

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
1. INTERNÍ KLINIKA 1. LF UK A VFN

DIZERTAČNÍ PRÁCE

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

Mgr. LINDA KIDERYOVÁ

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOLOGIE A PATOLOGIE BUŇKY

ŠKOLITEL: Prof. MUDr. KAREL SMETANA JR., DrSC.

PRAHA 2009

## ***Poděkování***

Chtěla bych poděkovat za trvalou podporu, neocenitelné rady, porozumění a ideální pracovní podmínky školiteli Prof. MUDr. Karlu Smetanovi Jr., DrSc. z Anatomického ústavu 1.LF UK a vedoucímu Laboratoře experimentální buněčné terapie při 1. interní klinice 1. LF UK a VFN MUDr. Robertu Pytlíkovi.

Dále srdečně děkuji za praktickou pomoc a poskytnutou podporu nejbližším kolegyním Mgr. Romaně Veselé, Mgr. Haně Rychtrmocové, Blance Bílkové a kolegům z Anatomického ústavu 1. LF UK RNDr. Barboře Dvořánkové, PhD. a MUDr. Lukáši Lacinovi, PhD.

Zvláštní dík za lidskou a profesionální podporu patří Prof. Dr. rer.nat. Henningovi Morawietzovi, kterou mi spolu se svým týmem poskytl během stáže na Ústavu vaskulárního endotelu a mikrocirkulace Lékařské fakulty Technické univerzity v Drážďanech.

Srdečně děkuji svým rodičům Daně a Janu Kideryovým za laskavé pročtení a připomínkování rukopisu, jež výrazně zlepšilo formální kvalitu textu.

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM 0021620806, 1M0021620803, MSM 0021620807 a MSM 0021620808), Grantové agentury České republiky (304/04/0171), EC Marie Curie Research Training Network (2005–019561), Ministerstva zdravotnictví ČR (NR 8754/3 a NR 8047/3), Univerzity Karlovy (GAUK 33/2006) a stipendijního programu Herbert-Quandt/ALTANA.

Prohlašuji, že tuto předloženou dizertační práci jsem vypracovala samostatně a použila jsem jen prameny, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

## ***Seznam použitých zkratek***

AAV	ANCA associated vasculitis
Allo-SCT	allogeneous stem cell transplantation
ASCT	autologous stem cell transplantation
BCC	basal cell carcinoma
BFH	benign fibrous histiocytoma (dermatofibroma)
CD	cluster of differentiation
CEC	circulating endothelial cell
CFU-En	endothelial colony-forming unit
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EPC	endothelial progenitor cell
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
K	keratin
Lin	lineage specific
MFH	malign fibrous histiocytoma
NuclS	nucleostemin
PB-adher.	peripheral blood adherent fraction endothelial cells
PB-MNC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	tandem Phycoerythrin-Cyanine5
PMT	photomultiplier
SCC	squamous cell carcinoma
SCT	stem cell transplantation
SMA	smooth muscle actin
SSC	side scatter

<i>Poděkování</i> .....	<i>II</i>
<i>Seznam použitých zkratk</i> .....	<i>III</i>
<i>Co je průtoková cytometrie</i> .....	<i>V</i>
<i>Publikované práce autorky se vztahem k tématu práce</i> .....	<i>VII</i>
<b>1. KRITICKÝ ÚVOD DO SLEDOVANÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Kmenová buňka a nádorová kmenová buňka</i> .....	1
1.2 <i>Nádorové stroma jako niche ovlivňující rozvoj tumoru</i> .....	2
1.3 <i>Fibrózní histiocytomy</i> .....	3
1.4 <i>Bazocelulární karcinom</i> .....	4
1.5 <i>Dlaždicový karcinom</i> .....	5
1.6 <i>Vztah mezi endotelovými koloniemi CFU-En a cirkulujícími endotelovými buňkami</i> .....	5
1.7 <i>Cirkulující endotelové buňky a cirkulující endotelové progenitory u pacientů podstupujících alogenní či autologní transplantaci krvetvorných buněk</i> .....	6
1.8 <i>Cirkulující endotelové buňky a cirkulující endotelové progenitory v patogeneze ANCA asociovaných vaskulitid</i> .....	7
<b>2. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>8</b>
2.1 <i>Průtoková cytometrie</i> .....	8
2.1.1 <i>Analýza stromálních fibroblastů metodou průtokové cytometrie</i> .....	8
2.1.2 <i>Zavedení stanovení CEC a EPC metodou průtokové cytometrie</i> .....	8
2.2 <i>Imunocytochemie</i> .....	15
2.3 <i>Buněčné kultury</i> .....	16
2.3.1 <i>Kultury stromálních fibroblastů a keratinocytů</i> .....	16
2.3.2 <i>Kultivace CFU-En a endotelových buněk</i> .....	16
2.4 <i>Pacienti trpící nádorovými onemocněními či poruchami mikrocirkulace</i> .....	17
2.5 <i>Statistické metody</i> .....	18
<b>3. DISKUZE VÝSLEDKŮ PRÁCE</b> .....	<b>19</b>
3.1 <i>Nádorové stroma jako niche moderující rozvoj tumoru</i> .....	19
3.2 <i>Metody a význam detekce cirkulujících endotelových buněk v diagnostice a predikci systémových onemocnění</i> .....	20
<b>4. SOUHRN</b> .....	<b>23</b>
<b>5. SUMMARY</b> .....	<b>24</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>25</b>

## ***Co je průtoková cytometrie***

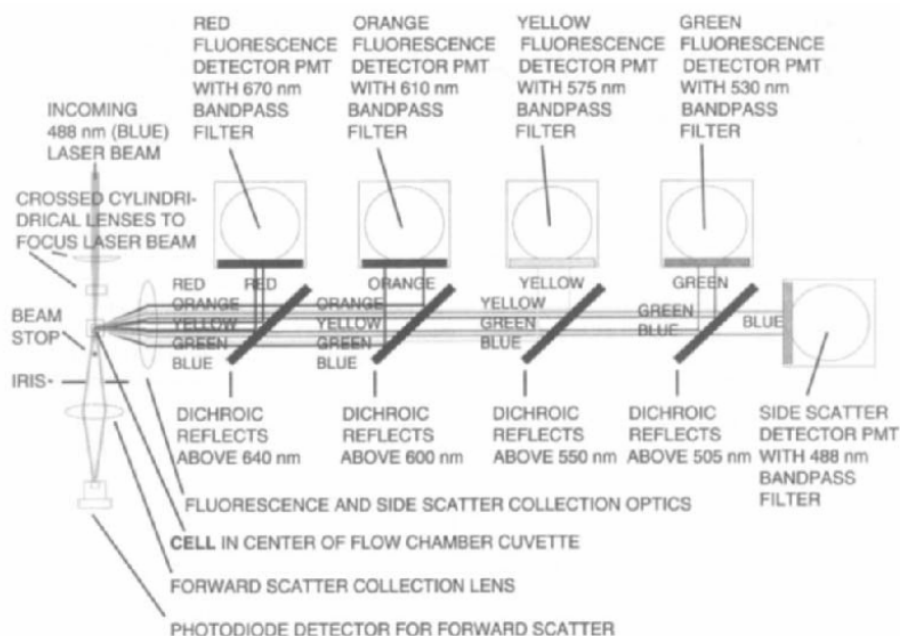
Průtoková cytometrie je laboratorní metoda umožňující kvantitativně i kvalitativně analyzovat velké množství buněk v suspenzi. Zprostředkovává informaci o jejich velikosti a granularitě, identifikuje buňky pomocí fluorescenčně značených protilátek specifických pro jejich povrchové i vnitrobuněčné receptory. Paprsek světla jedné vlnové délky (obvykle laser) je zacílen přímo na hydrodynamicky vedený proud kapaliny v detekční komoře cytometru. V okamžiku, kdy buňka zkříží dráhu paprsku, zachytí detektor forward scatter (FSC) informaci o světle přímo prošlém buňkou a tedy o velikosti partikule. Detektor side scatter (SSC) zaznamená množství světla odraženého v úhlu 90° od zdrojového paprsku, jež je úměrné granularitě průchozí buňky. Fluorescenční detektory zachytí světlo odpovídající excitačním vlnovým délkám použitých fluorescenčních barviv (Shapiro, 2003a). Na každé jednotlivé buňce je tedy současně analyzováno několik vlastností (obrázek 1).

Historie průtokové cytometrie se odvíjí od počátku třicátých let minulého století, kdy byly provedeny první práce na poli cytologické automatizace a fotoelektrického počítání buněk procházejících kapilárou. Dlouhodobý multidisciplinární výzkum vedl k jednotlivým pokrokům na poli biologie, biotechnologie, výpočetní techniky, laserové technologie, matematiky, medicíny, molekulární biologie, organické chemie a fyziky, jež v polovině 60. let vyústili k sestrojení prvního průtokového cytometru dnešního typu. Přístroj nazvaný *fluorescence activated cell sorter* (FACS) byl zkonstruován k oddělování krevních buněk s rozdílným signálem odraženého světla. Rozvoj technologie monoklonálních protilátek a fluorescenčních barviv vedl v 70. letech k posunu těžiště využívání průtokových cytometrů ve prospěch multiparametrické detekce na úkor sortování. V polovině 70. let průtoková cytometrie dospěla k uvedení na trh prvních komerčních přístrojů (Jaroszeski a Heller, 1998, Hawley a Hawley, 2004).

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)
- Hodnotit význam monitorování cirkulujících endotelových prekurzorů u pacientů s cévními a nádorovými chorobami



Obrázek 1: Schéma optického systému fluorescenčního průtokového cytometru (Shapiro, 2003a)

## ***Publikované práce autorky se vztahem k tématu práce***

- 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: 2,500**
- II. Lacina L, Smetana K Jr., Dvořánková B, Pytlík R, Kideryová L, Kučerová L, Plzánková 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.* V recenzním řízení
- 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* 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 Preassure 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, Tesar 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**



# **1. KRITICKÝ ÚVOD DO SLEDOVANÉ PROBLEMATIKY**

## **1.1 Kmenová buňka a nádorová kmenová buňka**

V průběhu ontogeneze se v organismu vyskytují embryonální, germinální a somatické kmenové buňky. Za embryonální kmenové buňky považujeme pluripotentní kmenové buňky nacházející se v oblasti embryoblastu blastocytu. Germinální kmenové buňky se nacházejí v gonádách, v dospělosti produkují vajíčka a spermie. Somatické kmenové buňky pak zajišťují buněčnou obnovu produkcí buněk omezené diferenciací potence. Jen základní embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní, schopné dát vznik buňkám všech tkání. Během procesu diferenciace ztrácejí postupně pravé kmenové buňky schopnost diferencovat do některých buněčných typů a stávají se tak somatickými kmenovými buňkami přítomnými v malém množství ve tkáních, kde zajišťují obnovu několika buněčných typů.

Zatímco embryonální kmenové buňky se dělí symetricky logaritmicky expanzivně, somatické kmenové buňky se za normálních podmínek dělí asymetricky lineárně, dávají vznik jedné diferencovanější buňce (transit amplifying cell) a jedné shodného typu s mateřskou tj. kmenovou buňkou. Zatímco se kmenová buňka dělí velmi pomalu a po dobu života jedince prakticky neomezeně, „transit amplifying cell“ se dělí velmi rychle avšak s omezeným počtem mitóz.

Nádorová buňka patrně prodělává vývoj analogický fyziologické diferenciaci. Je možné vysledovat vztah mezi stádiem diferenciace buněčné linie, z níž nádor vzešel a typem nádoru. Z embryonálních buněk se vyvíjejí vysoce maligní karcinomy, z terminálně diferencovaných buněk benigní tumory. Dosud byly popsány nádorové kmenové buňky rakoviny prsu, prostaty, ovaríí, varlat, CNS či tlustého střeva (Sell 2004a, Sell 2004b). Podobně jako zdravé epiteliální tkáně mají svou architekturu charakterizovanou kmenovými buňkami v bazální linii a diferencujícími se buňkami ve vrstvách, byla popsána stratifikace buněk spinaliomu vyznačující se přítomností periferní invazivní fronty a postupující diferenciací směrem do centra tumoru (Chovanec a kol., 2005). Mezi periferními buňkami se patrně v minoritním zastoupení vyskytují i nádorové kmenové buňky, které asymetrickým dělením kromě sebeobnovy produkují i rychle se dělící buňky invazivní fronty. Protinádorová léčba často zasahuje hlavně proliferující buňky, kdežto nádorové kmenové buňky s nízkou frekvencí dělení a aktivním vylučováním xenobiotik z cytoplazmy často terapii unikají (Motlík a kol. 2007).

## **1.2 Nádorové stroma jako niche ovlivňující rozvoj tumoru**

Kmenové buňky generují potomky určené k diferenciaci dvěma základními mechanismy. Výsledkem prvního typu tzv. invariantního asymetrického dělení je jedna buňka určená k diferenciaci a jedna kmenová buňka mateřského typu. V druhém případě, popsaném jako populační asymetrické dělení, kde má každá ze vzniklých dceřiných buněk určitou pravděpodobnost diferenciaci či zachování fenotypu kmenové buňky. Zde dochází k bohatě regulovanému procesu moderovanému okolním mikro-prostředím, zvaným niche, které je tvořeno stromálními buňkami, extracelulární matrix a cévami. Osud kmenových buněk ovlivňuje niche pomocí secernovaných faktorů, bezprostředními mezibuněčnými interakcemi a signalizací integrin-extracelulární matrix. Populační asymetrie umožňuje plastickou odpověď na aktuální potřeby organismu (Watt a kol 2000).

Analogický proces můžeme nalézt i v kancerogenezi nádorů. Kmenové nádorové buňky jsou v bezprostředním kontaktu se stromatem nádoru tvořeným nádorovými fibroblasty a cévami, toto niche podporuje obnovu nádorových kmenových buněk a reguluje diferenciaci secernovanými faktory (Ailles 2007). Byla publikována data dokládající vývoj normálního epitelu mléčné žlázy v prostředí fyziologického stromatu. Pokud ale byly buňky pocházející z morfologicky normálního epitelu vystaveny stromatu nadprodukcujícímu růstové faktory (transforming growth factor  $\beta$ , hepatocyte growth factor), daly vzniknout premalignímu a malignímu epitelu (Medina a kol 2004, Kuperwasser a kol 2004). Niche coby regulátor proliferace a diferenciaci nádorových kmenových buněk patrně představuje klíčovou roli v biologii tumorů. Fibroblasty nádorových stromatů se jeví jako ideální *in vitro* model pro osvětlení dnes obecně přijímaného názoru, že vzájemná mezenchymálně-epiteliální interakce je mechanismem zásadním pro morfogenezi.

Fibroblasty coby buňky prokazatelně schopné měnit své vlastnosti v závislosti na fyziologických podmínkách prostředí (Chang a kol 2002), schopné exprese rozličných keratinů v ko-kultuře s keratinocyty, mohou být považovány za původce fenotypových změn (Yamaguchi a kol 1999). V této souvislosti byla popsána regulační role s nádorem asociovaných stromálních fibroblastů na biologii sousedních nádorových buněk (Bhowmick a kol. 2004). Vystala tedy otázka, zda jsou stromální buňky nádoru schopné iniciovat vznik a vývoj nádorové masy *in situ*.

### **1.3 Fibrózní histiocyty**

Fibrohistiocytické nádory kůže tvoří heterogenní skupinu dermato-subkutánních mezenchymálních neoplázií. Termín „fibrohistiocytický“ se vztahuje k morfologické podobnosti nádorových buněk s fibroblasty a histiocyty. Buňky těchto tumorů vykazují fibroblastickou, myofibroblastickou a histiocytickou diferenciaci často v rámci jednoho tumoru. Klasifikace WHO (2005) zahrnuje benigní tumory (fibrózní histiocytom neboli dermatofibrom), tumory intermediální povahy (plexiformní fibrohistiocytom a dermatofibrosarkom protuberans) a agresivní tumory (maligní fibrózní histiocytom) (Hugel a kol 2006). Benigní fibrózní histiocytom (BFH) je běžný nádor s incidencí přibližně 3% populace (Rahbari a kol 1985). Charakteristickým diagnostickým znakem těchto neoplázií jsou morfologické změny epidermis přiléhající k tumoru, velmi častá bývá akantotická proliferace epidermis nad tumorem, se zvýšenou pigmentací a folikulární indukci, čímž může napodobovat povrchový bazocelulární karcinom (Cheng a kol 1997). Imunohistochemická analýza epidermis přiléhající k dermatofibromu prokázala jasné změny proliferace a diferenciaci (Han a kol 2001). Aktivace epidermálních keratinocytů je zjevně působená tumorem anebo jeho stromálními buňkami. Za zdrojové buňky histiocytomu byly v dosavadních pracích považovány histiocyty, fibroblasty, jejich intermediální formy i mezenchymové kmenové buňky, přesný původ tohoto nádoru však dosud nebyl objasněn (Folpe a kol 2007).

Ze současných prací vyplývá potřeba studovat vliv niche ve spojitosti se vznikem těchto heterogenních tumorů (Watt 2000, Blanpain a kol 2006). V rámci tohoto projektu nás zajímalo, jaký vliv budou mít stromální fibroblasty BFH na normální lidské keratinocyty v *in vitro* ko-kultivačním modelu. Paralelně jsme prováděli kontrolní experimenty zahrnující „cancer-associated stromal fibroblasts“ (CASF) z maligního fibrózního histiocytomu (MFH). Tyto nádory zahrnují podobně jako BFH a bazocelulární karcinom kondenzované stroma bohaté na fibroblasty, avšak přilehlá pokožka je bez hyperplastických změn (Rosenberg a kol 2003, Taher a kol 2007). V diagnostice MFH stejně jako u ostatních fibrohistiocytických tumorů hraje významnou roli imunohistochemická analýza. Neexistuje přesná kombinace markerů, která by MFH jasně odlišovala. MFH často vykazují „vimentin-only“ imunofenotyp bez možnosti další specifikace diferenciačního profilu. Buňky MFH lézí jsou vždy negativní pro cytokeratiny a protein S100, je možná slabá exprese aktinu jako projevu myofibroblastické diferenciaci. Fibrohistiocytické tumory často obsahují nenádorové Langerhansovy buňky pozitivní na protein S100, CD31 pozitivní endotelové buňky a

makrofágy a také dendritické buňky exprimující faktor XIIIa. CD68 stejně jako další histiocytární markery (a1-antitrypsin, a1-antichymotrypsin a faktor XIII) diagnózu nepotvrzují ani nevyvracejí (Al-Agha a kol 2008).

#### **1.4 Bazocelulární karcinom**

Bazocelulární karcinom (bazaliom, BCC) kůže je zhoubné nádorové onemocnění s vůbec nejvyšší incidencí. V České republice bývá zachyceno přibližně 150/100 000 případů nemelanomových nádorů kůže, z nichž přibližně 80% tvoří BCC (Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky 2007, American Cancer Society <http://www.cancer.org/>). Globálně je výskyt výrazně nerovnoměrný závislý na intenzitě slunečního záření. Dále je zvýšený výskyt pozorován u osob dlouhodobě vystaveným dehtu a jiným polutantům (Mitropoulos a kol 2008) či u pacientů s potlačenou imunitou (Kanitakis a kol 2003). K rozvoji tohoto karcinomu obvykle dochází v oblasti hlavy a krku, tedy v místech exponovaných slunečnímu záření. BCC je nádorem pomalu rostoucím lokálně agresivním, působícím značnou destrukci okolní tkáně, metastazuje však extrémně vzácně a po jeho odstranění je prognóza dobrá. U poloviny pacientů však dochází k rekurentnímu výskytu BCCF do pěti let po zákroku (American Cancer Society <http://www.cancer.org/>, Ozgediz a kol 2008). Histogeneze BCC není dosud plně objasněna, jeho vznik bývá přisuzován buňkám vlasového folikulu (Tilli a kol. 2005). Pro histologickou diagnózu je obvykle dostatečné barvení hematoxylin-eosin. Imunohistochemická analýza BCC bývá pozitivní pro keratin (K) 14, fyziologicky vyjádřený v bazálních buňkách, K19 vyskytující se prenatálně v bazálních buňkách, postnatálně v kmenových buňkách vlasového folikulu (Lane, McLean 2004, Michel a kol 1996, Habets a kol 1988, Dvořánková a kol 2005). BCC obvykle vykazují silnou pozitivitu pro membránový protein Ber-EP4 (Krahl a kol 2007), dále bývá přítomen nukleolární protein neuronálních a hematopoetických buněk a od nich odvozených malignit nukleostemin (NuclS) (Tsai a kol 2002). „*Smooth muscle actin*“ (SMA) může být znakem myoepitelové diferenciaci agresivnějších bazaliomů (Tsukamoto a kol 1994).

## **1.5 Dlaždicový karcinom**

Dlaždicový karcinom (spinaliom, SCC) je druhým nejčastějším kožním nádorem, tvoří přibližně 20% ze zachycených případů. I zde je výskyt úměrný expozici mutagenů v čele se slunečním zářením (Utikal a kol 2007), dále byl pozorován zvýšený výskyt u pacientů po orgánové transplantaci (Carucci a kol 2004). Jedná se též o tumory lokálně agresivní, metastazující častěji než BCC. Spinocelulární nádory kůže jsou méně zhoubné než SCC sliznic. Vznikají patrně z buněk bazální vrstvy epidermis či kmenových buněk vlasového folikulu (Sell 2004c) Na rozdíl od bazaliomu bývá SCC pozitivní pro „epithelial membrane antigen“ (EMA) a negativní v expresi Ber-EP4 a SMA (Krahl a kol 2007, Fan a kol 2007).

## **1.6 Vztah mezi endotelovými koloniemi CFU-En a cirkulujícími endotelovými buňkami**

Endotelové progenitory jsou blízce příbuzné krvetvorným buňkám a v průběhu embryonálního vývoje vzniká krvetvorná tkáň i cévy ze společného druhu buněk, hemangioblastu (Oberlin a kol. 2002). Stejně jako u krvetvorných buněk může existovat i hierarchie endotelových prekursorů (Ingram a kol. 2004).

V době počátku tohoto projektu byla doložena existence dvou typů buněk vykazujících endotelové znaky. Podle času jejich expanze v kultuře byly nazývány jako časné a pozdní endotelové progenitorové buňky, přičemž pozdní byly považovány za primitivnější prekuzory, díky podstatně vyšším počtům dělení v kultuře. Lin prokázal, že u alogenně transplantovaných pacientů pochází časné prekuzory z buněk příjemce, zatímco pozdní endotelové prekuzory pochází z dárcovských buněk a mohou tedy být primitivním endotelovým progenitorem (Lin a kol. 2000). V recentní studii Au et al. doložili za použití imunodeficientních myších modelů, že endotelové buňky kultivované z periferní krve člověka jsou schopné *in vivo* formovat cévy, ty jsou však nestálé a zanikají během tří týdnů (Au a kol. 2008). Zaměřili jsme se na otázku, zda takzvané časné endotelové progenitory, kultivované standardizovaným protokolem podle Hill a kol. 2003 jako CFU-En jsou skutečně pokročilými progenitory nebo zda se jedná o krátkodobě endotelově funkční populaci krevních buněk. Dále jsme testovali případnou nutnost spolupráce dalších buněčných populací pro vznik těchto kolonií.

## **1.7 Cirkulující endotelové buňky a cirkulující endotelové progenitory u pacientů podstupujících alogenní či autologní transplantaci krvetvorných buněk**

Alogenní a autologní transplantace krvetvorných buněk (allo-SCT, ACST) jsou v rozvinutých zemích včetně České republiky první rutinně užívanou metodou buněčné terapie (Gratwohl a kol. 2003, Pytlík a kol. 2003, Vítek a kol. 2003). Od konce devadesátých let se hromadí důkazy, že v kostní dřeni a periferní krvi nejsou přítomny pouze krvetvorné progenitory, ale i další progenitorové buňky, z nichž mohou vznikat pojivové tkáně, svaly a parenchymové orgány (Pittengel a kol. 1999, Orlic a kol. 2001, Lagasse a kol. 2000). Předpokládá se rovněž, že z kostní dřene pocházejí endotelové progenitorové buňky (EPC), které se podílejí na fyziologických (revaskularizace ischemických tkání, Kocher a kol. 2001) i na patologických procesech (neovaskularizace tkání nádorových, Woyvodt 2003).

Výskyt cirkulujících endotelových buněk i cirkulujících endotelových prekurzorů byl korelován s řadou onemocnění. Zralé endotelové buňky (CEC) a zejména cirkulující apoptotické či nekrotické buňky endotelu či úlomky endotelových buněk jsou většinou pokládány za známku poškození mikrocirkulace – objevují se u pacientů s ANCA asociovanou vaskulitidou, lupusem ale i u pacientů po Allo-SCT v důsledku přípravného režimu, či venookluzivní jaterní choroby (Natori a kol. 2002, Woyvot a kol. 2004). EPC negativně koreluje s počtem rizikových faktorů ischemické choroby srdeční dle Framinghamské škály (Wilson a kol. 1998), jejich zvýšení bylo pozorováno i po akutním infarktu myokardu (Massa a kol. 2005). U pacientů po SCT nebyla přítomnost a signifikance EPC dosud popsána, avšak u pacientů s mnohočetným myelomem, tedy onemocněním, v němž hraje angiogeneza a vaskulogeneza významnou roli, byla zjištěna korelace počtu EPC v periferní krvi s aktivitou onemocnění (Zhang a kol. 2005).

Zralé endotelové buňky tedy svědčí především o poruše mikrocirkulace, EPC naopak umožňují obnovu malých i větších cév, což může být prospěšné u ischemizovaných orgánů (Tateishi-Yuyama a kol. 2002), ale škodlivé u malignit. EPC tedy teoreticky mohou u některých hematologických malignit predikovat relaps onemocnění. V žádné studii však dosud nebyl srovnáván vzájemný vztah CEC a EPC

Transplantace krvetvorných buněk představuje ideální model výzkumu cirkulujících endotelových buněk a cirkulujících endotelových prekurzorů. Při sběru krvetvorných buněk se dá přesně spočítat počet EPC a CEC, který je transplantován příjemci a tato data mohou tvořit základ pro další srovnávání účinnosti G-CSF v léčbě pacientů s cévními poruchami. Naopak, monitorování počtu EPC a CEC umožní jednak zjistit, zda vzestup či

pokles některé z těchto populací koreluje s prognózou potransplantačních komplikací (reakce štěpu proti hostiteli, infekce, orgánová poškození, relaps) či dokonce umožňuje tyto komplikace předvídat.

### ***1.8 Cirkulující endotelové buňky a cirkulující endotelové progenitory v patogeneze ANCA asociovaných vaskulitid***

Poškození endotelu nekrózou s odloučením endotelových buněk od bazální membrány je významným patogenetickým rysem ANCA-asociovaných vaskulitid (AAV). Endotelová dysfunkce je ale vlastní i řadě dalších chorob s postižením ledvin a může být projevem uremie u chronicky dialyzovaných pacientů (Choi a kol. 2004, Eizawa a kol. 2003). V souvislosti s endotelovým poškozením se v poslední době diskutuje význam cirkulujících endotelových progenitorů (EPC) a cirkulující zralých buněk endotelu (CEC). Zralé endotelové buňky a cirkulující endotelové partikule jsou nejčastěji pokládány za známku poškození mikrocirkulace. Endotelové progenitory jsou na rozdíl od cirkulujících zralých buněk endotelu nadány značnou proliferační schopností, vykazují řadu znaků kmenových hematopoetických buněk i endotelových markerů a přispívají k reparaci poškozeného endotelu a neovaskularizaci ischemicky postižených tkání. Stanovení CEC a EPC v periferní krvi se jeví užitečným markerem aktivity a závažnosti vaskulárního postižení, případně účinnosti zavedené léčby a další prognózy.

Ačkoliv některé souvislosti mezi aktivitou ANCA vaskulitidy a množstvím CEC a EPC (Woyvodt a kol. 2003, Holmén a kol. 2005) byly již částečně objasněny, dosud nebyly objasněny vztahy mezi množstvím EPC a CEC a stupněm renální insuficience, vlivem imunosupresivní léčby, některými aspekty farmakologické léčby či dialyzační metody u pacientů s chronickým selháním ledvin.

## **2. MATERIÁL A METODY**

### **2.1 Průtoková cytometrie**

#### **2.1.1 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<sup>®</sup> equipment (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Analýza dat byla provedena za použití softwaru Summit<sup>®</sup> V3.3. Build 1024 (DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA). Suspenze jednotlivých buněk ve fosfátovém pufru (PBS) s přídavkem 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 popsáným v následujícím oddílu. Plné charakteristiky použitých protilátek obsahují příložené publikace I, II a III.

#### **2.1.2 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-Fatourehchi a kol. 2005, Eghbali-Fatourehchi a kol. 2003, Canalis a kol. 2005).

Rušivý vliv nescifické fluorescence způsobené vazbou přes Fc $\gamma$  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



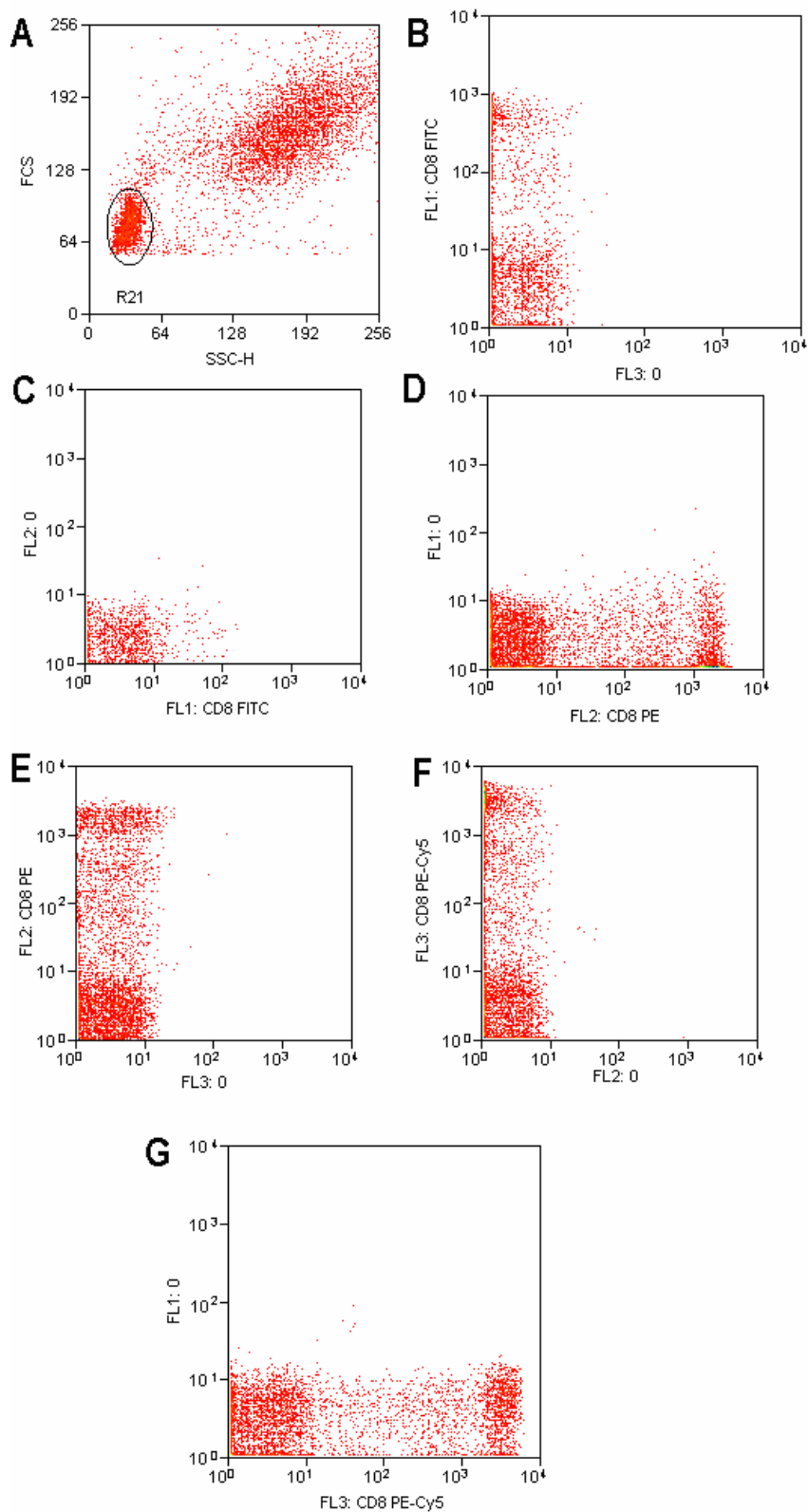
přítomnému na většině buněk zkoumaného souboru, nikoli však na hledaných vzácných buňkách. Výběru vhodných protilátek do tohoto slepého kanálu jsme věnovali značné úsilí. Od použití dříve preferované CD45 se nyní upouští. Některé populace endotelových buněk mohou slabě exprimovat CD45, což oslabuje průkaznost 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 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, resp. 6,3 $\mu$ 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 (obrázek 2).

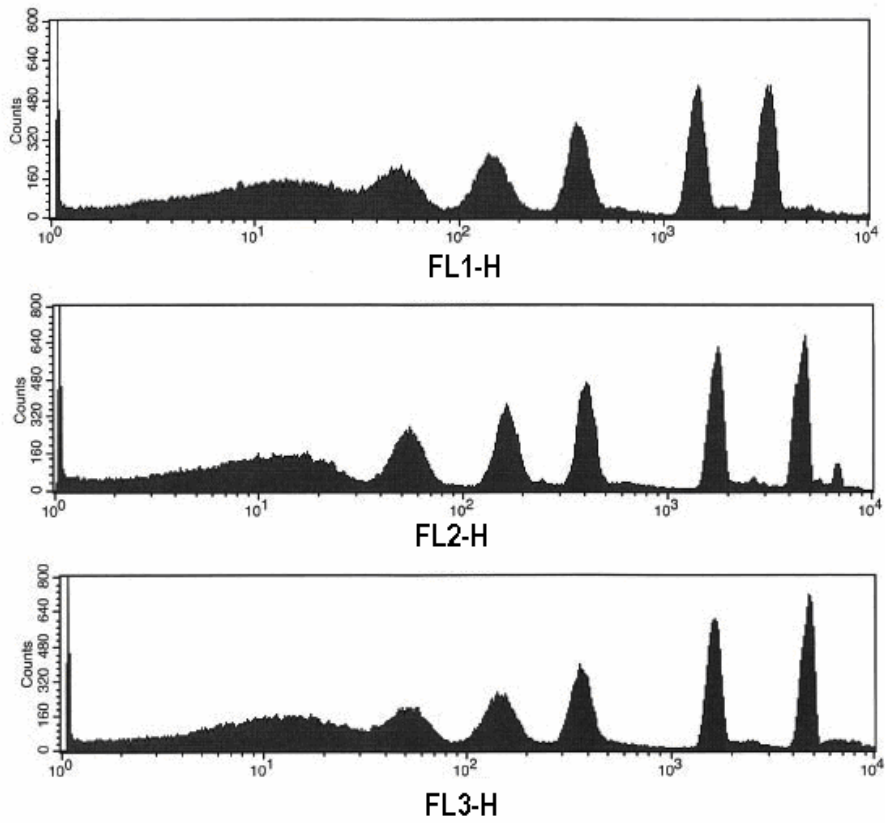
Velkým úskalím stanovení CEC a EPC stále zůstává volba vhodných markerů. Dosud nebyly stanoveny znaky odpovídající jednotlivým stupňům vývojové hierarchie endotelových prekurzorů a zralých endotelových buněk (Ighram a kol. 2004, Yoder a kol. 2007) a situace je nadále komplikována existencí monocytární 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<sup>+</sup> FITC a anti-VEGFR2 PE. Vše za současné negativity pro slepý kanál (Lin<sup>-</sup>). 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 Fluospheres 8 Peaks (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) (obrázek 3). 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

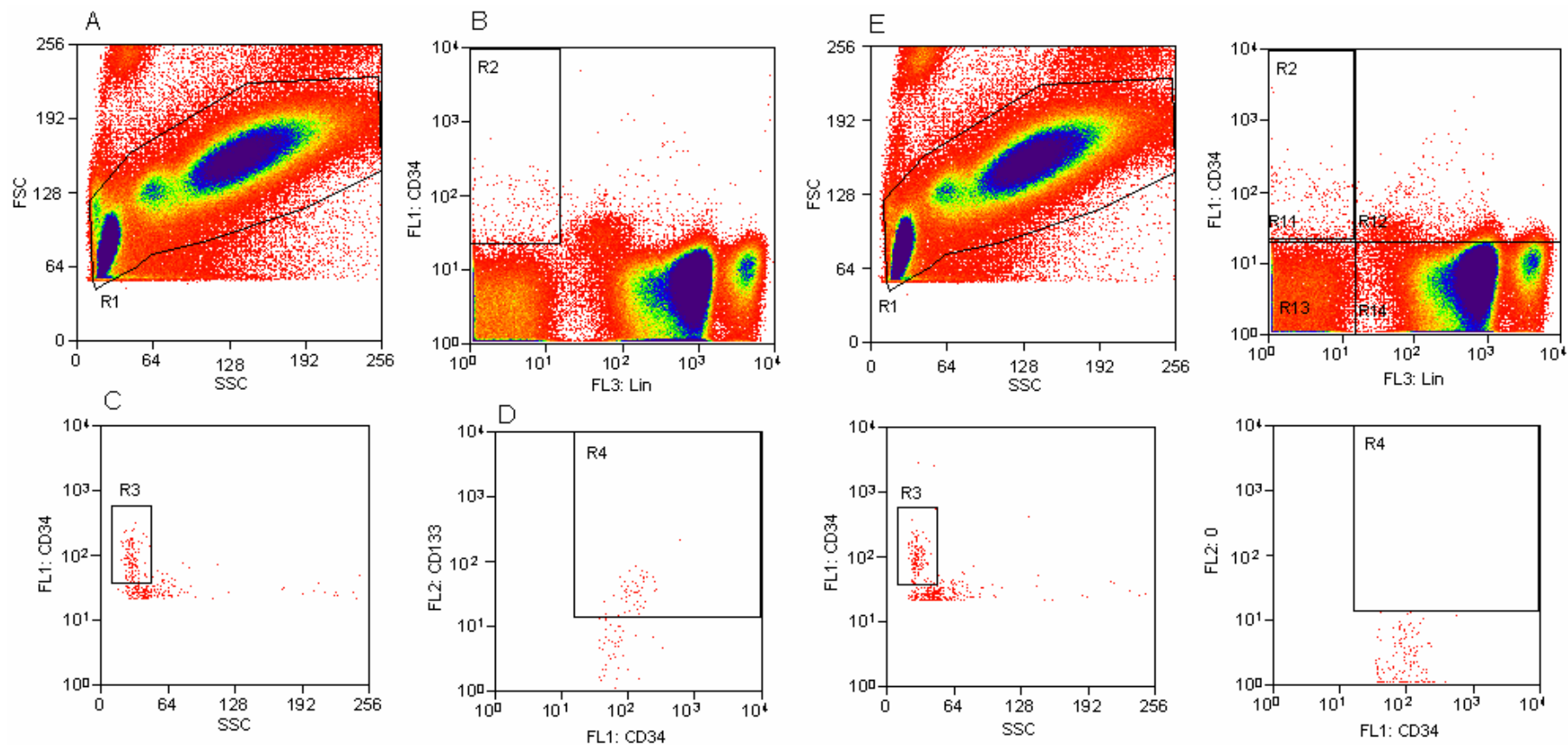
Craenenbroeck a kol. 2008). Tato strategie spočívá v několikastupňovém vylučování majoritní populace, buněčné drti a nespecifické vazby. V prvním kroku je na FSC-SSC profilu zahrnuta jen leukocytární populace bez buněčné drti (obrázek 4A), druhý „gate“ slouží k zahrnutí jen buněk pozitivních na CD34 resp. CD146 a zároveň negativních ve znacích slepého kanálu (obrázek 4B), tímto krokem se minimalizuje nespecifická fluorescence. Třetí „gate“ pak zahrnuje jen buňky pozitivní na CD34 resp. CD146 s nízkým SSC (obrázek 4C). Na závěr je odečteno množství dvojitě pozitivních buněk negativních pro znaky slepého kanálu ( $CD34^+CD133^+Lin^-$ ,  $CD34^+VEGFR2^+Lin^-$  resp.  $CD146^+CD31^+Lin^-$ ) (obrázek 4D). Vyloučení nespecifické vazby bylo dále potvrzeno kontrolním měřením obsahujícím protilátky pouze prvního (CD34 resp. CD146) a slepého kanálu (obrázek 4E). Obrázek 5 znázorňuje stanovení EPC pomocí markerů CD34/VEGFR2/Lin. Obrázek 6 pak detekci endotelových zralých buněk CEC.



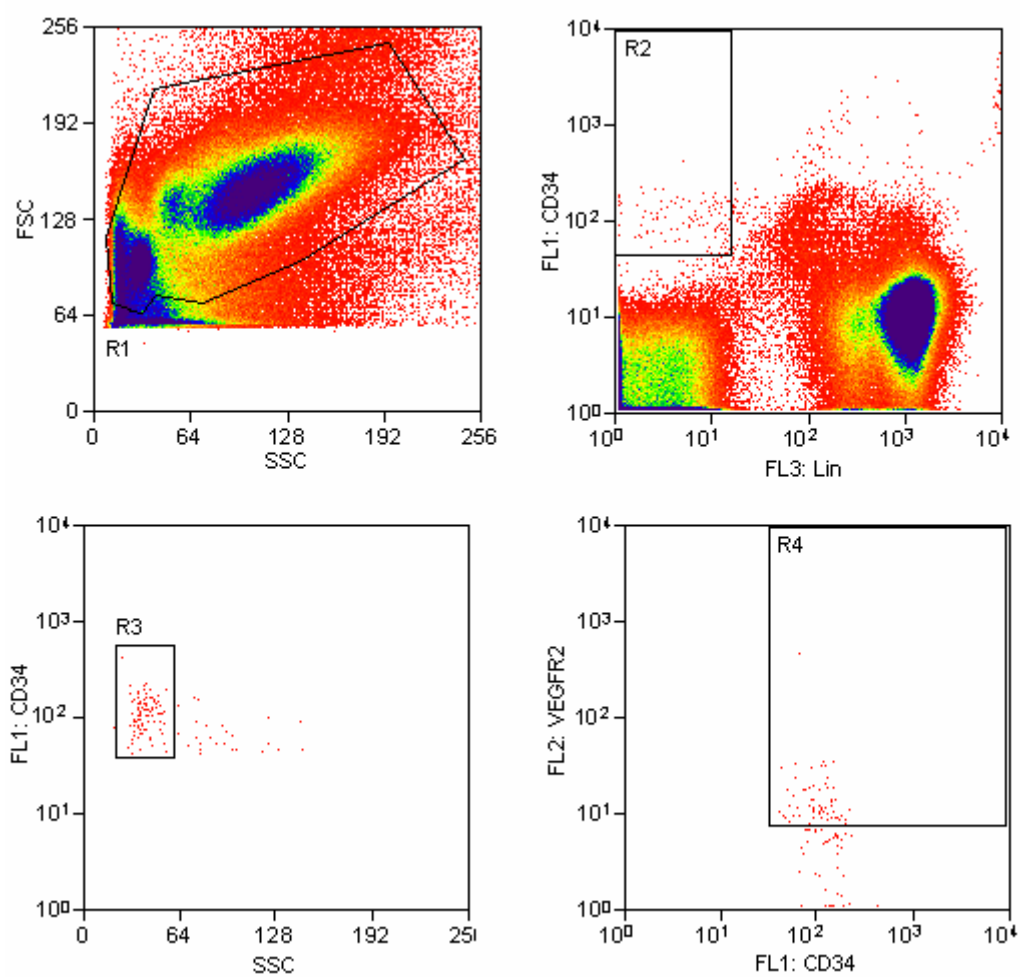
**Obrázek 2** – nastavení kompenzací pomocí vzorků periferní krve značených na CD8+ lymfocyty. Po vymezení lymfocytární populace (A) jsou postupně v jednotlivých kanálech měřeny vzorky periferní krve barvené CD8 FITC (B, C), CD8 PE (D, E) a CD8 PE-Cy5 (F, G).



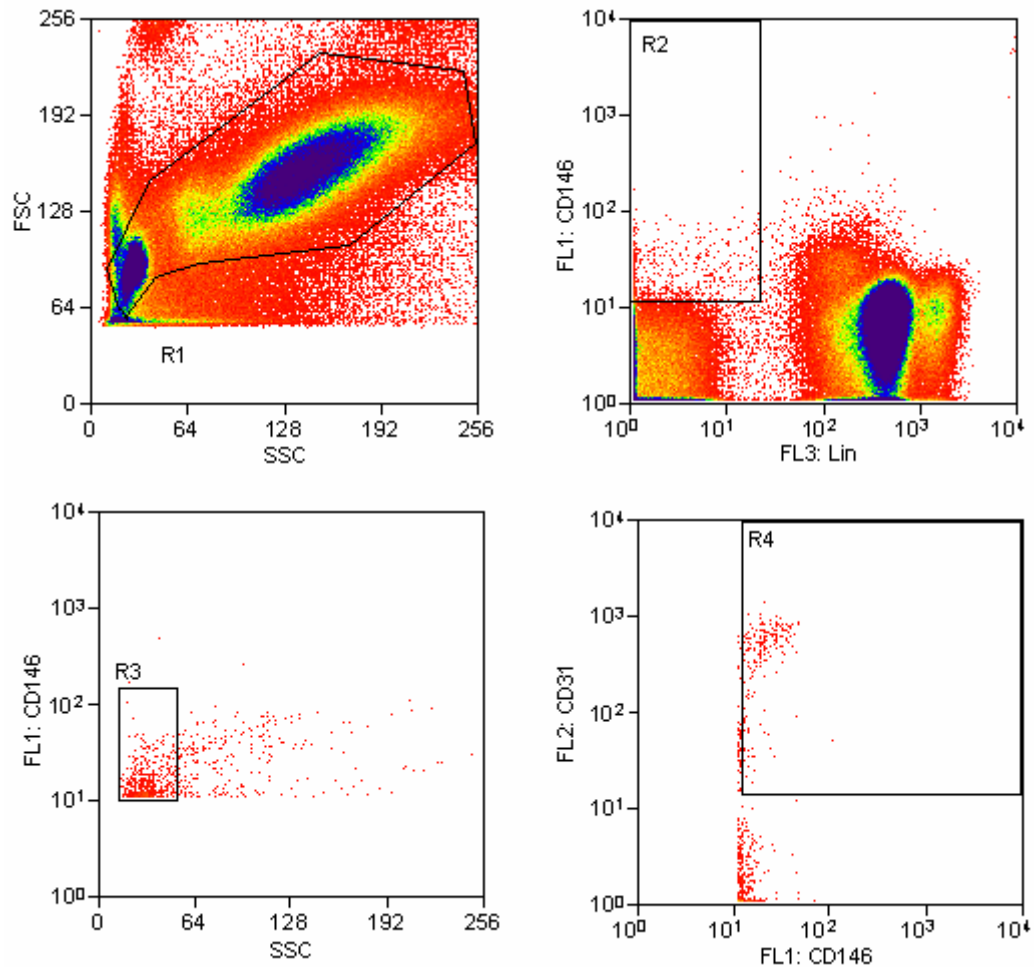
**Obrázek 3** – nastavení PMT rozmezí. PMT rozmezí je nastaveno pomocí multifluorescenčních mikropartikulí s několika excitačními maximy tak, aby fluorescenční kanály obsáhly všechna tato maxima v rozlišitelných rozestupech



**Obrázek 4:** Gatovací strategie pro detekci EPC za použití protilátek anti-CD34FITC, anti-CD133PE a slepého kanálu. V prvním kroku je na FSC-SSC profilu zahrnuta jen leukocytární populace bez buněčné drti (A), druhý gate zahrne buňky pozitivní na CD34 a zároveň negativních ve znacích slepého kanálu (B). Třetí „gate“ zahrnuje jen buňky pozitivní na CD34 s nízkým SSC (C). Na závěr je odečteno množství dvojité pozitivních buněk negativních pro znaky slepého kanálu ( $CD34^+CD133^+Lin^-$ ) (D). Vyloučení nespecifické vazby bylo dále potvrzeno kontrolním měřením obsahujícím protilátky pouze prvního (CD34) a slepého kanálu (E)



**Obrázek 5:** „Gatovací“ strategie pro detekci EPC za použití protilátek anti-CD34FITC, anti-VEGFR2 PE a slepého kanálu



**Obrázek 6:** „Gatovací“ strategie pro detekci CEC za použití protilátek anti-CD146FITC, anti-CD31 PE a slepého kanálu

## 2.2 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“ manózní 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. Epitelo-mesenchymová transformace byla definována na základě koexpresy 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.

## **2.3 Buněčné kultury**

### **2.3.1 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% CO<sub>2</sub>. 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 (SevaPharma), 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% CO<sub>2</sub>. Všechny typy fibroblastů byly před kokultivací s keratinocyty ošetřeny mitomicinem C (Sigma) v dávce 25 µg mL<sup>-1</sup> po dobu 3 h.

### **2.3.2 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<sup>TM</sup> 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<sup>TM</sup> (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada), počet buněk byl stanoven na hematologickém analyzátoru (AcTDiff2, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). 10x10<sup>6</sup> buněk ve 4ml media Endocult<sup>TM</sup> bylo rozděleno do dvou jamek BD BioCoat<sup>TM</sup> Gelatin 6-well plate (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) a kultivováno po 48 hodin při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Následně byla odebrána neadherentní frakce z každé jamky spolu s médiem a dále nasazena v dubletu po



1x10<sup>6</sup> buňkách na jamku BD BioCoat™ Fibronectin 24-well. Od každého vzorku tedy byly do závěrečné kultivace nasazeny 4 jamky po 1x10<sup>6</sup> 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 vřetenovitými 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).

## ***2.4 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.

## ***2.5 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).

### **3. DISKUZE VÝSLEDKŮ PRÁCE**

#### **3.1 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 redukci 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 diferenciacního 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 epitelální 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.

### **3.2 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 kultivačním 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 koreluje 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 nálezný 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.

Dále jsme studovali efekt chemoterapie a G-CSF léčby na CEC a EPC u pacientů podstupujících PBPC mobilizaci před ASCT. G-CSF mobilizoval EPC CD34+CD133+Lin- a CD34+VEGFR2+Lin- (CD34+CD133+Lin- z  $1,6 \times 10^3$ /ml na  $45,8 \times 10^3$ /ml,  $p = 0,01$ , CD34+VEGFR2+Lin- z 57 na 678,4 buněk/ml,  $p = 0,008$ , obojí Wilcoxonův párový test). G-CSF neměl vliv na počty CD146+CD31+Lin- buněk ani CFU-En (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.

Závěrem lze říci, že stromální fibroblasty nádorů mohou vykazovat změněný fenotyp a lze hypotetizovat jejich vznik epitelio-mesenchymální transformací nádorových buněk. Všechny zkoumané s nádorem asociované fibroblasty byly schopné působit fenotypový zvrát normálních keratinocytů, tato regulace byla nezávislá na kontaktních mezibuněčných interakcích. Tato pozorování mohou mít značný vliv v rozvoji terapeutických přístupů k léčbě nádorů kůže.

Měření počtu CFU-En jsme vyloučili jako možnou metodu detekce endotelových progenitorů, neboť se patrně jedná o kolonie vzniklé za spoluúčasti imunitních buněk. Podařilo se nám zavést metodu detekce extrémně vzácných událostí a tu dále aplikovat v klinických studiích, jejichž výsledky identifikují průtokově–cytometrické stanovení endotelových buněk a jejich progenitorů jako přístup se značným diagnosticko-prognostickým potenciálem.

#### **4. SOUHRN**

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.

## **5. SUMMARY**

Analysis of stromal cells of the investigated tumors elucidated alteration of gene expression induced by tumor environment.

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-haematopoietic cells (EPCs, CECs) 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.



## **6. LITERATURA**

1. Ailles LA, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Current Opinion in Biotechnology* 2007;18:460-466
2. Al-Agha OM, Igbokwe AA. Malignant fibrous histiocytoma: between the past and the present. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1030-5.
3. American Cancer Society,  
[http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_2\\_1x\\_What\\_Is\\_Nonmelanoma\\_Skin\\_Cancer\\_51.asp?sitearea=](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_2_1x_What_Is_Nonmelanoma_Skin_Cancer_51.asp?sitearea=)
4. 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.
5. Au P, Daheron LM, Duda DG, Cohen KS, Tyrrell JA, Lanning RM, Fukumura D, Scadden DT, Jain RK. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1302-5
6. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432:332-7.
7. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:339-73.
8. Canalis E. The fate of circulating osteoblasts. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 2014-16
9. Carucci JA. Cutaneous oncology in organ transplant recipients: meeting the challenge of squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2004 Nov;123(5):809-16
10. Dvořánková B, Smetana K Jr, Chovanec M et al. Transient expression of keratin K19 is induced in originally negative interfollicular epidermal cells by adhesion of suspended cells. *Int J Mol Med* 2005;16:525-31.

11. Eghbali-Fatourech 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
12. Eghbali-Fatourech 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
13. Eizawa T., Murakami Y., Matsui K.: Circulating endothelial progenitor cells are reduced in hemodialysis patients. *Curr Med Res Opin.* 2003;19(7):627-33.
14. Fan YS, Carr RA, Sanders DS, Smith AP, Lazar AJ, Calonje E. Characteristic Ber-EP4 and EMA expression in sebaceoma is immunohistochemically distinct from basal cell carcinoma. *Histopathology.* 2007, 51(1), p. 80-6.
15. Folpe AL, Cooper K. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: pleomorphic cutaneous spindle cell tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131: 1517–24.
16. 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.
17. 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.
18. 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
19. Gires O, Muñoz 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.
20. 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

21. Grando SA, Schofield O, Skubitz APN et al. Nodular basal cell carcinoma in vivo vs in vitro. *Arch Dermatol* 1996; 132:1185–93.
22. Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J, Frassoni F, Niederwieser D, Schmitz N, Urbano-Ispizua A; Accreditation Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT); Working Parties Acute (ALWP) Chronic Leukemias (CLWP); Lymphoma Working Party Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe. *Leukemia* 2003; 17: 941-959.
23. Griess, P. (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt Ueber einige azoverbindungen.. *Chem. Ber.* 12, 426-8.
24. Habets JM, Tank B, Vuzevski VD et al. Absence of cytokeratin 8 and inconsistent expression of cytokeratin 7 and 19 in human basal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1988; 8:611–16.
25. 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.
26. Hawley TS a Hawley RG. *Flow Cytometry Protocols*, second edition. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 2004;263:1-32
27. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function and Vascular Risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600
28. Holmén C., Elseikh E., Stenvinkel P., et al.: Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement. *J am Soc Nephrol* 16: 3110-3120, 2005
29. Hugel H. Fibrohistiocytic skin tumors. *J Dtsch Dermatol Ges* 2006;4: 544–55
30. Chang HY, Chi J-T, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS* 2002;99:12877–82.

31. Cheng L, Amini SB, Zaim MT. Follicular basal cell hyperplasia overlying dermatofibroma. *Am J Surg Pathol* 1997;21:711–8.
32. Choi J., Kim K., Huh W.: Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jul;24(7):1246-52
33. Chovanec M, Smetana Jr. K, Betka J, Plzák J., Brabec J., Moya-Álvarez V, André S, Kodet R a Gabius HJ, Correlation of expression of nuclear proteins pKi67 and p63 with lectin histochemical features in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 2005: 27 409-415
34. 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.
35. Jaroszeski MJ a Heller R. *Flow Cytometry Protocols. Methods in Molecular Biology.* Humana Press. 1998;91: 1-24
36. Krahl D, Sellheyer K. Monoclonal antibody Ber-EP4 reliably discriminates between basal cell carcinoma. microcystic adnexal carcinoma and J *Cutan Pathol.* 2007, 34(10), p. 782-7.
37. Kanitakis J, Alhaj-Ibrahim L, Euvrard S, Claudy A Basal Cell Carcinomas Developing in Solid Organ Transplant Recipients *Arch Dermatol* 2003: 139 1133-1137
38. Khan S.S, Solomon M.A, McCoy J. F. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry* 2005: 64B: 1-8
39. Khan SS, Solomon MA, McCoy JF. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry.* 2005:64B:1-8
40. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcz MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Medicine* 2001; 7: 430-436.

41. Kuperwasser Ch, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice PNAS 2004; 14 4966-4971
42. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nature Medicine 2000; 6: 1229-1234.
43. Lane EB, McLean WHI. Keratins and skin disorders. J Pathol 2004; 204:355–66.
44. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. The Journal of Clinical Investigation, 2000; 105: 71-77.
45. Massa M, Rosti V, Ferrario M, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. Blood 2005; 105: 199-206
46. 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.
47. Medina D Stromal Fibroblasts Influence Human Mammary Epithelial Cell Morphology. PNAS 2004; 14 4723-4724
48. Michel M, Tořrořk 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.
49. Michel M, Tořrořk N, Godbout MJ et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. J Cell Sci 1996; 109 (pt 5):1017–28.
50. Mitropoulos P, Norman R Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome): updated review of minimally invasive treatments. Cutis. 2008 Jan;81(1):53-60
51. 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

52. Motlík J, Klíma J, Dvořánková B, Smetana Jr. K Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenology* 2007; 67: 105-115
53. Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M.. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 297: 1058-1061.
54. Oberlin E, Taviani M, Blazsek B, Peault B. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* 2002; 129: 4147-54.
55. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival *Proceedings of National Academy of Sciences* 2001; 98: 10344-10349.
56. Ozgediz D, Smith EB, Zheng J, Otero J, Tabatabai ZL, Corvera CU. Basal cell carcinoma does metastasize. *Dermatol Online J.* 2008 Aug 15;14(8):5.
57. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells *Science* 1999; 284: 143-146.
58. Pytlík R, Trnková M, Trněný M. Autologous hematopoietic cell transplantation in the Czech Republic *Časopis lékařů českých* 2003; 142: 733-735.
59. Rahbari H, Mehregan AH. Adnexal displacement and regression in association with histiocytoma. *J Cutaneous Pathol* 1985; 12: 94-102.
60. 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.
61. 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

62. 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.
63. Rosenberg AE. Malignant fibrous histiocytoma: past, present, and future. *Skeletal Radiol* 2003;32:613–8.
64. Sell S, Stem cell origin of cancer and differentiation therapy, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2004: 51 1-28, a
65. Sell S, *Stem Cells Handbook*, Humana Press, 2004: 1-33, b
66. Sell S, *Stem Cells Handbook*, Humana Press, 2004: 289-296, c
67. 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.
68. Shapiro HM, *Practical Flow Cytometry*, Fourth Edition, Wiley-WCH, 2003
69. 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.
70. Taher A, Pushpanathan C. Plexiform fibrohistiocytic tumor. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1135–7.
71. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T; Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators.. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002; 360: 427-435.
72. Tilli CM, van Steensel MA, Krekels GA et al. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2005; 152:1108–24.

73. Troy T-C, Turksen K. Commitment of embryonic stem cells to an epidermal cell fate and differentiation. *Developmental Dynamics* 2005;232:293 – 300.
74. Tsai RYL, McKay RDG. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* 2002; 16:2991–3003.
75. Tsukamoto H, Hayashibe K, Mishima Y, Ichihashi M The altered expression of alpha-smooth muscle actin in basal cell epithelioma and its surrounding stroma: with special reference to proliferating cell nuclear antigen expression and adenoid differentiation. *Br J Dermatol.* 1994 Feb;130(2):189-94.
76. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, Zhoubné nádory v roce 2004, vydáno 8.2.2007
77. Utikal J, Schadendorf D, and Ugurel S Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res.* 2007 March; 298(10): 469–477.
78. 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.
79. 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.
80. Víték A. Allogenic bone marrow transplantation *Časopis lékařů českých* 2003; 142: 736-740.
81. Watt FM, Hogan BLM Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. *Science* 2000: 25 1427-1430
82. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation* 1998: 97:1837-1847



83. Woyvodt A, Schroeder M, Gwinner W, et al. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small vessel vasculitis. *Lancet* 2003; 361: 206-210
84. 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.
85. Woywodt A, Haubitz M, Buchholz S, Hertenstein B. Counting the costs: markers of endothelial damage in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:1015-23
86. Yamaguchi Y, Itami S, Tarutani M, Hosokawa K, Miura H, Yoshikawa K, et al. Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantarkeratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *J Invest Dermatol* 1999;112:483–8.
87. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Re-defining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cells principals. *Blood*. 2007;109:1801-1809.
88. 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.
89. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood* 2005; 105: 3286-3294