden, Germany) byly kultivovány v Mediu 199 (Gibco, Invitrogen, Germany) byly použity jako pozitivní kontrola imunofenotypizace endotelových kolonií kultivovaných z buněk periferní krve.

Zařadili jsme také funkční analýzu endotelu měřenou jako produkci NO indukovanou oběhovým stresem na přístroji cone-and-plate viscometer (Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Germany) (Morawietz 2000). Vlastní stanovení se zakládá na diazotační reakci, kterou původně popsal Griess v roce 1879 (Goetsch a kol. 2008).

4.4 Pacienti trpící nádorovými onemocněními či poruchami mikrocirkulace

Ve studii bylo hodnoceno celkem 18 pacientů podstupujících alogenní transplantaci, 17 pacientů podstupujících autologní transplantaci, 18 pacientů podstupujících chemoterapii a 6 zdravých dárců kmenových buněk. Kontrolní skupiny tvořilo celkem 80 zdravých dobrovolníků. V některých srovnáních jsme do kontrolní skupiny zahrnuli i zdravé dárce, tedy do celkového počtu 86 osob. Bližší demografické charakteristiky osob účastnících se studie obsahují

publikace IV a V. U nově diagnostikovaných pacientů byly EC a EPC stanoveny před léčbou a v čase dosažení remise tedy tři měsíce po dokončení posledního cyklu chemoterapie. U ASCT pacientů byla množství EPC a CEC měřena před mobilizací PBPC, první den PBPC separace, v PBPC produktu a tři měsíce po ASCT. Dále byla množství EPC a CEC stanovována u nehematologických pacientů s poškozením cirkulace. Zkoumáno bylo celkem 41 pacientů s AAV, 15 hemodialyzovaných pacientů bez vaskulitidy, 13 pacientů s aterosklerózou periferních tepen a 25 zdravých kontrol. Konkrétní demografické charakteristiky osob účastnících se studie obsahují publikace VI, VII a VIII. Všechny procedury byly provedeny v souladu s Helsinskou deklarací. Studie byly schváleny etickou komisí a všichni účastníci podepsali informovaný souhlas.

4.5 Statistické metody

Data kvantitativní mikroskopie byla kalkulována z populace 500 buněk na vzorek, k testování statistické významnosti byl užit Studentův t-test. Kategorická data byla srovnávána Yatesovým testem. U numerických dat s nenormálním rozložením (Kolmogorov-Smirnovův jednovýběrový test normality) jsou výsledky vyjádřeny jako medián a rozmezí a byly použity neparametrické testy k testování hypotéz. Srovnání dvou nezávislých vzorků bylo provedeno Mann-Whitney U testem. Párová srovnání byla počítána Wilcoxonovým signed-rank testem a korelace byly hodnoceny pomocí Spearmanova testu. Pro srovnání více interdependentních vzorků byla použita Friedmanova ANOVA a Dunnova mnohočetná

srovnávací analýza. Jen případy s hodnotou p oboustranně nižší než 0,05 byly hodnoceny jako statisticky signifikantní. K analýze byl použit software Statistica (StatSoft, Tulsa, OC, USA).

5. DISKUZE VÝSLEDKŮ PRÁCE

5.1 *Nádorové stroma jako niche moderující rozvoj tumoru*

V rámci tohoto projektu jsme zkoumali fenotyp fibroblastů nádorových stromatů a jejich biologickou aktivitu. Fibroblasty připravené jak z benigního a z maligního fibrózního histiocytomu a spinaliomu byly fenotypově prakticky identické s normálními dermálními fibroblasty včetně negativity pro CD34 a CD105 (publikace I a III). Naproti tomu stromální fibroblasty bazocelulárního karcinomu vykazovaly redukcii exprese všech fibroblastových markerů, byla zaznamenána snížená exprese HLA-I, panleukocytární marker CD45 a HLA-II antigen byly v souladu s očekáváním negativní. Dlouhodobá kultivace BCCF vedla kromě ztráty fibroblastových povrchových markerů k morfologickým změnám, ztrátě kontaktní inhibice a progresivní aneuploidii. Byla zaznamenána exprese Ber-EP4, jež může být vysvětlována jako artefakt v důsledku *in vitro* prostředí pro vysoce plastické fibroblasty nebo může být chápána jako projev epitelu-mesenchymové transformace v souvislosti s pozorováními přechodu buněk karcinomu prsu v nenádorové stromální buňky nevykazující *in vivo* maligní charakter (Petersen a kol. 2003). Ani v rámci

naší studie nebyl potvrzen maligní fenotyp za použití *in vivo* imunodeficientního myšího modelu (publikace II).

BCCF i SCCF v kokultuře signifikantně transformovaly normální dermální fibroblasty v buňky nižšího diferenciačního stupně exprimující fenotypové znaky typické pro tkáňové kmenové či maligní nádorové buňky. Konkrétně byla pozorována přítomnost intermediálních filament nepřirozených pro normální postnatální dlaždicový epitel jmenovitě keratin 19 typický pro epiteliální kmenové buňky, keratin 14 exprimovaný v buňkách bazálního epitelu či keratin 8 fyziologicky přítomný v embryonálních kmenových buňkách (Michel a kol. 1996, Gires a kol. 2004, Troy a Turksen 2005). Došlo také ke zvýšení vazebné aktivity endogenního lektinu galektinu-1, která bývá rovněž spojována se změnami adheze a vaskularizace v rámci maligních tumorů (André a kol. 2007, Gabius a kol. 2001) (publikace II a III).

BFH se klinicky projevuje hyperplastickou epidermis, jež je jedním z důležitých diagnostických znaků tohoto onemocnění. Ačkoli se jedná nepochybně o morfologickou změnu vyvolanou bezprostřední blízkostí nádoru, mechanismus vzniku tohoto jevu dosud nebyl plně objasněn (Han a kol. 2001). S ohledem na výsledky studií týkajících se BCC a SCC jsme provedli analogické kokultivační experimenty. Fibroblasty benigního fibrózního histiocytomu projevovaly *in vitro* biologickou aktivitu, jejímž prostřednictvím měnily fenotyp normálních dermálních fibroblastů. Byla pozorována indukce exprese keratinu 19, která *in situ* v keratonocytech hyperplastické epidermis nebývá vyjádřena. Dále byla zvýšena i vazebná aktivita

galektinu-1 podobně jako v kokultuře s BCCF či SCCF. Tyto alterace nebyly pozorovány v kontrolních experimentech s buňkami MFH, kde nenastává změna charakteru přilehlé epidermis (publikace I). Výsledky jsou tedy ve shodě s *in vivo* morfologií epidermis přiléhající k BFH resp. MFH a v kontextu studií provedených na buňkách BCC a SCC identifikují stromální fibroblasty jako regulační agens nádorové biologie. Vzhledem ke skutečnosti, že k fenotypovým změnám docházelo i v kokulturách, kde byly keratinocyty fyzicky odděleny od fibroblastů a extracelulární matrix, jedná se patrně o regulaci na bázi secernovaných faktorů. Konkrétní mechanismy jejich působení na růst a diferenciaci však vyžadují další pozornost.

5.2 Metody a význam detekce cirkulujících endotelových buněk v diagnostice a predikci systémových onemocnění

Úspěšně zavedené metody detekce vzácných událostí jsme aplikovali při studiu CEC a EPC u pacientů podstupujících transplantaci kostní dřeně a u pacientů s poruchami mikrocirkulace. Srovnali jsme metodu průtokové cytometrie s kulturačním stanovením endotelových kolonií.

Podstatným zjištěním bylo, že počty CFU-En nekorelují ani s počty CD34+CD133+Lin- buněk ($r = 0.12$, $p = 0.42$) ani s počty CD34+VEGFR2+Lin- buněk ($r = -0.09$, $p = 0.53$). Byla pozorována signifikantní negativní korelace mezi CFU-En a CD31+CD146+Lin-buňkami ($r = -0.36$, $p = 0.01$). Neexistující korelace mezi CFU-En koloniemi a průtokově-cytometricky změřenými

endotelovými prekurzory vedla k úvahám, zda jsou CFU-En kolonie skutečně tvořeny klonogenními endotelovými progenitory. V době řešení projektu vyšlo několik studií (van Beem a kol. 2008, Rohde a kol. 2007, Rohde a kol. 2006), které ukazují, že CFU-En kolonie nemusí vznikat z endotelových prekurzorů. Tyto studie uvažují jejich vznik ve spolupráci monocytů a T-lymfocytů.

Nezávisle jsme provedli sérii kokultivačních experimentů buněk periferní krve zdravých dobrovolných dárců, v nichž jsme imunomagneticky oddělili některé buněčné populace a označili je intravitálními fluorescenčními barvivy. V počátku jsme vyvrátili hypotézu, že CFU-En jsou tvořeny za součinnosti CD34+ a CD14+ buněk. Následně jsme provedli kokultivace CD14+/CD4+ resp. CD14+/CD8+ buněk. Zatímco počty CFU-En z CD14+CD4+ experimentu byly obdobné jako při kultivaci neseparovaných mononukleárních buněk periferní krve, v nasazení CD14+/CD8+ nebyly nalezeny žádné kolonie. Obdobně negativní výsledek byl zaznamenán i v monokulturách jednotlivých testovaných populací.

Po těchto experimentech jsme testovali hypotézu, že CFU-En korelují s počty CD4+ lymfocytů. Měřily jsme lymfocytární subpopulace u skupiny 16 hematologických pacientů a 23 zdravých dobrovolníků. Ve výsledném souboru 39 osob jsme zaznamenali signifikantní korelaci mezi CFU-En a CD4+ lymfocyty ($r = 0,67$, $p < 0,00001$) a NK buňkami ($r = 0,62$, $p = 0,00003$), nebyla zjištěna žádná korelace s CD8+ lymfocyty ($r = -0,02$, $p = 0,92$) ani s CD14+ monocyty ($r = 0,15$, $p = 0,34$).

Zjistili jsme tedy, že CFU-En vznikají za součinnosti právě CD4 pozitivních T lymfocytů a monocytů. Buňky těchto kolonií jsou však schopny *in vitro* exprimovat endotelové markery a produkovat NO za podmínek oběhového mechanického stresu (publikace IV).

Sledovali jsme význam stanovení cirkulujících endotelových buněk a cirkulujících endotelových progenitorů u pacientů podstupujících chemoterapii, autologní transplantaci (ASCT), alogenní transplantaci krvetvorných buněk (Allo-SCT) a pacientů trpících ANCA asociovanými vaskulitidami (AAV).

U skupiny nově diagnostikovaných hematologických pacientů i u ASCT pacientů jsme zjistili signifikantně vyšší počty CEC (CD146+CD31+Lin-) a nižší počty CFU-En ($p = 0.00006$ and $p = 0.04$) ($p < 0.00001$ pro obě srovnání) než u zdravých dobrovolníků. Naproti tomu jsme nezaznamenali rozdíly v počtech průtokově stanovených EPC (CD34+CD133+Lin- a CD34+VEGFR2+Lin- buňky) mezi zdravými dobrovolníky a ani jednou ze skupin pacientů. Po chemoterapii počty CD31+CD146+Lin- buněk signifikantně poklesly (z 702 na 175 buněk/ml, $p = 0.039$), tento pokles nenastal po ASCT (z 185 na 279 buněk/ml, $p = 0.51$). Nicméně počty CD31+CD146+Lin- se po léčbě nenormalizovaly ani u jedné ze skupin pacientů a zůstaly statisticky významně vyšší ve srovnání se zdravými kontrolami (kontroly v. chemoterapie $p = 0.008$, kontroly v. ASCT, $p = 0.001$). Tento nález je ve shodě s názorem, že chemoterapie může působit poškození cévního endotelu a zvyšovat rizika kardiovaskulárních onemocnění (Zeng a kol. 2008,

Woywodt a kol. 2004). Počty CFU-En se nezměnily významně po chemoterapii ani po ASCT. Zaznamenali jsme signifikantní pokles CD34+CD133+Lin- buněk po ASCT ($p = 0.04$), nikoli po chemoterapii (publikace IV).

U pacientů podstupujících Allo-SCT jsme zaznamenávali snížené počty CFU-En před léčbou, po příhojení štěpu i více než rok po léčbě oproti zdravým kontrolám ($p < 0.00001$). Hladina CD146+CD31+Lin-CEC byla i více než rok po léčbě zvýšená ($p = 0.009$) (publikace V).

Pacienti s AAV měli signifikantně méně CFU-En než zdravé kontroly (medián 0.3 vs. 19.5 CFU-Hill/ml krve, $p > 0.0001$). Nízké počty CFU-En asociovaly se silnější tendencí k časnému relapsu (publikace VI a VII).

Na rozdíl od průtokově cytometricky stanovených populací endotelových buněk nepovažujeme nízké počty CFU-En u hematologických pacientů za obraz poškození cévního endotelu, nýbrž za známku imunitní dysfunkce doprovázené poklesem hladiny CD4+ lymfocytů, která byla u hematologických pacientů přítomna v čase diagnózy a vytrvala i po cytotoxické léčbě.

6. ZÁVĚRY

Analýza stromálních fibroblastů zkoumaných tumorů přispěla k pochopení regulace genové exprese způsobené nádorovým prostředím.

Stromální fibroblasty zkoumaných nádorů vykazují schopnost vytvářet prostředí vážně modifikující fenotyp normálních epiteliálních keratinocytů, které získávají fenotyp podobný nádorovým buňkám.

Byla zavedena reprodukovatelná, rychlá a vysoce senzitivní metoda detekce extrémně vzácných nehematopoetických buněk.

Počty CFU-En nekorelují s průtokově-cytometricky stanovenými počty CEC ani EPC. Tyto kolonie jsou utvářeny za součinnosti CD14+ monocytů a CD4+ T lymfocytů.

Počty CEC a EPC jsou v úzkém vztahu s poškozením cévního endotelu působeného systémovými onemocněními. Jejich zastoupení se dále mění v reakci na aktuální stav onemocnění.

7. PUBLIKOVANÉ PRÁCE AUTORKY SE VZTAHEM K DIZERTACI

- I. L. Kideryová, L. Lacina b,c,d, B. Dvorankova, J. Storch, Z. Cada , P. Szabo , S. Andre , H. Kaltner, H.-J. Gabius, K. Smetana Jr. Phenotypic characterization of human keratinocytes in coculture reveals differential effects of fibroblasts from benign fibrous histiocytoma (dermatofibroma) as compared to cells from its malignant form and to normal fibroblasts. Journal of Dermatological Science 2009(55): 18–26 **IF: 2,973**
- II. Lacina L, Smetana K Jr., Dvořánková B, Pytlík R, Kideryová L, Kučerová L, Plzáková Z, Štork J and Gabius H-J. Stromal fibroblasts prepared from basal cell carcinoma influence phenotype of cultured normal keratinocytes. British Journal of Dermatology, Br J Dermatol. 2007 May;156(5):819-29 **IF: 3,334**
- III. Lacina L, Dvořánková B, Smetana K Jr ., Chovanec, M., Plzák J., Tachezy R., Kideryová L, Kučerová L, Čada Z., Brouček J., Kodet R., André S., Gabius H-J. Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. Int. Radiation. Biol. In press. 2007 May;156(5):819-29 **IF: 1,312**
- IV. Kideryová L, Pytlík R, Benešová K, Veselá R, Karban J, Rychtrmocová H, Goetsch W, Morawietz H, Trněný M. Endothelial cells (EC) and endothelial precursor cells (EPC) kinetics in haematological patients undergoing chemotherapy or autologous stem cell transplantation (ASCT). Hematological Oncology. In press xxx (2009) xxx–xxx **IF: 2,33**
- V. Pytlík R, Kideryová L, Benešová K, Čechová H, Veselá R, Rychtrmocová H, Trněný M. Circulating Endothelial precursor cells (EPC) in patients undergoing allogeneic

- hematopoietic progenitor cell transplantation. *Folia Biologica Praha* In press xxx (2009) xxx–xxx **IF: 1,14**
- VI. Závada J, Kideryová L, Pytlík R, Tesař V. Circulating endothelial progenitor cells in patients with ANCA-associated vasculitis. *Kidney and Blood Pressure Research* 2008 Jul 4;31(4):247-254. **IF: 1.092**
- VII. Závada J, Kideryová L, Pytlík R, Vaňková Z, Tesař V. Circulating Endothelial progenitor cell number is predictive of early relapse in antineutrophil cytoplasmic antibody – associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. xxx (2009) xxx–xxx (Epub ahead of print 2009: June 9) **IF: 4.045**
- VIII. Závada J, Kideryová L, Pytlík R, Tesař V. Circulating endothelial cells and circulating endothelial progenitors in kidney disease--victims, witnesses, or accomplices? *Folia Biol (Praha)*. 2008;54(3):73-80. **IF: 0.596**

8. PUBLIKOVANÉ PRÁCE AUTORKY BEZ VZTAHU K DIZERTACI

- i. Robert Pytlík, David Stehlík, Tomas Soukup, Marie Kalbáčová, Frantisek Rypacek, Tomáš Trč, Jan Zivny, Katarina Mulinkova, Linda Kideryová, Petra Michnová, Pavel Klener Jr., Marek Trněný, Pavel Klener. A novel Method of one-step cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for orthopedic purposes. *Biomaterials, Biomaterials* In press xxx (2009) 1–13 **IF: 6,646**
- ii. Pytlík R, Hofman P, Kideryova L, Cervinkova P, Obrtlíkova P, Salkova J, Trneny M, Klener P. Dendritic cells and T lymphocyte interactions in patients with lymphoid malignancies. *Physiol Res*. 2007 May 30; **IF: 2,093**
- iii. Chochola M, Pytlík R, Kobyłka P, Skalická L, Kideryová L, Beran S, Varejka P, Jirát S, Křivánek J, Aschermann M, Linhart A. Autologous intra-arterial infusion of bone

marrow mononuclear cells in patients with critical leg ischemia. *Int Angiol.* 2008 Aug;27(4):281-90. **IF: 0.933**

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Andre´ S, Sanchez-Ruderisch H, Nakagawa H, Buchholz M, Kopitz J, et al. Tumor suppressor p16INK4a: modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic carcinoma cells. *FEBS J* 2007;272:3233–56.
2. Canalis E. The fate of circulating osteoblasts. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 2014-16
3. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle W, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003; 111: 1221-1230
4. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in human. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 1959-66
5. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, and Matsubara H. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circulatory Research*. 2003;93:980-989.
6. Gabius HJ. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimie* 2001;83:659– 66.
7. George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Engineering*. 2006;12:331-335

8. Gires O, Muñiz M, Schaffrik M, Kieu C, Rauch J, et al. Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics based technology. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1198–207.
9. Goettsch W, Gryczka C, Korff T, Ernst E, Goettsch C, Seebach J, Schnittler HJ, Augustin HG, Morawietz H. Flow-dependent regulation of angiopoietin-2. *J Cell Physiol* 2008;214:491-503
10. Han K-H, Huh C-H, Cho K-H. Proliferation and differentiation of the keratinocytes in hyperplastic epidermis overlying dermatofibroma. Immunohistochemical characterization. *Am J Dermatopathol* 2001;23:90–8.
11. Ingram DA, Mead LE, Tahala H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-2760.
12. Khan SS, Solomon MA, McCoy JF. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry*. 2005;64B:1-8
13. Matoušková E, Veselý P, Konigová R. Modified method of in vitro cultivation of human keratinocytes suitable for grafting. *Folia Biol (Praha)* 1989; 35:267–71.
14. Michel M, Torok N, Godbout JM, Lussier M, Gaudreau P, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially located in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 1996;109: 1017–28.
15. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol (Lond)*. 2000;525:761–770

16. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood „endothelial progenitor cells“ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107:1164-1169.
17. Rohde E, Bartmann C, Schallmoser K, Reinisch A, Lanzer G, Linkesch W, Guelly C, Strunk D. Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells*. 2007;25:1746-52
18. Rohde E, Malischnik C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells*. 2006;24:357-367.
19. Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, Mohler ER 3rd. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70:56-62.
20. Shmilovich H, Deutsch V, Roth A, Miller H, Keren G, George J. Circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiac syndrome X. *Heart*. 2007;93:1071-1076.
21. Troy T-C, Turksen K. Commitment of embryonic stem cells to an epidermal cell fate and differentiation. *Developmental Dynamics* 2005;232:293 – 300.
22. Van Beem R, Noort WA, Voermans C, Kleijer M, ten Brinke A, van Ham SM., van der Schoot CE, Zwaginga JJ. The presence of activated CD4+ T cells is essential for the formation of colony-forming unit-endothelial cells by CD14+ cells. *J Immunol*. 2008;180:5141-5148.
23. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Van Bockstaele DR, Haine SE, Vermeulen K, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Hoymans VY. Quantification of circulating endothelial progenitor cells: A methodological comparison

- of six flow cytometric approaches. *J Immunol Methods*. 2008;332:31-40
24. Woyvot A, Scheer J, Hambach L, Buchholz S, Ganser A, Haller H, Hertenstein B, Haubitz M. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 103: 3603-3605.
 25. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cells principals. *Blood*. 2007;109:1801-1809.
 26. Zeng L, Yan Z, Ding S, Xu K, Wang L. Endothelial injury, an intriguing effect of methotrexate and cyclophosphamide during hematopoietic stem cell transplantation in mice. *Transplant Proc* 2008;40:2670-3.