

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Experimentální chirurgie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

**MUDr. Alžběta Jechová**

Studium mezibuněčných interakcí v nádorech

Studies of intercellular interactions in tumors

Typ závěrečné práce: Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. MUDr. Karel Smetana ml., DrSc.

Konzultant: As. MUDr. Zdeněk Čada, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

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

V Praze, 23. 11. 2018

Jechová Alžběta

Podpis

Identifikační záznam:

JECHOVÁ, Alžběta. *Studium mezibuněčných interakcí v nádorech. [Study of intercellular interactions in tumors]*. Praha, 2018. 54 stran, bez příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole, Katedra IPVZ, Anatomický ústav 1. LF UK. Školitel Smetana, Karel.

## Prohlášení autora o podílu na získání výsledků jednotlivých publikací

1. Mifková A., Kodet O., Szabo P., Kučera J., Dvořánková B., André S., Koripelly G., Gabius H.-J., Lehn J.-M., Smetana K. Jr.: **Synthetic Polyamine BPA-C8 Inhibits TGF- $\beta$ 1-Mediated Conversion of Human Dermal Fibroblasts to Myofibroblasts and Establishment of Galectin-1-Rich Extracellular Matrix *in Vitro***. *Chembiochem*. 2014; 15(10):1465-70. **IF 3,088**

Na řešení této problematiky jsem se podílela v celém rozsahu kromě přípravy polyaminu BPA-C8, galektinu-1 a kultury hladkých svalových buněk z krysí aorty.

2. Trylčová J., Bušek P., Smetana K. Jr., Balážiová E., Dvořánková B., Mifková A., Šedo A.: **Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells *in vitro***. *Tumour Biol*. 2015; 36(8): 5873-9. **IF 2,926**

V rámci tohoto projektu jsem byla zodpovědná za kultivaci normálních a nádorově asociovaných fibroblastů a přípravu příslušných kondiciovaných médií. Dále jsem provedla imunocytochemickou detekci Ki67 u vykultivovaných glioblastomových buněk.

3. Živicová V., Brož P., Fík Z., Mifková A., Plzák J., Čada Z., Kaltner H., Fialová Kučerová J., Gabius H.-J., Smetana K. Jr.: **Genome-wide Expression Profiling (with Focus on the Galectin Network) in Tumor, Transition Zone and Normal Tissue of Head and Neck Cancer: Marked Differences Between Individual Patients and the Site of Specimen Origin**. *Anticancer Res*. 2017; 37(5): 2275-2288. **IF 1,865**

Na řešení tohoto projektu jsem se podílela sběrem vzorků a spolupracovala jsem na přípravě vzorků na detekci RNA.

4. Živicová V., Gál P., Mifková A., Novák Š, Kaltner H., Kolář M., Strnad H., Šáchová J., Hradilová M., Chovanec M., Gabius H.-J., Smetana K. Jr., Fík Z.: **Detection of Distinct Changes in Gene-expression Profiles in Specimens of Tumors and Transition Zones of Tenascin-positive/-negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**. *Anticancer Res*. 2018; 38(3): 1279-1290. **IF 1,865**

Můj podíl na této publikaci spočíval ve sběru vzorků, přípravě zmrazených řezů a imunohistochemické detekci tenascinu, fibronektinu a galektinu-1.

5. Jobe N. P., Živicová V., Mifková A., Rösel D., Dvořánková B., Kodet O., Strnad H., Kolář M., Šedo A., Smetana K. Jr., Strnadová K., Brábek J., Lacina L.: **Fibroblasts**

**potentiate melanoma cells *in vitro* invasiveness iduced by UV-irradiated keratinocytes.** *Histochem Cell Biol.* 2018; 149(5): 503-516. **IF 2,164**

Na výsledcích této publikace jsem se podílela kultivací normálních zdravých fibroblastů, nádorově asociovaných fibroblastů a keratinocytů. Dále jsem byla zodpovědná za přípravu lyzátů z kultur obou typů fibroblastů k následné detekci RNA.

## Abstrakt

Nádory jsou tvořené vedle vlastních nádorových buněk také mnoha maligně netransformovanými buněčnými elementy a mimobuněčnou složkou. Toto tzv. nádorové mikroprostředí neboli stroma významně ovlivňuje biologické vlastnosti nádoru prostřednictvím mezibuněčných interakcí. V předkládané disertační práci jsem se soustředila zejména na studium nádorově asociovaných fibroblastů u dlaždicových karcinomů hlavy a krku, maligního melanomu a glioblastomu.

Prezentovaná data ukazují přítomnost buněk s mezenchymálními charakteristikami i ve stromatu glioblastomu, které by mohly mít potenciálně pozitivní vliv na proliferaci a invazivitu glioblastomových buněk.

U maligního melanomu je třeba zohlednit i keratinocyty jakožto hlavní buňku epidermis podílející se na řízení nádorových melanocytů. Kondiciované médium z kokultury UVB ozářených keratinocytů a neozářených fibroblastů stimuluje invazivitu buněk maligního melanomu.

Cílené ovlivnění nádorového stromatu by mohlo znamenat nový směr v onkologické terapii, proto jsme se v další práci zaměřili na vliv syntetického polyaminu na tvorbu myofibroblastů, které jsou aktivní součástí populace nádorově asociovaných fibroblastů. Testovaný polyamin zabraňuje jejich vzniku, ale postrádá efekt na již vytvořené myofibroblasty nebo hladké svalové buňky.

Dále jsme se snažili blíže charakterizovat dlaždicové karcinomy hlavy a krku. U vzorků tumoru, okolní tkáně a kontralaterální zdravé sliznice byl zhotoven genový expresní profil a provedeno imunohistochemické vyšetření s důrazem zejména na galektiny, keratiny, fibronektin a tenascin-C. Zkoumaný možný vztah výskytu galektinu-1, fibronektinu a tenascin-C v extracelulární matrix k prognóze nebyl v našem souboru pacientů podpořen statisticky významnými výsledky.

**Klíčová slova:** nádorové stroma, mezibuněčné interakce, nádorově asociované fibroblasty, extracelulární matrix, polyaminy, dlaždicové karcinomy hlavy a krku, maligní melanom, glioblastom

## **Abstract**

Beside tumor cells themselves, tumors consist of many non-malignantly transformed cellular elements and an extracellular matrix. This so-called tumor microenvironment, or stroma, significantly influences the biological properties of the tumor through intercellular interactions. In this thesis I have focused on the study of tumor-associated fibroblasts in squamous cell carcinomas of the head and neck, malignant melanoma and glioblastoma.

The data show the presence of cells with mesenchymal characteristics, present even in the glioblastoma stroma, which could potentially have a positive effect on proliferative activity and invasiveness of glioblastoma cells.

In malignant melanoma, the presence of keratinocytes should also be considered, as they are the major cells of the epidermis influencing tumor melanocytes. The conditioned medium from UVB irradiated keratinocytes and non-irradiated fibroblasts stimulates the invasion of malignant melanoma cells.

Targeting the tumor stroma may be a new direction in oncological therapy, so we have focused on the influence of synthetic polyamine on the formation of myofibroblasts, which are an active part of the population of tumor-associated fibroblasts. The tested polyamine prevents the formation of myofibroblasts but has no effect on those already formed nor on smooth muscle cells.

We have also attempted to further characterize the squamous cell carcinoma of the head and neck. Samples of the tumor, its surrounding tissue and contralateral healthy mucosa were subjected to RNA analysis and to immunohistochemical examination with particular emphasis on present galectins, keratins, fibronectin and tenascin-C.

There was no statistically significant relation between the presence of galectin-1, fibronectin or tenascin-C within the extracellular matrix and the prognosis of the patients in our dataset.

**Key words:** tumor stroma, intercellular interactions, tumor-associated fibroblasts, extracellular matrix, polyamines, squamous cell carcinomas of the head and neck, malignant melanoma, glioblastoma

## Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Karlu Smetanovi ml., DrSc. za vedení, cenné rady a podporu v průběhu celého postgraduálního studia a prof. MUDr. Janu Plzákovi, Ph.D. a prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc. za podporu a odborné vedení na klinickém pracovišti.

Poděkování patří též mému školiteli konzultantovi MUDr. Zdeňku Čadovi, Ph.D. a všem spolupracovníkům na Anatomickém ústavu, zejména RNDr. Barboře Dvořánkové, Ph.D., RNDr. Pavolovi Szaboovi, Ph.D., MUDr. Zdeňku Fíkovi, Ph.D., MUDr. Ondřeji Kodetovi, Ph.D., MUDr. Lukáši Lacinovi, Ph.D., MUDr. Veronice Bandúrové a MUDr. Janu Kučerovi.

Významně se o publikované výsledky zasloužil rovněž prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc. a jeho spolupracovníci z Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK, RNDr. Michal Kolář, Ph.D., Ing. Hynek Strnad, Ph.D. a jejich kolegové z Ústavu molekulární genetiky AVČR a Njainday Pulo Jobe M.Sc. z Katedry buněčné biologie Přírodovědecké fakulty UK.

Dále bych chtěla poděkovat i zahraničním spolupracovníkům a to hlavně prof. Jeanu-Marie Lehnovi z Univerzity ve Štrasburku a prof. Hansi-Joachimu Gabiusovi z Ústavu fyziologické chemie při Veterinární fakultě Ludwig-Maximilianovy univerzity v Mnichově.

Tato disertační práce by taktéž nemohla vzniknout bez skvělé asistence laboratorních pracovníků Marie Jindrákové a Radany Kavkové.



## Seznam zkratek

3T3 – linie myších fibroblastů (3-day transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells)

A2058 – buněčná linie melanomu

AGO2 – argonaute 2

BCAM – basal cell adhesion molecule

BLM – BRO Lung Metastasis (buněčná linie melanomu)

BMP-4 – bone morphogenetic protein 4

BPA-C8 – acyclic branched polyamine – 8 carbon chain

BRAF – B-Raf

C1QTNF1 – complement C1q tumor necrosis factor 1

CAF – cancer associated fibroblasts

CCL-2 – C-C motif ligand 2

CD(31, 34, 45) – cluster of differentiation (31, 34, 45)

CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CXCL(-1, -12) – chemokine (C-X-C motif) ligand 1

CXCR (-1, -2) – CXC chemokine receptor (-1, -2)

CYP1B1 – cytochrome P450 1B1

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – deoxyribonucleic acid

EBV – Epstein-Barr virus

EGF – epidermal growth factor

EM-G3 – buněčná linie karcinomu prsu

FaDu – buněčná linie spinocelulárního karcinomu hypofaryngu

FAP – fibroblast activation protein

FGF – fibroblast growth factor

Fn - fibronectin

Gal - galektin

GASCs – glioblastoma-associated stromal cells

GFAP – glial fibrillary acidic protein

HaCaT – buněčná linie immortalizovaných kerationocytů

HF – human fibroblasts

HMB-45 – Human Melanoma Black - 45

HPV – human papilloma virus

HT-29 – buněčná linie adenokarcinomu kolon

IGF-2 – insuline-like growth factor 2

IL – interleukin

JAK 2 – janus kinase 2

JAK-STAT – janus kinase – signal transducer and activator of transcription proteins

Ki67 – protein Ki67

LEP – leptin

LIF – leukemia inhibitory factor

LOXL1 – lysyl oxidase homolog 1

LPL – lipoprotein lipase

MELAN-A – specifický melanomový antigen

mRNA – messenger ribonucleic acid

ncRNA – non-coding ribonucleic acid

NF1 – neurofibromin1

NOTCH1 – Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)

p53 – protein 53

PRAME – preferentially expressed antigen in melanoma

PUS7 – pseudouridylate synthase 7

RB1 – retinoblastoma 1

RNA – ribonucleic acid

S100 – protein S100

SMA – smooth muscle actin

Snail – zinc finger protein SNAI1

Sw620 – buněčná linie adenokarcinomu rekta

T98G – buněčná linie glioblastomu

TE-7 - human thymic fibroblasts antibody

Ten - tenascin

TGF ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ) – transforming growth factor ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ )

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor- $\alpha$

U373 – buněčná linie glioblastomu

U87 – buněčná linie glioblastomu

UV – ultraviolet

VEGF – vascular endothelial growth factor

VEGFA – vascular endothelial growth factor A

## Obsah

1. Úvod .....	1
1.1. Obecná onkologie.....	1
1.2. Nádorové mikroprostředí .....	3
1.2.1. Buňky imunitního systému .....	4
1.2.2. Fibroblasty a nádorově asociované fibroblasty .....	4
1.2.3. Extracelulární matrix .....	6
1.2.3.1. Fibronektin.....	7
1.2.3.2. Tenascin.....	8
1.3. Galektiny .....	8
1.4. Polyaminy .....	9
1.5. Nádory zkoumané v disertační práci .....	10
1.5.1. Dlaždicové karcinomy hlavy a krku .....	10
1.5.2. Maligní melanom.....	11
1.5.3. Gliom a glioblastom .....	11
2. Hypotézy a cíle disertační práce .....	13
3. Materiál a metodika.....	14
4. Výsledky.....	16
4.1. Studium dlaždicových karcinomů hlavy a krku .....	16
4.2. Studium nádorového mikroprostředí melanomu a vlivu UVB záření.....	20
4.3. Zhodnocení vlivu nádorově asociovaných fibroblastů u glioblastomu.....	22
4.4. Možnost ovlivnění nádorově asociovaných fibroblastů pomocí syntetických polyaminů .....	24
5. Diskuze .....	26
6. Závěr .....	33
7. Seznam použité literatury .....	34

# 1. Úvod

V rozvinutých zemích, kam patří i Česká Republika, představují onkologická onemocnění druhou nejčastější příčinu úmrtí hned po kardiovaskulárních chorobách. Dle dat z Národního onkologického registru incidence zhoubných nádorů v České republice z dlouhodobého pohledu roste. Navzdory medicínským pokrokům, jak na poli včasné diagnostiky tak terapie, se mortalita významně nemění. Konkrétně v roce 2015 zde podleho zhoubným nádorům 26 852 osob.

V České Republice mezi nádory s nejvyšší incidencí patří nemelanomové kožní nádory, které se díky prognosticky příznivé povaze onemocnění a obvykle včasné diagnóze vyznačují relativně nízkou úmrtností. Mezi další nejpočetnější zhoubné nádory se řadí nádory tlustého střeva a konečníku, nádory průdušnice, průdušek a plic, nádory prsu u žen a nádory prostaty u mužů.

## 1.1. Obecná onkologie

Onkologická onemocnění představují různorodou skupinu chorob, jejichž společným rysem je, že určitá buněčná populace ztratí schopnost tvořit diferencované tkáně, vymkne se kontrole a získá tak schopnost relativně autonomního růstu. Maligní nádory jsou zejména charakteristické tím, že rostou invazivně do okolí a mají potenciál zakládat metastázy.

Mezi nejvýznamnější rizikové faktory nádorových onemocnění se řadí kouření, alkohol, špatné stravovací návyky, nedostatek tělesné aktivity, znečištěné životní prostředí, některá infekční agens (jako např. HPV, EBV) a zejména věk (Danaei et al., 2005, Elinav et al., 2013, Smetana et al., 2016).

Podstata nádorové transformace buňky je genetická. Za poslední desítky let byly objeveny stovky nádorově asociovaných genů. Mutace některých nacházíme opakovaně u mnoha různých typů nádorů (např. p53), mutace jiných jsou typické pro konkrétní nádorové onemocnění (např. genu NF1 u neurofibromatózy nebo genu RB1 u retinoblastomu). Jedná se například o geny signálních drah, kontrolních bodů buněčného cyklu, buněčné diferenciaci, apoptózy, reparace DNA, růstových faktorů a jejich receptorů. V průběhu buněčných dělení jedné buňky nastává postupná akumulace několika mutací v uvedených skupinách genů, které vyúsťují v nádorovou transformaci a genom nádorových buněk se tak trvale mění na mnoha místech. Z toho vyplývá několik zásadních změn v buněčné fyziologii, které společně určují nádorové bujení. Jde o nezávislost na růstových signálech, necitlivost k signálům potlačujícím růst, únik apoptózy, neomezený replikační potenciál, indukce angiogeneze, invazivní šíření,

schopnost zakládat metastázy, změny v buněčném metabolismu, které stimulují nádorovou proliferaci, únik imunitní odpovědi organismu a nestabilitu genomu, která usnadňuje další mutace, které podporují nádorovou progresi (Hanahan a Weinberg, 2000, Hanahan a Weinberg, 2011). Tímto mechanismem nekontrolovaně se dělicí nádorové buňky ztrácejí závislost na organismu (Sulic et al., 2005).

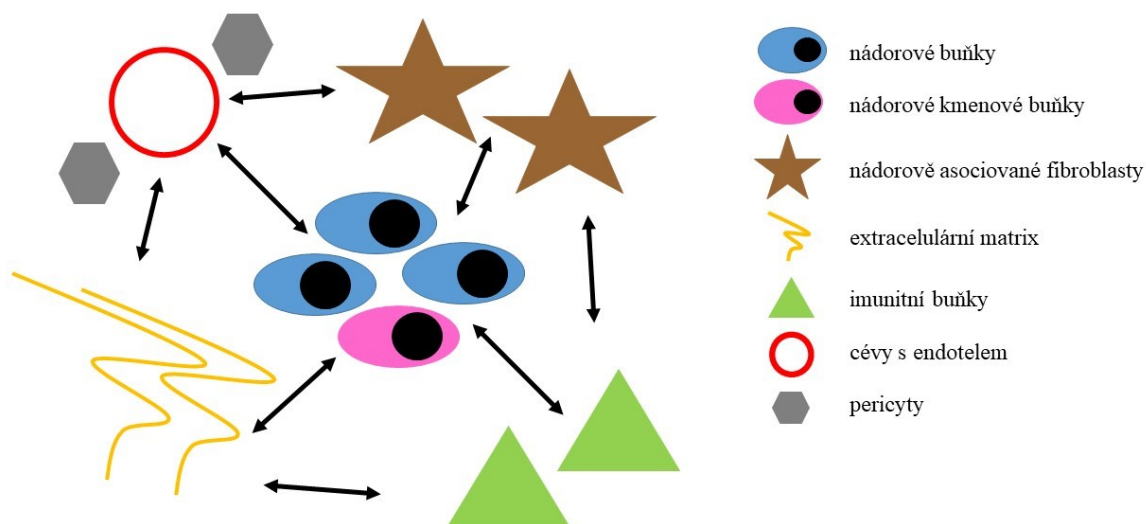
Studium kmenových buněk přineslo mnoho poznatků pro nádorovou biologii a podobně jako u hematologických malignit přineslo koncepci nádorových kmenových buněk i u kompaktních nádorů včetně například nádorů hlavy a krku, glioblastomu, melanomu, nádorů prsu nebo plic (Bonnet a Dick, 1997, Bruce a Van Der Gaag, 1963, Dionne et al., 2015, Esparza et al., 2015, Lang et al., 2013, Luo et al., 2015, Singh a Chellappan, 2014). Nádorové kmenové buňky mají podobné vlastnosti jako buňky kmenové, pro které je charakteristická neomezená schopnost proliferace a diferenciaci, rezistence k anoikis, dlouhý buněčný cyklus a přítomnost membránových proteinů zodpovědných za vylučování xenobiotik. Tyto procesy jsou u zdravých kmenových buněk přísně regulovány, kdežto u nádorových dochází k jejich deregulaci (Chiarugi a Giannoni, 2008, Wicha et al., 2006). Pro tyto jedinečné vlastnosti nádorových kmenových buněk je jejich zásah chemoterapií nebo radioterapií obtížný. Toto se může podílet i na vzniku fatálních komplikací jako je minimální reziduální nemoc a mnohočetná léková rezistence. Jejich cílené ovlivnění by tak mohlo přinést významný pokrok v nádorové terapii (Carnero et al., 2016, Motlik et al., 2007). Původ nádorových kmenových buněk však nebyl doposud jasně definován. Nemusejí výlučně pocházet z tkáňových kmenových buněk, ale mohou vzniknout dediferenciací buněk nádorových v průběhu vývoje nádoru (Woodward a Hill, 2016). Stejně jako normální tkáňové kmenové buňky potřebují pro udržení kmenových vlastností určité mikroprostředí, tak i fungování nádorových kmenových buněk je na mikroprostředí závislé (Dvorankova et al., 2017, Matsuda et al., 2014). Tyto úvahy vedly k vzestupu zájmu o nádorové mikroprostředí.

Na nádory se tak v současnosti nepohlíží jenom jako na skupinu samostatných nádorových buněk, ale jako na komplexní tkáň/orgány tvořené také mnoha maligně netransformovanými buněčnými elementy a mimobuněčnou složkou (Polyak et al., 2009). Toto nádorové mikroprostředí, tzv. nádorové stroma, netvoří pouze pasivní podpůrnou součást nádoru, ale významně ovlivňuje jeho biologické vlastnosti prostřednictvím mezibuněčných interakcí (Fidler, 2003, Li et al., 2007, Lorusso a Ruegg, 2008, Plzak et al., 2010).

## 1.2. Nádorové mikroprostředí

Současné poznatky ukazují, že nádorové stroma je podstatným faktorem v patogenezi onkologických onemocnění (Cirri a Chiarugi, 2011, Dvorak, 2015). Během nádorové progresy se vyvíjí společně s nádorovými buňkami (Polyak et al., 2009, Werb a Lu, 2015). Mezi populací nádorových buněk a jednotlivými buněčnými typy stromatu probíhají neustálé vzájemné interakce buď přímým kontaktem buněk, nebo pomocí signálních molekul, které napomáhají růstu a rozvoji nádoru (Bremnes et al., 2011). Buňky stromatu produkují různé druhy růstových faktorů, chemokinů, cytokinů a podílejí se na přestavbě extracelulární matrix, neoangiogenezi, invazi, metastazování, úniku imunitní odpovědi organismu a rezistenci k onkologické léčbě (Hanahan a Coussens, 2012). Složení nádorového stromatu se liší mezi jednotlivými nádory stejně tak jako i původ jeho buněčné složky, který zatím ještě není zcela definovaný (Kidd et al., 2012). U solidních nádorů je zejména představováno nádorově asociovanými fibroblasty, infiltrujícími imunitními buňkami, extracelulární matrix, kapilárami a pericyty Obr.1. Nádor je tak možno považovat za složitý ekosystém, v němž jednotlivé buněčné typy a jejich produkty ovlivňují chování nádoru (Lacina et al., 2018). Nemí bez zajímavosti, že nádorové mikroprostředí je do značné míry podobné mikroprostředí hojícího se poranění (Gal et al., 2017).

V následující části bude stručně charakterizováno nádorové mikroprostředí a jeho zásadní součásti, zejména ve vztahu k disertaci.



Obr. 1: Obecné schéma nádorového mikroprostředí u solidních tumorů

### 1.2.1. Buňky imunitního systému

Víceméně každý nádor je ve větší nebo menší míře prostoupen buňkami imunitního systému. Někdy se jedná pouze o přítomnost detekovatelnou specifickými protilátkami proti jednotlivým charakteristickým buněčným znakům, jindy jde o masivní infiltraci pozorovatelnou histochemickým barvením (Pages et al., 2010). Dříve se předpokládalo, že se jedná o prostou imunitní odpověď mající za cíl eradikaci tumoru. Nádorově asociovaná imunitní odpověď ale může naopak nádorovou progresi podporovat (DeNardo et al., 2010). Infiltrující imunitní buňky produkcí různých faktorů stimulují proliferaci jak nádorových, tak stromálních buněk. Mezi významnější patří např. epidermový růstový faktor (EGF), transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), fibroblastový růstový faktor (FGF), různé cytokiny, chemokiny, angiogenní faktory (např. vaskulární endotelový růstový faktor VEGF), histamin a hepariny (Balkwill et al., 2005). Navíc sekrecí proteolytických enzymů (metaloproteázy, serinové a cysteinové proteázy) mění strukturu a funkci extracelulární matrix, čímž usnadňují nádorovou invazi a metastazování. Zároveň dochází k uvolnění v extracelulární matrix imobilizovaných růstových faktorů (Kessenbrock et al., 2010, Lu et al., 2011). Dále imunitní buňky produkcí volných kyslíkových radikálů napomáhají nahromadění mutací v nádorových buňkách a s tím spojené nádorové progresi (Grivennikov et al., 2010). V neposlední řadě mohou paradoxně usnadňovat nádorovým buňkám uniknout imunitní odpovědi organismu, kdy například nádorově asociované makrofágy tlumí nádorově specifickou T buněčnou imunitu (Kuang et al., 2009).

### 1.2.2. Fibroblasty a nádorově asociované fibroblasty

Fibroblasty patří mezi významné buňky zdravé pojivové tkáně. Podílejí se na udržování homeostázy mikroprostředí a celistvosti tkání (Madar et al., 2013). Hrají důležitou roli v průběhu hojení ran. Ze začátku jsou atrahovány do místa rány prostřednictvím chemokinů a růstových faktorů uvolněných imunitními buňkami, tam se dále množí a tvoří kolagenem bohatou extracelulární matrix. Dále diferencují v myofibroblasty, definované expresí hladkého svalového aktinu (SMA), které napomáhají svou kontrakcí uzavření rány (Bainbridge, 2013, Garana et al., 1992). Patologický výskyt myofibroblastů bývá spojován s hypertrofickými jizvami, fibromatózou a fibrotickými onemocněními (Desmouliere et al., 2005, Rybinski et al., 2014).

Fibroblasty mohou být identifikovány vizuálně díky jejich vřetenitému tvaru, dále barvením na průkaz vimentinu nebo TE-7 a naopak absencí znaků charakteristických pro



epitelové buňky, svalové buňky, astrocyty nebo buňky hematopoetického původu (Goodpaster et al., 2008, Chang et al., 2002).

Fibroblasty nacházející se v nádorovém stromatu neboli nádorově asociované fibroblasty představují jeho aktivní součást a významně ovlivňují progresi maligních tumorů. Prostřednictvím mezibuněčné komunikace mohou podporovat růst nádoru, jeho lokální invazivitu i jeho schopnost metastazovat (Madar et al., 2013). Často obsahují vlákna hladkého svalového aktinu (SMA) a tím vykazují jistou podobnost s myofibroblasty, které jsou zodpovědné za kontrakci rány během hojení a s myofibroblasty, které se za patologických stavů účastní i tkáňové či orgánové fibrózy. Již dříve bylo dokázáno, že tvorbu myofibroblastů významně podporuje TGF –  $\beta$ 1/3 a galektin-1 s aditivním a na sobě nezávislým účinkem, jsou-li přidány do kultivačního média společně. Kultura normálních zdravých dermálních fibroblastů neobsahuje žádné nebo velmi omezený počet myofibroblastů. Avšak přidání TGF –  $\beta$ 1 nebo  $\beta$ 3, galektinu-1 nebo jejich kombinace do kultivačního média jejich tvorbu výrazně stimuluje. Podobný efekt mají v menší míře i galektiny-3, -4 a -7. Vzniklé myofibroblasty vytvářejí mezibuněčnou hmotu bohatou na fibronektin a galektin-1, kterou je možné použít ke kultivaci keratinocytů bez podpůrných buněk. Tyto keratinocyty navíc vykazují rysy kmenových buněk a exprimují keratin 19 (Dvorankova et al., 2011). Tvorbu myofibroblastů z fibroblastů rovněž potencuje přítomnost HaCaT (imortalizované keratinocyty) nebo FaDu (buněčná linie hypofaryngového karcinomu) v kokultuře. Kromě exprese hladkého svalového aktinu dochází v takto aktivovaných fibroblastech také k expresi jaderného nukleosteminu (marker mnoha kmenových a nádorových buněk) a k produkci hojné extracelulární matrix bohaté na galektin-1 a fibronektin (Szabo et al., 2011). Mikročipová analýza takto ovlivněných fibroblastů ukázala zvýšenou expresi množství genů, jejichž produkty se účastní při hojení ran, což podporuje hypotézu nádoru jako nehojící se rány (Dvorak 1986). Jedná se například o FGF-7, FGF-2, TGF- $\alpha$ , VEGF-A, interleukiny IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2, CXCL-1, IL-6 a IL-8. Ve středu zájmu byly konkrétně interleukin IL-6 a chemokiny IL-8 a CXCL-1 a jejich receptory (CXCR-1, CXCR-2) představující významné signální molekuly pro proces epitelomezenchymové interakce. Tato kombinace cytokinů navozuje fenotyp keratinocytů odpovídající nízké diferenciaci charakterizovaný přítomností keratinu 8 (Kolar et al., 2012). Nádorově asociované fibroblasty izolované ze stromatu dlaždicového karcinomu jazyka se liší od normálních zdravých fibroblastů v expresi 560 genů a navíc 13 z těchto genů představuje geny pro růstové faktory a cytokiny, včetně IGF-2 a BMP-4. Oba tyto faktory jsou schopny

rovněž změnit fenotyp normálních keratinocytů tak, že exprimují keratin 8, což je marker nepříznivé prognózy u dlaždicových karcinomů (Gires et al., 2006, Strnad et al., 2010).

Původ nádorově asociovaných fibroblastů není ještě zcela objasněn. Uvažuje se o jejich možném vzniku z mesenchymálních kmenových buněk kostní dřene, které jsou přitahované do místa nádoru nebo z lokálních fibroblastů, pericytů, makrofágů nebo endotelových buněk aktivovaných vlivem buněk nádorových (De Wever et al., 2008, Kopantzev et al., 2010, Mishra et al., 2008, Mueller et al., 2007, Sugimoto et al., 2006, Zeisberg et al., 2007). Dalším z možných z mechanismů jejich vzniku je epitelo-mezenchymový přechod (Petersen et al., 2003). Tento proces, kdy epitelové buňky získají vlastnosti pohyblivých buněk mezenchymových je fyziologicky velmi důležitý během normálního prenatálního vývoje orgánů a tkání, dále je významný při procesu hojení ran, přispívá k fibróze a uplatňuje se také u maligních nádorů, kde pomáhá epitelovým buňkám metastazovat a získat proinvasivní vlastnosti (Lamouille et al., 2014, Thiery, 2009). Geneticky upravené myší plicní epitelové buňky vytvořené vnesením genů E6 a E7 lidského papilomaviru typu 16 získají morfologické vlastnosti fibroblastů včetně ztráty keratinů. Tím pádem mohou být využity jako model mesenchymálních buněk pocházejících z nádorových epitelových buněk epitelo-mezenchymovým přechodem. Jejich vliv na normální zdravé keratinocyty je významný a podobá se vlivu nádorově asociovaných fibroblastů izolovaných z dlaždicového karcinomu z oblasti hlavy a krku (exprese keratinu 8, 19, vimentinu, přítomnost nucleostemin-pozitivních jadérek) (Smetana et al., 2008). Proti této hypotéze však svědčí *in vivo* experimenty s xenotransplantacemi lidských nádorových buněk (FaDu – lidský dlaždicový karcinom hypofaryngu, Sw620 a HT-29 – lidský adenokarcinom kolorekta) na myší modely (nu/nu myši). V testovaných nádorech bylo stroma vždy myšího původu, protože lidský vimentin nebyl pozorován v nádorově asociovaných fibroblastech (Dvorankova et al., 2015). Lze připustit, že původ nádorově asociovaných fibroblastů nebude u všech nádorů stejný a pravděpodobně můžeme předpokládat i kombinaci výše zmíněných mechanismů vzniku v závislosti na okolních signálech.

### **1.2.3. Extracelulární matrix**

Extracelulární matrix vyplňuje mezibuněčné prostory. Zatímco v parenchymatózních orgánech je její množství minimální, v pojivové tkáni tvoří její převážnou součást. Obdobně se také liší i její zastoupení u různých typů nádorů. Částečně se také vyskytuje v podobě bazální laminy, která se nachází pod buňkami epitelů, ale také obklopuje jednotlivé svalové, tukové a Schwannovy buňky. Extracelulární matrix tvoří pouze mechanickou oporu tkání,

kteřá poutá jednotlivé buňky dohromady, ale rovněž ovlivňuje buněčnou diferenciaci, přežití, tvar, migraci a mezibuněčnou komunikaci (Pickup et al., 2014). Neustále dochází k její produkci buňkami, které obklopuje (zejména fibroblasty) a její degradaci proteázami. Zatímco za embryonálního vývoje a za fyziologických podmínek jsou tyto procesy přísně řízené, v nádorech dochází k jejich deregulaci a anomálie extracelulární matrix mění chování jak nádorových tak stromálních buněk, usnadňuje angiogenezi a podporuje nádorově asociovanou imunitní odpověď (Xia et al., 2016).

Mezi hlavní složky extracelulární matrix patří glykosaminoglykany a proteoglykany, kolagen, elastin, fibrilin, fibronectin, tenasciny a proteiny laminin a nidogen podílející se na stavbě bazální laminy (Halper a Kjaer, 2014). Tyto makromolekuly jsou uspořádané v komplexní trojrozměrnou síť. Jako buněčné receptory a ko-receptory pro složky matrix může sloužit mnoho molekul včetně transmembránových proteoglykanů, ale naprostá většina patří mezi integriny (Ginsberg, 2014, Hynes, 1987). Extracelulární doména integrinů se váže na specifickou sekvenci aminokyselin fibronectinu a lamininu, intracelulární část je připojena k cytoskeletu. Slouží k přichycení buněk k extracelulární matrix a zároveň i k přenosu signálů oběma směry napříč buněčnou membránou a umožňují tak regulaci řady buněčných dějů (Epifano a Perez-Moreno, 2012). Vzhledem k zaměření disertace je dále věnována pozornost fibronectinu a tenascinu.

### **1.2.3.1. Fibronectin**

Fibronectin je velký glykoprotein tvořený dvěma polypeptidovými řetězci navzájem propojenými disulfidovými můstky. Každý řetězec obsahuje pět nebo šest domén s různými vazebnými vlastnostmi, které jsou navzájem spojené flexibilním polypeptidovým segmentem. V lidském genomu existuje jeden gen pro fibronectin, jehož jednotlivé izoformy jsou výsledkem odlišného sestřihu mRNA (Pankov a Yamada, 2002). Jeho produkce bývá větší v nádorovém stromatu a jeho zvýšená syntéza je připisována hlavně nádorově asociovaným fibroblastům (Wang et al., 2016). U dlaždicových karcinomů hlavy a krku exprese onkofetální izoformy ED-B fibronectinu je asociována s horší prognózou (Mhawech et al., 2005). Obdobně v dlaždicových karcinomech dutiny ústní je přítomnost onkofetálního fibronectinu spojována s přítomností uzlinových metastáz a tím pádem s nižším přežitím pacientů (Lyons et al., 2001).

### 1.2.3.2. Tenascin

Dalším významným glykoproteinem extracelulární matrix obratlovců je tenascin. Je hojně zastoupený v extracelulární matrix za embryonálního vývoje, poté se vyskytuje v hojících se ranách a ve stromatu mnoha tumorů. Existují čtyři varianty tenascinu a to tenascin-C, tenascin-R, tenascin-X a tenascin-W (Hsia a Schwarzbauer, 2005). Tenascin má hexamerní strukturu, kde jednotlivé podjednotky obsahují různý počet EGF a fibronektin III domén (Chiquet-Ehrismann a Chiquet, 2003, Jones a Jones, 2000).

Tenascin-R je specifický pro nervový systém (Hsia a Schwarzbauer, 2005, Probstmeier et al., 2001). Tenascin-X se převážně nachází v kosterní a srdeční svalovině, jeho mutace je asociována s Ehlers-Danlosovým syndromem (Chiquet-Ehrismann, 1995, Schalkwijk et al., 2001). Tenascin-W je exprimován v ledvinách, hladké svalovině, vyvíjející se kosti a periostu v dospělosti (Scherberich et al., 2004). Největší pozornost je věnována tenascinu-C. Za embryonálního období se nachází v mnoha vyvíjejících se orgánech a tkáních zejména nervového systému, šlachách a vazech, po narození je jeho přítomnost silně redukována, ale k jeho expresi dochází za patologických podmínek jako je infekce, zánět a nachází se i ve stromatu mnoha typů nádorů (Chiquet-Ehrismann, 1995, Chiquet-Ehrismann a Chiquet, 2003). Díky multidoménové struktuře má schopnost reagovat s mnoha proteiny (např. s fibronektinem) a ovlivňovat tak řadu dějů jako je například buněčná migrace, adheze, proliferace a diferenciace (Xia et al., 2016). Tenascin-C vyskytující se ve stromatu nádorů má vliv na tumorigenezi, metastazování a nádorovou progresi (Jones a Jones, 2000, Midwood et al., 2011).

### 1.3. Galektiny

Většina proteinů včetně proteinů podílejících se na vytváření nádorového mikroprostředí prochází základní posttranslační modifikací glykosylací. Cukerné motivy tvořené jednotlivými monosacharidy vzájemně propojenými glykosidickou vazbou jsou specificky rozeznávány lektiny. Jsou to proteiny bez enzymatické aktivity, které nejsou schopné účinkovat jako imunoglobuliny. Můžeme tak hovořit o třetí abecedě živých organismů, někdy zvané glykokód, jejíž rozluštění je v centru zájmu biologů (Solis et al., 2015).

Galektiny patří mezi živočišné tzv. endogenní lektiny, pro které je charakteristická schopnost vázat  $\beta$ -galaktosidy (Barondes et al., 1994). Zatím bylo popsáno 15 savčích galektinů a podle struktury je dělíme na 3 základní podskupiny: prototypové, chimérické a

„tandem repeat“ (Lahm et al., 2004, Noda et al., 2017, Smetana et al., 2003). Interagují s glykokonjugáty, tzn. sacharidovými strukturami spojenými s proteiny, peptidy a lipidy a tímto způsobem dešifrují informace zakódované glykosylací a účastní se tak při regulaci široké škály procesů včetně zánětu, angiogeneze, apoptózy a kancerogeneze (Astorgues-Xerri et al., 2014, de la Fuente et al., 2012, Thijssen et al., 2006). V kancerogenezi jsou nejvíce diskutovány galektiny-1, -3 a -7 (Camby et al., 2006, Kaur et al., 2016, Song et al., 2014).

Zvýšená exprese galektinu-1 ve stromatu nádoru souvisí s řadou procesů spojených s progresí nádorových onemocnění, včetně stimulace růstu nádorů, metastatického šíření, angiogeneze a potlačením apoptózy a imunitní odpovědi (Cada et al., 2008, Cousin a Cloninger, 2016). Přítomnost galektinu-1 ve stromatu dlaždicových karcinomů hlavy a krku je asociována s výskytem myofibroblastů. Nejvýznamnější zastoupení myofibroblastů vykazovaly karcinomy patrové mandle, nebyla ale nalezena žádná korelace s HPV infekcí, ani s TNM klasifikací. U galektin-1 a SMA pozitivních tumorů docházelo v nádorových buňkách ke zvýšené transkripci genů souvisejících s horší prognózou (Valach et al., 2012).

Zvýšená exprese galektinu-3 je rovněž typicky spojená s nádorovou progresí, metastatickým potenciálem a potlačením imunitní odpovědi organismu (Farhad et al., 2018). V dlaždicových karcinomech hlavy a krku byla naopak prokázána pozitivní asociace galektinu-3 s úrovní diferenciace, absencí postižení lymfatických uzlin a tím pádem i lepší prognózou (Plzak et al., 2004).

Role galektinu-7 je oproti dvěma předchozím méně prozkoumána. Nachází se přednostně ve stratifikovaných epitelech, kde podporuje homeostázu a uplatňuje se v procesech proliferace, apoptózy, diferenciace a migrace. K jeho abnormální expresi dochází u různých typů nádorů zejména karcinomů (Advedissian et al., 2017).

#### **1.4. Polyaminy**

Polyaminy patří mezi organické sloučeniny, které se řadí mezi dusíkaté deriváty uhlovodíků. Jsou odvozené od amoniaku náhradou jednoho až tří vodíků alkylovou nebo arylovou skupinou. Podle počtu substituentů na atomu dusíku se rozlišují aminy primární, sekundární a terciární (Poste et al., 2014). Sloučeniny obsahující více než jednu aminoskupinu se označují jako polyaminy (Lefevre et al., 2011). Mají silný pozitivní náboj, takže jsou schopné asociace s negativně nabitými molekulami včetně DNA, RNA a proteinů (Kusano et al., 2008).

Polykationty včetně polyaminů ovlivňují aktinový cytoskelet. Vzhledem k pozitivnímu náboji dokáží indukovat tvorbu svazků aktinových vláken prostřednictvím

nespecifických elektrostatických interakcí eliminací odporu mezi jednotlivými molekulami G-aktinu nebo mezi aktinovými vlákny (Muhlrad et al., 2011, Oriol-Audit et al., 1985, Tang a Janmey, 1996). Cyklické i acyklické polyaminy včetně polyaminu BPA-C8 (branched acyclic polyamine) stimulují tvorbu lamelopodií bohatých na aktin u 3T3 fibroblastů (Nedeva et al., 2013). Dále je zajímavé že pavetamin, toxický polyamin rostlinného původu (původně izolovaný z rostliny *Pavetta harborii*), je kardiotoxický pro přežvýkavce. Zvířata umírají na srdeční selhání po 4-8 týdnech od pozření rostlin obsahujících pavetamin. Pavetamin způsobuje v kardiomyocytech degradaci nebo změnu uspořádání několika klíčových stavebních proteinů jako je např. myosin, titin, aktin nebo  $\beta$  tubulin (Ellis et al., 2010).

## **1.5. Nádory zkoumané v disertační práci**

### **1.5.1. Dlaždicové karcinomy hlavy a krku**

Nádory hlavy a krku představují značně heterogenní skupinu onemocnění, kam patří nádory dýchacích a polykacích cest, ale i nádory štítné žlázy, slinných žláz a kůže. Nejvíce zastoupené, když vyřadíme kožní nádory, jsou dlaždicové karcinomy hltanu, dutiny ústní a hrtanu. Dlaždicové karcinomy hlavy a krku tvoří asi 7% všech malignit (Perri et al., 2015).

Nejvýznamnějšími rizikovými faktory je kouření a alkohol působící synergicky. V současné době je zvýšená pozornost věnována karcinomům orofaryngu způsobeným lidskými papilomaviry, jejichž incidence stoupá. Na rozdíl od přechozí skupiny postihují nižší věkovou kategorii pacientů, kteří mají lepší socioekonomický status (Okami, 2016). Jsou citlivější na onkologickou léčbu a mají příznivější prognózu (Ang et al., 2010).

V časných stádiích jsou dlaždicové karcinomy hlavy a krku dobře léčitelné jedinou léčebnou modalitou (chirurgie nebo radioterapie), ale značný problém představují pokročilá stadia onemocnění a recidivy. Zde i přes rozvoj chirurgických technik včetně využití moderních přístrojů a nových onkologických léčebných režimů, je terapie těchto tumorů svízelná a pětileté přežití zůstává stále nízké (Guidi et al., 2018). Navíc často chirurgická i onkologická léčba znamenají pro pacienta mutilující zákroky a proto je cílem nalézt rovnováhu mezi dostatečnou radikalitou terapie a ještě přijatelným negativním dopadem na kvalitu života. Prognostická výhoda pacientů s karcinomy etiologicky vázanými na papilomaviry by mohla potenciálně vést ke změně deeskalovaným léčebným režimům (Koslabova et al., 2013, Windon et al., 2018). Zároveň je snahou objevit další nové specifické znaky, které by tyto nádory lépe charakterizovaly a napomohly tak k výběru individuálně přizpůsobené optimální léčebné strategie.

### **1.5.2. Maligní melanom**

Maligní melanom je nejzávažnějším nádorem kůže. V USA představuje šesté nejčastější zhoubné onemocnění mužů a sedmé u žen (Siegel et al., 2018). Jeho incidence celosvětově stoupá, postihuje zejména bílou populaci žijící v Austrálii, z Evropy potom obyvatelstvo skandinávských zemí a Švýcarska (Rastrelli et al., 2014). Vychází z melanocytů a řadí se mezi neuroektodermové nádory (Dvorankova et al., 2017). Na rozdíl od ostatních kožních nádorů jako je dlaždicový karcinom nebo bazaliom není pro melanom typický lokálně agresivní růst, ale je nebezpečný zejména svým časným hematogenním nebo lymfogením metastazováním (Abbas et al., 2014).

Hlavním rizikovým faktorem je expozice ultrafialovému záření (UV), zejména UVB. To ale není pro vznik melanomu podmínkou, což dokazuje výskyt melanomu i na místech chráněných před slunečním zářením, jako je například sliznice, oční cévnatka nebo kůže pod nehty (Gilain et al., 2014). Je prokázáno, že dětská kůže je mnohem citlivější na UV záření a že přehnaná expozice slunci dětí do 10 let je rizikovým faktorem pro rozvoj melanomu v dospělosti (Volkmer a Greinert, 2011).

Existují čtyři základní histologické typy melanomu a to povrchově se šířící melanom, lentigo maligna melanom, akrolentiginózní melanom a nodulární melanom. Nejvýznamnějším prognostickým faktorem je hloubka invaze, se kterou souvisí i pravděpodobnost zakládání metastáz, dalšími negativními prognostickými faktory je přítomnost ulcerací a počet mitóz (Abbas et al., 2014, Breslow, 1970).

Základem terapie je chirurgická resekce tumoru s případnou adjuvantní onkologickou léčbou včetně cílené biologické terapie, která dosáhla mohutného rozvoje v posledním desetiletí. Blokáda signální transdukce (inhibice BRAF) a zvýšení protinádorové imunity (blokáda CTLA-4) vedou ke zlepšení přežití (Maverakis et al., 2015). Navzdory medicínským pokrokům zůstává ale prognóza pokročilých stádií onemocnění špatná s mediánem přežití u metastazujícího melanomu 18 měsíců (Hogan et al., 2018).

### **1.5.3. Gliom a glioblastom**

Mozkové nádory zahrnují jak nádory vycházející přímo z mozkové tkáně, tzv. primární mozkové tumory, tak metastázy jiných nádorů, tzv. sekundární mozkové tumory. Nádory z neuronů jsou vzácné a tak mezi nejčastější primární mozkové nádory patří nádory z glie, tzv. gliomy.

Nejvíce zastoupený gliom mozku představuje astrocytom, který má řadu histologických forem s různým stupněm malignity. Světová zdravotnická organizace (WHO) rozděluje astrocytomy podle histologických rysů do čtyřech skupin s odlišnou prognózou:

1. grade I (pilocytární astrocytom)
2. grade II (difúzní astrocytom)
3. grade III (anaplastický astrocytom)
4. grade IV (glioblastom, dříve glioblastoma multiforme).

Nádory grade III a IV jsou považovány za maligní (Wen a Kesari, 2008). Grade dle WHO je přiřazen na základě určitých patologických rysů jako je jaderná atypie, mitotická aktivita, vaskulární proliferace, nekróza, proliferativní potenciál, klinický průběh a výsledek léčby (Louis et al., 2016, Weller et al., 2015).

Mezi rizikové faktory pro rozvoj glioblastomu patří expozice terapeutickým dávkám ionizujícího záření, vinyl chlorid, pesticidy, kouření, práce při rafinaci ropy nebo v oblasti výroby syntetického kaučuku (Wrensch et al., 2002).

Maligní gliomy se obvykle projevují subakutními a progresivními neurologickými symptomy, které se liší v závislosti na umístění a velikosti nádoru v mozku a rozvíjejí se typicky v průběhu dnů až týdnů. Mezi nejčastější příznaky patří bolesti hlavy, epileptické záchvaty, ztráty paměti, motorické deficity, vizuální příznaky, poruchy řeči, kognitivní deficit a změna osobnosti (Chang et al., 2005).

Primární léčba maligních gliomů je chirurgická s cílem maximálního odstranění tumoru s co nejmenším poškozením nervových funkcí. Bývá doplněná následnou frakcionovanou radioterapií s konkomitantní nebo adjuvantní chemoterapií. V poslední době se věnuje pozornost porozumění počáteční molekulární patogeneze těchto nádorů. Jsou zkoumány změny buněčných signálních transdukčních cest, výskyt rezistence na terapii a hledají se nové metody pro snadnější pronikání léčiv přes přirozenou hematoencefalickou bariéru (Alifieris a Trafalis, 2015). I přes toto úsilí je prognóza všech maligních gliomů všeobecně velmi špatná (Simonelli et al., 2018).



## **2. Hypotézy a cíle disertační práce**

Nádory jsou tvořené vlastními nádorovými buňkami a nádorovým stromatem, které je představováno buněčnou složkou, kde důležitou roli hrají nádorově asociované fibroblasty a jejich produkty a extracelulární matrix. Neustále zde probíhá komunikace mezi jednotlivými komponentami a nádorové mikroprostředí podmiňuje diferenciaci, lokální agresivitu a metastazování transformovaných buněk.

### **Cílem této disertační práce je:**

1. bližší charakteristika dlaždicových karcinomů hlavy a krku, a hledání nových prognostických markerů vzhledem k charakteru extracelulární matrix.
2. zhodnocení vlivu UVB záření na nádorové stroma melanomu, konkrétně keratinocyty a následný efekt na melanomové buňky.
3. studium možné role nádorově asociovaných fibroblastů u glioblastomu.
4. testování syntetického polyaminu jako potencionálního léčiva cíleného na nádorové stroma, konkrétně nádorově asociované fibroblasty.

..

### 3. Materiál a metodika

V kapitole jsou shrnuty pouze hlavní metodické postupy a detailní popis jednotlivých pokusů je uveden v předkládaných publikacích, které jsou součástí disertační práce.

V pokusech byly využity vzorky tkání různých typů tumorů, tkáně z histologicky normálních okrajů chirurgických resektů, vzorky kontrolní zdravé tkáně a pro získání kultury bohaté na myofibroblasty i vzorky pankreatu postiženého chronickým zánětem. Všechny vzorky se odebíraly po souhlasu etické komise s příslušným informovaným souhlasem pacientů v souladu s Helsinskou deklarací. Odběr vzorků dlaždicových karcinomů, tkáně z okolí nádoru (okraje chirurgického resektu) a kontrolní zdravé tkáně z kontralaterální bukální sliznice se realizoval na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN Motol, Katedra IPVZ. Ze vzorku karcinomu se připravily i nádorově asociované fibroblasty. Pro získání primární kultury lidských zdravých normálních fibroblastů a keratinocytů se využilo vzorků kůže od zdravých žen, které podstoupily estetickou operaci poprsí na Klinice plastické chirurgie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady 3. LF UK. Další typ nádorově asociovaných fibroblastů (MAM, VEM, ZAM) byl získán ze vzorků kožních metastáz primárního nodulárního melanomu od pacientů léčených na Dermatologické klinice VFN a 1. LF UK. Populace fibroblastů bohatá na myofibroblasty se připravila ze vzorků tkáně pankreatu získaných od pacienta s chronickou pankreatitidou, který podstoupil chirurgický zákrok na I. chirurgické klinice hrudní, břišní a úrazové chirurgie VFN a 1. LF UK. Vzorky tkáně glioblastomu byly odebrány od 20 pacientů operovaných na Neurochirurgickém oddělení Nemocnice na Homolce. Vzorky tkání se dále zpracovaly k izolaci primárních kultur a ke zhotovení zmražených řezů.

Primární kultura hladkých svalových buněk z krysí aorty byla připravena a poskytnuta Doc. MUDr. Lucií Bačákovou CSc. z Fyziologického ústavu Akademie věd České Republiky.

K pokusům jsme dále použili tři standardně komerčně dostupné nádorové linie lidských glioblastomů. Linie U87 byla získána od Cell Lines Service (CLS, Německo), linie U373 a T98G poskytla American Type Culture Collection (LGC Standards, UK) a melanomovou linii BLM jsme obdrželi od L. van Kempen and J. H. J. M. van Krieken, Department of Pathology, Radboud University, Nimegen Medical Centre, the Netherlands. Komerčně dostupná melanomová linie A2058 byla zakoupena od ATCC® HTB-43™ (Teddington, UK).

Kultivace buněk probíhala v laboratoři tkáňových kultur za použití příslušných kultivačních plastů (desky, lahve, inzertní systémy, Petriho misky) v inkubátorech za teploty

37° C a při řízené atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> za specifických podmínek podle charakteru a potřeb příslušných pokusů.

Ozáření keratinocytů UVB světlem proběhlo za pomoci přístroje CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP, LLC Upland, Canada) a k posouzení míry poškození DNA se využilo jednobuněčné gelové elektroforézy (kometový test).

Zkoumané znaky jsme znázornili metodou nepřímé imunofluorescence za použití buď komerčně dostupných protilátek nebo protilátek připravených a poskytnutých spolupracujícím pracovištěm (Hans-Joachim Gabius, Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany), které zároveň dodalo i galektiny využitě v jednotlivých pokusech.

Výsledky se analyzovaly na Anatomickém Ústavu 1. LF UK za pomoci fluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse 90i) nebo na Ústavu biochemie a experimentální onkologie na konfokálním mikroskopu Olympus IX 81.

Polyamin BPA-C8 poskytla spolupracující laboratoří prof. Jean-Marie Lehna, Institut de Sciences et d'Ingénierie Supramoléculaire (ISIS), Université de Strasbourg. V pokusech byly použity tři koncentrace BPA-C8 (20 μM, 50 μM a 100 μM) zvolené s ohledem na dřívější pokusy s tímto polyaminem testující jeho vliv na tvorbu lamellipodií u NIH3T3 buněk (Nedeva et al., 2013).

Migrující buňky glioblastomu obarvené metylénovou modří se manuálně spočítali za pomoci mikroskopu Olympus IX70, zvětšení 200x. Jinak byly buňky počítány automatickým přístrojem Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter, CA, USA).

Pro vyhodnocení míry senescence a proporce mrtvých buněk v kultuře sloužily běžně komerčně dostupné kity (CS0030-1KT, 04511 Sigma-Aldrich, Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, Invitrogen).

Transkripční profil studovaných buněk a tkání se stanovil za spolupráce s Ústavem molekulární genetiky AV, v.v.i., Oddělení genomiky a informatiky. Detailní postup je rozveden v jednotlivých publikacích. Statistická analýza je rovněž podrobněji popsána v příložených publikacích.

## 4. Výsledky

### 4.1. Studium dlaždicových karcinomů hlavy a krku

Živicová V., Brož P., Fík Z., Mifková A., Plzák J., Čada Z., Kaltner H., Fialová Kučerová J., Gabius H.-J., Smetana K. Jr.: **Genome-wide Expression Profiling (with Focus on the Galectin Network) in Tumor, Transition Zone and Normal Tissue of Head and Neck Cancer: Marked Differences Between Individual Patients and the Site of Specimen Origin. (Studium celogenomového expresního profilu (se zaměřením na síť galektinů) v nádoru, ve tkáni z okolí nádoru a normální tkáni u nádorů hlavy a krku: Se soustředěním na rozdíly mezi jednotlivými pacienty a typem vzorku)** *Anticancer Res.* 2017; 37(5): 2275-2288.

Prognóza pacientů s nádorovým onemocněním se odvíjí od mnoha parametrů, mezi něž patří typ a umístění nádoru, stádium onemocnění, radikalita chirurgické resekce a u dlaždicových karcinomů hlavy a krku se diskutuje i vliv papilomavirové infekce.

V současnosti je soustředěna pozornost na hledání nových prognostických markerů na poli molekulární biologie, které by mohly být i eventuálně využitelné jako cíle biologické léčby.

V této studii byla provedena celogenomová sekvenační analýza ve spolupráci s Institute of Applied Biotechnologies, Praha u vzorků odebraných od sedmi pacientů s dlaždicovým karcinomem orofaryngu, kteří podstoupili chirurgickou léčbu na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN Motol, Katedra IPVZ. Od každého pacienta byl zkoumán vzorek tkáně tumoru, tkáně z okolí tumoru (okraj chirurgického resekatu) a normální tkáně z kontralaterální zdravé bukální sliznice. Dále byly vzorky podrobeny imunohistochemické analýze na přítomnost galektinů a keratinů. Toto umožňuje jak charakterizování jednotlivých typů vzorků podle místa odběru, tak stanovení interindividuální variability mezi jednotlivými pacienty.

Studium expresního profilu se týkalo 25 832 genů a pseudogenů a zkoumaly se rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Expresní profil tumoru se liší od profilu zdravé tkáně ve 281 genech a profil tkáně z okolí tumoru od zdravé tkáně v 276 genech. Byla detekována určitá podobnost mezi tumorem a nepostiženou tkání v jeho okolí.

Konkrétně dochází ke zvýšené expresi galektinu-1, -2, -4, -8 a -9 u tumoru v porovnání se zdravou tkání s největším rozdílem u galektinu-4, naopak exprese galektinu-7 je snižena u většiny pacientů. Obdobný trend byl zaznamenán i u porovnání tkáně z okolí tumoru a zdravé tkáně. Výsledky vykazovaly značnou interindividuální variabilitu.

Expres CXCL-1, IL-6 a IL-8 byla zvýšená u tumoru a tkáně z jeho okolí v porovnání se zdravou tkání. Expres keratinů 5 a 6 byla celkově nižší u tkáně z okolí tumoru než u zdravé tkáně. U keratinů 8, 14, 17 a 19 docházelo ke zvýšení exprese u tumoru oproti zdravé tkáni. Keratin 8 a 19 byl rovněž ve větší míře exprimován ve tkáni z okolí tumoru, ale naopak exprese genů pro keratin 14 a 17 byla nižší než u zdravé tkáně. Úroveň transkripce všech studovaných keratinů mimo keratin 19 byla nižší u tkáně z okolí tumoru než u tumoru.

Imunohistochemická analýza ukazovala rovněž velkou variabilitu mezi vzorky odebranými od jednotlivých pacientů. Galektin-1 a -3 byl detekován ve stromatu nádoru. Galektin-3 se dále nacházel v epitelu u vzorků tumoru a okolní tkáně. Epitel zdravé tkáně byl na galektin-3 negativní nebo vykazoval pouze velmi slabý signál. Galektin-4 jsme nezaznamenali u zdravé tkáně ani u tumoru. Omezené množství galektin-7 pozitivních buněk se vyskytovalo ve dvou vzorcích tumoru. U zdravé tkáně pět vzorků bylo pozitivních na galektin-7 a dva negativní. Galektin-8 nebyl detekován. Signál pro galektin-9 jsme pozorovali v bazální vrstvě u dvou vzorků zdravé tkáně a u tumoru a okolní tkáně byl detekován v infiltrujících leukocytech.

Imunohistochemická analýza keratinů 8, 14, 17 a 19 byla obdobně jako u galektinů značně interindividuálně variabilní. Pozitivní byly zejména vzorky tumorů. Keratin 8 se nevyskytoval u zdravé tkáně. Keratiny 14, 17 a 19 jsme detekovali u většiny tumorů. Keratiny 14 a 19 se rovněž nacházeli v bazální vrstvě normálního zdravého epitelu, ale také u tkáně z okolí tumoru.

**Živicová V., Gál P., Mifková A., Novák Š, Kaltner H., Kolář M., Strnad H., Šáchová J., Hradilová M., Chovanec M., Gabius H.-J., Smetana K. Jr., Fík Z.: Detection of Distinct Changes in Gene-expression Profiles in Specimens of Tumors and Transition Zones of Tenascin-positive/-negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. (Detekce změn v genové expresi u vzorků z nádoru a chirurgického okraje nádoru u tenascin pozitivních a negativních dlaždicových karcinomů hlavy a krku.)**  
*Anticancer Res.* 2018; 38(3): 1279-1290.

V této práci jsme pokračovali ve studiu vzorků dlaždicových karcinomů hlavy a krku, makroskopicky nepostižené sliznice z okolí tumorů a zdravé tkáně z kontralaterální sliznice dutiny ústní získaných od 80 pacientů léčených pro dlaždicový karcinom hlavy a krku, a to zejména se zaměřením na možný vztah mezi vlastnostmi extracelulární matrix a rozdíly v expresním profilu a prognózou.

Tyto vzorky byly podrobeny imunohistochemické analýze za použití specifických protilátek na přítomnost tenascinu-C (Ten), fibronektinu (Fn) a galektinu-1 (Gal-1) jakožto složek extracelulární matrix a u 26 vzorků byl ve spolupráci s ÚMG AVČR zhotoven RNA expresní profil se soustředěním na rozdíly mezi Ten<sup>+</sup> a Ten<sup>-</sup> nádory jak u vzorků vlastního nádoru tak okolní tkáně. Zajímavým faktem je, že existuje určitá podobnost ve výskytu Ten a Gal-1. Tyto proteiny se nenacházely ve většině vzorků normální sliznice a sliznice z okolí tumoru, ale byly silně exprimovány ve vzorcích karcinomu. Vzorky Fn<sup>+</sup> a Fn<sup>-</sup> byly přibližně stejně zastoupené u zdravé sliznice, kdežto vzorky tumoru i tkáně z okolí vykazovaly spíše Fn pozitivitu. Kombinace exprese Ten<sup>+</sup>Fn<sup>+</sup>Gal-1<sup>+</sup> se vyskytuje statisticky významně častěji ve vzorcích nádoru (55%) než u zdravé tkáně (9%) a naopak kombinace Ten<sup>-</sup>Fn<sup>+</sup>Gal-1<sup>-</sup> (45%) a Ten<sup>-</sup>Fn<sup>-</sup>Gal-1<sup>-</sup> (39%) je častější ve vzorcích zdravé tkáně než u nádoru (3% a 4%). U vzorků z blízkosti nádoru se jednotlivé kombinace vyskytují v obdobném procentuálním zastoupení (Ten<sup>+</sup>Fn<sup>+</sup>Gal-1<sup>+</sup> - 24%, Ten<sup>-</sup>Fn<sup>+</sup>Gal-1<sup>-</sup> - 36%, Ten<sup>-</sup>Fn<sup>-</sup>Gal-1<sup>-</sup> - 33%).

Nebyl prokázán žádný relevantní vztah mezi pozitivitou pro Ten, Fn nebo Gal-1 a stupněm postižení lymfatických uzlin (N stádium) a nebyl ani zaznamenán statisticky významný rozdíl v prognóze u Ten<sup>+</sup> a Ten<sup>-</sup> nádorů, i když je zde patrný určitý trend, že pacienti s Ten<sup>+</sup> nádory jsou na tom lépe jak v celkovém dvouletém přežití, tak i v pětiletém přežití bez známek recidivy. Pacienti, u kterých naopak byla prokázána Ten negativita v normální tkáni, mají lepší prognózu, co se týká pětiletého přežití bez známek recidivy (statisticky významný výsledek). Nezdařilo se objevit žádný vztah mezi výskytem Fn a prognózou. Navzdory tomu, že se zdálo, že Gal-1 pozitivní nádory jsou spojeny s horší

prognózou (vzhledem k dvouletému přežití), výsledky bohužel nedosáhly statisticky významných hodnot.

RNA microarray analýza ukázala, že Ten<sup>+</sup> a Ten<sup>-</sup> nádory se liší v expresi 115 genů, mezi kterými jsou i kinázy a jejich substráty, které jsou asociované s nádorovou progresí. Například u Ten<sup>+</sup> nádorů je snížena exprese genu JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription) signalizační kaskády (JAK 2, LIF, CYP1B1) a u Ten<sup>-</sup> NOTCH1 genu. U Ten<sup>+</sup> nádorů je také zvýšená exprese genů účastnících se na zpracování ncRNA (AGO2, PUS7). Změny se také týkaly genů spojených s komponentami extracelulární matrix (LOXL1, C1QTNF1 a BCAM – up-regulované u Ten<sup>-</sup> vzorků). U Ten<sup>+</sup> nádorů byl rovněž ve větší míře exprimován PRAME (melanomový antigen přednostně exprimovaný v nádorech) a LIF z rodiny IL-6 u Ten<sup>-</sup> nádorů.

Dále dochází k rozdílné expresi u 154 genů u okolní nádorové tkáně u Ten<sup>+</sup> a Ten<sup>-</sup> nádorů. Jedná se o zvýšenou expresi genů asociovaných s lipidovým metabolismem ve tkáni z okolí nádoru u Ten<sup>-</sup> tumorů včetně například leptinu (LEP) a lipoprotein lipázy (*LPL*). RNA profil zdravé tkáně se ukázal jako podobný u Ten<sup>+</sup> a Ten<sup>-</sup> nádorů.

#### 4.2. Studium nádorového mikroprostředí melanomu a vlivu UVB záření

**Jobe N. P., Živicová V., Mifková A., Rösel D., Dvořánková B., Kodet O., Strnad H., Kolář M., Šedo A., Smetana K. Jr., Strnadová K., Brábek J., Lacina L.: Fibroblasts potentiate melanoma cells *in vitro* invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. (Fibroblasty potencují *in vitro* invazivitu buněk melanomu, která je vyvolána UV-ozářenými keratinocyty) *Histochem Cell Biol.* 2018; 149(5): 503-516.**

Vedle zkoumaných a výše zmíněných dlaždicových karcinomů hlavy a krku se na našem pracovišti věnujeme i studiu nádorového stromatu maligního melanomu.

V této práci byl testován vliv UVB ozářených keratinocytů na melanomové buňky (buněčná linie BLM a A2058) a jejich interakce s lidskými zdravými fibroblasty (HF) a nádorově asociovanými fibroblasty izolovanými z metastázy maligního melanomu (CAF).

Imunocytochemicky bylo prokázáno, že buněčné kultury lidských keratinocytů jsou pozitivní na keratiny a že kultury HF a CAF jsou negativní na marker leukocytů CD45, endotelový marker CD34, melanocytové markery MELAN-A, HMB-45, S100 protein, tyrozinázu a epiteliální keratiny a obsahují vimentin. Pouze kultura CAF od jednoho pacienta obsahovala hladký svalový aktin.

Dále byl zhodnocen expresní profil kultur CAF a HF. CAF se liší oproti HF v expresi 402 genů, přičemž rozdíly mezi buňkami od různých pacientů byly značné (VEM 564 odlišně exprimovaných genů, MAM 623 a ZAM 1157). Upregulace exprese IL-6, IL-8 a CXCL-1 byla společná pro všechny CAF. Pro svou nejmarkantnější odlišnost a přítomnost myofibroblastů v buněčné kultuře byly pro další experimenty zvoleny právě ZAM.

Kokultury keratinocytů s HF nebo s CAF byly barveny na přítomnost keratinů a vimentinu. Keratinocyty kultivované s CAF vykazovaly pozitivitu jak pro keratiny tak pro vimentin na rozdíl od keratinocytů kultivovaných s HF, které byly vimentin negativní.

Melanomové buněčné linie BLM a A2058 byly kultivovány ve 3D kolagenních gelech. Zkoumali jsme vliv kondiciovaných médií z keratinocytů a z keratinocytů ozářených UVB (10, 50 a 100 mJ/cm<sup>2</sup>) na motilitu melanomových buněk. Ozáření keratinocytů nízkou dávkou (10 mJ/cm<sup>2</sup>) mělo pouze malý stimulační efekt na migraci melanomových buněk (větší efekt u linie A2058), ozáření keratinocytů vyššími dávkami tento efekt postrádalo.

Následně byl porovnáván vliv keratinocytů ozářených třemi po sobě následujícími nízkými dávkami 10 mJ/cm<sup>2</sup> a keratinocytů ozářených jednorázově vysokou dávkou 100 mJ/cm<sup>2</sup>. K takto ozářeným keratinocytům byly přidány HF a CAF do insertové kokultury a



následně odebráno příslušné kondiciované médium. Tato média byla poté aplikována na melanomové buňky v 3D kolagenu. Kondiciované médium z kokultury s HF výrazně potencovalo invazivitu BLM buněk, kondiciované médium z kokultury s CAF mělo tento vliv na obě buněčné melanomové linie. Tento efekt byl patrný u obou schémat ozáření keratinocytů s tím, že byl výraznější u keratinocytů ozářených opakovaně nízkou dávkou.

Po ozáření keratinocytů 10 i 100 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bylo pozorované jasné poškození DNA, u nízké dávky ale došlo po 24 hod k opravě v nezávislosti na přítomnosti fibroblastů. Ozáření vysokou dávkou vedlo k trvalému poškození.

Při zkoumání viability buněk v kultuře za pomoci komerčně vyráběného kitu bylo zjištěno, že kultura keratinocytů jak neozářených, tak i ozářených 3x 10 mJ/cm<sup>2</sup> neobsahuje téměř žádné mrtvé buňky bez ohledu na přítomnost HF nebo CAF, kdežto ozáření dávkou 100 mJ/cm<sup>2</sup> je pro většinu keratinocytů letální. Po přidání fibroblastů do kultury letálně ozářených keratinocytů, došlo ke zvýšení počtu viabilních buněk, počet mrtvých jader zůstal nezměněn a tyto viabilní smrštěné buňky vytvářely shluky.

### 4.3. Zhodnocení vlivu nádorově asociovaných fibroblastů u glioblastomu

Trylčová J., Bušek P., Smetana K. Jr., Balážiová E., Dvořánková B., Mifková A., Šedo A.: Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells *in vitro*. (Efekt nádorově asociovaných fibroblastů na migraci gliomových buněk *in vitro*) *Tumour Biol.* 2015; 36(8): 5873-9.

Již dávno je známý vliv nádorového mikroprostředí a to zejména nádorově asociovaných fibroblastů na biologické vlastnosti mnoha nádorů. Proto jsme se zaměřili na jejich možný význam u glioblastomů, kde jejich role zatím nebyla příliš zkoumána.

Přítomnost buněk podobných nádorově asociovaným fibroblastům u těchto mozkových nádorů jsme ověřili imunofluoresčenčním obarvením zmrazených řezů vzorků glioblastomů získaných od 20 pacientů s neléčeným a nově diagnostikovaným glioblastomem (medián 59 let, 12 mužů, 8 žen) na markery typické pro nádorově asociované fibroblasty a to konkrétně hladký svalový aktin (SMA) a TE-7. SMA pozitivita byla zjištěna u 50% případů a TE-7 byl přítomný u 70% zkoumaných nádorů. Oba markery byly exprimovány v GFAP-negativních buňkách (glial fibrillary acidic protein), které se zejména nacházely v okolí abnormálních cév (vizualizovány pomocí anti-CD31 a anti-von Willebrand factor).

V této práci jsme použili fibroblasty izolované ze stromatu maligního melanomu jako model nádorově asociovaných fibroblastů odvozených od neuroektodermového tumoru (užitá buněčná linie ZAM, viz. předchozí publikace). Byl zkoumán jejich vliv na proliferaci a migraci glioblastomových buněk.

Glioblastomové buňky dvou nádorových linií U87 a U373 byly kultivovány v kondiciovaném médiu z nádorově asociovaných fibroblastů a z normálních zdravých lidských fibroblastů doplněném o 1% fetální bovinní sérum. Obě kondiciovaná média podporovala růst glioblastomových buněk, rozdíl mezi kondiciovanými médii normálních a nádorově asociovaných fibroblastů nebyl statisticky významný. Počet glioblastomových buněk kultivovaných pod vlivem kondiciovaného média byl 2,6 a 2,8 krát vyšší u U87 a 3,5 a 3,7 krát u U373 oproti kontrole po jednom týdnu. Dále jsme sledovali procento Ki67 (antigen asociovaný s buněčnou proliferací) pozitivních buněk. Druhý den kultivace zvýšení proliferace u linie U87 kultivované v obou typech kondiciovaných médií bylo doprovázeno zvýšenou pozitivitou Ki67, toto ale neplatilo pro U373, kdy proporce Ki67 pozitivních buněk nebyla kondiciovanými médii výrazněji ovlivněna a byla ve všech případech přes 70 %. To že potlačení apoptózy nepřispívá k většímu počtu glioblastomových buněk pod kondiciovanými

médii, jsme dokázali pozorováním sub-G1 částic průtokovou cytometrií, který byl nízký (pod 5%) a bez jasného apoptotického peaku.

Mimo vlivu stromálních buněk na proliferaci byl dále hodnocen jejich možný efekt na migraci glioblastomových buněk a to pomocí „*transwell migration assay*“. Porovnávali jsme chemotaktický efekt obou typů kondiciovaných médií na U87, U373 a T98G. Kondiciovaná média oproti kontrole migraci glioblastomových buněk podporovala, vliv byl ale signifikantně větší u kondiciovaného média z nádorově asociovaných fibroblastů a to u všech nádorových glioblastomových linií. Ukazuje se tak, že nádorově asociované fibroblasty mohou produkovat více účinné chemotatické mediátory nebo je vytvářejí ve větším množství, či kombinace obou faktorů.

#### 4.4. Možnost ovlivnění nádorově asociovaných fibroblastů pomocí syntetických polyaminů

**Mifková A., Kodet O., Szabo P., Kučera J., Dvořánková B., André S., Koripelly G., Gabius H.-J., Lehn J.-M., Smetana K. Jr.: Synthetic Polyamine BPA-C8 Inhibits TGF- $\beta$ 1-Mediated Conversion of Human Dermal Fibroblasts to Myofibroblasts and Establishment of Galectin-1-Rich Extracellular Matrix *in Vitro*. (Syntetický polyamin BPA-C8 inhibuje TGF-  $\beta$ 1-zprostředkovanou konverzi lidských dermálních fibroblastů na myofibroblasty a tvorbu na galektin-1 bohaté extracelulární matrix *in vitro*). *Chembiochem.* 2014; 15(10):1465-70**

Byl jasně prokázán význam nádorově asociovaných fibroblastů v nádorové biologii. Část jejich populace tvoří myofibroblasty charakterizované přítomností hladkého svalového aktinu v cytoplazmě. Předpokládá se, že se jedná o populaci biologicky aktivní a proto jsme se zaměřili na možné zamezení jejich tvorby.

Vzhledem k výše popisovaným vlastnostem polyaminů jsme testovali vliv syntetického polyaminu BPA-C8 připraveného Prof. J. M Lehnem na tvorbu myofibroblastů v buněčné kultuře zdravých lidských dermálních fibroblastů stimulovaných TGF- $\beta$ 1 a galektinem-1, na již vytvořené myofibroblasty izolované z dlaždicového karcinomu hlavy a krku, chronické pankreatitidy a na hladké svalové buňky z krysí aorty.

Za normálních okolností kultura lidských normálních fibroblastů neobsahuje téměř žádné myofibroblasty. Přidání TGF-  $\beta$ 1 spolu s galektinem-1 tvorbu myofibroblastů potencuje a obě substance mají rovněž stimulační vliv na tvorbu extracelulární matrix.

Lidské dermální fibroblasty byly kultivovány v DMEM (kontrola), DMEM s přídatkem samotného TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) nebo jeho kombinace s galektinem-1 (300 ng/ml), aby došlo ke zvýšené tvorbě myofibroblastů a extracelulární matrix, v tomto případě konkrétně charakterizované vyšší produkcí galektinu-1 a tenascin. Obě testované koncentrace BPA-C8 (20  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) tento efekt kompletně inhibovaly a nebyla pozorována přítomnost žádných SMA pozitivních buněk v kultuře ani zvýšená produkce tenascin či galektinu-1.

Dále byl zkoumán dopad polyaminu BPA-C8 na počet buněk a na poměr Ki67 pozitivních buněk k posouzení míry buněčné proliferace. 100  $\mu$ M koncentrace BPA-C8 v kultivačním médiu nápadně redukovala počet fibroblastů, zatímco u 20  $\mu$ M koncentrace tento efekt nebyl pozorován. TGF- $\beta$ 1 samotný nebo v kombinaci s galektinem-1, má pozitivní vliv na buněčnou proliferaci, tento proliferační efekt byl potlačen oběma testovanými

koncentracemi (20  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) užitého polyaminu. Zajímavé je, že počet buněk byl dokonce nižší než u kontroly (buněčná kultura pouze v DMEM). Tento vliv BPA-C8 na počet fibroblastů v kultuře se nezdá být způsobený potlačením proliferační aktivity, protože poměr buněk s pozitivním proliferačním markerem Ki67 byl konstantní za všech zkoumaných podmínek.

To nás zavedlo ke zhodnocení úrovně senescence a stanovení poměru mezi viabilními a mrtvými buňkami. Výskyt buněk pozitivních na  $\beta$ -galaktosidasu, která je vázaná na senescenci, byl hojnější v místech o větší buněčné hustotě ve stimulovaných kulturách TGF- $\beta$ 1 s galektinem-1. Tento počet senescentních buněk výrazně klesl, když kultivační médium obsahovalo kombinaci TGF- $\beta$ 1, galektin-1 a BPA-C8 (100  $\mu\text{M}$ ). Toto právě může odrážet sníženou tvorbu myofibroblastů blokovanou BPA-C8, které jak předpokládáme, představují konečné stádium diferenciaci fibroblastů. Naopak byl detekován větší počet mrtvých buněk než u buněčných kultur bez BPA-C8.

Na závěr jsme také studovali vliv BPA-C8 na již existující SMA pozitivní buňky. K tomuto účelu jsme použili nádorově asociované fibroblasty izolované z dlaždicového karcinomu hlavy a krku, myofibroblasty chronické pankreatitidy a hladké svalové buňky pocházející z krysí aorty. Výsledky ukázaly, že efekt BPA-C8 (o testované koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ ) na hladké svalové buňky nebo na již vytvořené myofibroblasty je zanedbatelný, stejně tak jako jeho vliv na již vytvořený fibronectin extracelulární matrix.

## 5. Diskuze

Publikované práce přinesly nové informace o mezibuněčných interakcích v nádorech a o charakteru a úloze nádorového stromatu u dlaždicových karcinomů hlavy a krku, melanomu a glioblastomu.

Ukázali jsme, že existují značné rozdíly v genové expresi mezi vzorky nádoru, okolní tkáně a zdravé tkáně s významnou podobností mezi vzorky nádoru a vzorky z okraje chirurgického resektátu u dlaždicových karcinomů orofaryngu. I když se tato tkáň zdá makroskopicky i mikroskopicky normální, tak při RNA analýze vykazuje podobu s nádorem, což demonstruje vliv nádoru i na okolní nepostiženou tkáň nebo na eventuelní přítomnost nádorových buněk i v okraji chirurgického resektátu. Ve vlastním nádoru i ve tkáni z okraje chirurgického resektátu docházelo ke zvýšené expresi CXCL-1, IL-6 a IL-8 oproti zdravé tkáni z kontralaterální strany dutiny ústní. Všechny tyto tři cytokiny se účastní zánětlivé odpovědi, mnohé práce dokázaly ale i jejich roli v kancerogenezi (Nedoszytko et al., 2014). CXCL-1 má význam v patogenezi například melanomu, karcinomu žaludku, ovarií nebo kolorektálního karcinomu (Dhawan a Richmond, 2002, Dong et al., 2013, Ogata et al., 2010, Wei et al., 2015). Obdobně je diskutován i vliv IL-6 a IL-8 u mnoha rozličných typů nádorů a možnosti jejich ovlivnění v rámci cílené terapie (Alfaro et al., 2017, Taniguchi a Karin, 2014, Yao et al., 2014). Ashizawa a kolektiv zvažují užití sérové hladiny IL-6 i jako prognostického markeru u karcinomu žaludku, kde by vyšší hladina korelovala s horší prognózou (Ashizawa et al., 2005). Studium genového expresního profilu a nalezení specifických znaků jednotlivých nádorů, které by měly vztah k prognóze, by mohlo vést k upřesnění histopatologické klasifikace a predikci možné odpovědi na léčbu. De Cecco a spolupracovníci navrhli rozdělení dlaždicových karcinomů hlavy a krku do šesti podtypů na základě deregulace signálních drah a biologických charakteristik (De Cecco et al., 2015). V práci Thomase a kolektivu je studován genový expresní profil dlaždicových karcinomů hlavy a krku u pacientů před a po léčbě erlotinibem, jsou hledány rozdíly v expresi mezi pacienty, kteří odpověděli a neodpověděli na léčbu a exprese kterých genů byla léčbou změněna. Je diskutováno eventuelní použití těchto poznatků k selekci pacientů vhodných k této terapii (Thomas et al., 2013). My jsme se zaměřili zejména na detekci galektinů vzhledem jejich významu v řadě buněčných procesů včetně kancerogeneze a rovněž jsme se soustředili na výskyt keratinů, jakožto stavební složky cytoskeletu epitelových buněk (Kaltner et al., 2017). Analýza ukázala značnou interindividuální variabilitu s některými společnými znaky. Zaznamenali jsme sníženou expresi galektinu-7 u vzorků tumoru a tkáně z jeho okolí

vzhledem ke zdravé tkáni. Což by odpovídalo zjištění, že se galektin-7 se nachází ve všech vrstvách dlaždicového epitelu s cytoplazmatickou a jadernou lokalizací v normálních vzorcích a pozitivní korelaci diferenciaci a keratinizaci s jeho přítomností u dlaždicových karcinomů hlavy a krku (Cada et al., 2009, Chovanec et al., 2005).

Imunohistochemie ukázala přítomnost galektinu-1 a galektinu-3 v nádorovém stromatu. Zvýšení přítomnosti galektinu-1 ve stromatu nádorů bylo detekováno u mnoha rozličných typů tumorů včetně nádorů hlavy a krku, vaječníků, prsu, mozku, kolon, kůže nebo prostaty (Koonce et al., 2017). Jeho zvýšená exprese bývá spojována s horší prognózou bez ohledu na typ nádorového onemocnění (Thijssen et al., 2015). Role galektinu-3 se liší u různých nádorových onemocnění. Například jeho přítomnost u karcinomu pankreatu souvisí s nižším stupněm diferenciaci a stimuluje růst nádorových buněk (Xie et al., 2012). Jako nepříznivý prognostický faktor působí rovněž u karcinomu ledviny nebo nasofaryngu, B-lymfomu nebo u adenokarcinomu žaludku (Acikalın et al., 2012, Baldus et al., 2000, Kim et al., 2008, Sakaki et al., 2010). Opačného významu nabývá u dlaždicového karcinomu hlavy a krku, karcinomu prsu, chronické lymfoidní leukémie nebo nádoru varlat (Asgarian-Omran et al., 2010, Castronovo et al., 1996, Kayser et al., 2003, Plzak et al., 2004).

Studii jsme dále rozšířili o vzorky dlaždicových karcinomů i z jiných oblastí hlavy a krku (dutina ústní, hypofarynx a larynx) se zaměřením na charakter extracelulární matrix, a to konkrétně výskyt galektinu-1, fibronektinu a tenascin-C.

Při imunohistochemické analýze nádorové vzorky na rozdíl od zdravé tkáně vykazují nejčastěji pozitivitu pro všechny tři výše zmiňované komponenty extracelulární matrix. Zdravá tkáň v naprosté většině případů postrádá přítomnost tenascin a galektinu-1 a vzorky tkáně z okolí nádoru jsou v přibližně stejném procentuálním zastoupení pozitivní a negativní na galektin-1, fibronektin a tenascin a představují tak přechod mezi zdravou a nádorovou tkání.

Tenasciny jsou velké glykoproteiny přítomné v extracelulární matrix různých tkání. Z toho tenascin-C a tenascin-W jsou ve větší míře exprimovány ve stromatu nádorů (Degen et al., 2007, Jones a Jones, 2000). Vzhledem k faktu, že ovlivňují mnoho klíčových procesů v onkogenezi od vzniku maligní buňky, stimulace proliferace, migrace, přes vliv na epitelomezenchymový přechod, angiogenezi, po metastazování, tak jsme se zaměřili na možné rozdíly v genové expresi vzhledem k tenascin pozitivitě (Brellier a Chiquet-Ehrismann, 2012). RNA profil se lišil v expresi 115 genů mezi tenascin pozitivními a negativními tumory. Jedná se například o geny související s JAK-STAT signální kaskádou, kde jsme detekovali sníženou expresi řady genů u tenascin pozitivních nádorů. JAK-STAT signální kaskáda slouží

k regulaci řady fyziologických buněčných dějů jako je buněčná proliferace, sebeobnova kmenových buněk nebo imunitní odpověď (Aaronson a Horvath, 2002, Rawlings et al., 2004). Přísná regulace signalizace JAK-STAT je důležitá k udržení buněčné homeostázy a deregulace této dráhy je spojena s řadou patologických stavů včetně poruch imunity a nádorových onemocnění (Rawlings et al., 2004). Dále dochází ke snížené expresi NOTCH1 genu u tenascin negativních tumorů. Mutace v tomto genu se nachází u 10 – 15 % dlaždicových karcinomů hlavy a krku, kde je považován za tumor supresorový gen (Agrawal et al., 2011, Sun et al., 2014).

Při porovnávání genové exprese vzorků tkáně z okraje chirurgického resektátu u tenascin pozitivních a negativních tumorů dochází zejména ke změnám v expresi u genů souvisejících s lipidovým metabolismem. Například je zvýšená exprese lipoproteinové lipázy u tenascin negativních tumorů. Vysoká aktivita lipoproteinové lipázy u nemalobuněčného karcinomu plic je spojena s horší prognózou a je exprimována hlavně nádorově asociovanými makrofágy (Podgornik et al., 2013).

I když data naznačovala, že galektin-1 pozitivní tumory mohou mít horší prognózu, tak výsledky nedosáhly statisticky významných hodnot. Rovněž se nezdařilo prokázat statisticky významný rozdíl v prognóze vzhledem k tenascin pozitivitě. Je zde ale patrná tendence, že pacienti s tenascin pozitivními nádory mají lepší prognózu. Což je v rozporu se současnými literárními poznatky, kde zvýšená míra exprese tenascinu je asociována s horší prognózou u hepatocelulárního karcinomu, dlaždicového karcinomu jícnu a metastazováním do lymfatických uzlin u karcinomu prsu, kolon, jater a dutiny ústní (Nong et al., 2015, Orend a Chiquet-Ehrismann, 2006, Yang et al., 2016). Tenascin představuje hlavní protein extracelulární matrix maligních mozkových nádorů a je ve zvýšené míře exprimován v invazivních glioblastomových buňkách *in vivo* i *in vitro*, což naznačuje jeho potenciální roli v glioblastomové patologii, kde podporuje nádorovou invazivitu, rezistenci k terapii a rekurenci (Xia et al., 2016). Na druhou stranu absence vztahu mezi expresí tenascinu a prognózou u orálních a faryngeálních karcinomů již byla zaznamenána i v jiné práci (Atula et al., 2003).

Není překvapivé, že obdobně jako i u dalších typů nádorů, je i u melanomu významný vliv nádorového mikroprostředí na jeho chování (Brandner a Haass, 2013). Stejně jako například u dlaždicového a bazocelulárního karcinomu jsou i fibroblasty izolované ze stromatu maligního melanomu schopné ovlivnit fenotyp zdravých keratinocytů směrem k jejich nezralejším variantám (exprese keratinu 8 a 19) a stimulovat epitel-mezenchymový přechod (exprese vimentinu a transkripčního faktoru Snail) (Kučera et al., 2015, Lacina et al.,



2007, Lacina et al., 2007, Strnad et al., 2010). Tento poznatek nás vedl k bližšímu studiu nádorově asociovaných fibroblastů melanomu. Stanovili jsme genový expresní profil u stromálních fibroblastů získaných od třech pacientů s maligním melanomem (VEM, MAM, ZAM) a zjistili jsme, že všechny tři typy se značně odlišují od normálních zdravých fibroblastů (VEM 564, MAM 623 a ZAM překvapivých 1157 odlišně exprimovaných genů). Buněčná kultura ZAM navíc oproti ostatním obsahovala i myofibroblasty. Ve všech případech byla zvýšená exprese IL-6, IL-8 a CXCL-1. Nádorově asociované fibroblasty jsou významným zdrojem IL-6 u karcinomu kolon, kde indukuje angiogenezi (Nagasaki et al., 2014). Rovněž stromální fibroblasty karcinomu prsu a ovarií produkují IL-6 a CXCL-1 a zvýšená exprese CXCL-1 u karcinomu prsu ve stromatu je spojena s horší prognózou (Erez et al., 2013, Zou et al., 2014). Normální i nádorově asociované fibroblasty dlaždicového karcinomu hlavy a krku pod vlivem normálních i nádorových keratinocytů produkují IL-8 a CXCL-1, u nádorově asociovaných fibroblastů je tento sekreční fenotyp permanentnějšího charakteru (Szabo et al., 2013). IL-6 a IL-8 podporují invazivitu melanomu a jejich elevace byla rovněž detekována v séru pacientů s maligním melanomem (Jobe et al., 2016, Kucera et al., 2015).

Hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj melanomu je vystavení UV záření. Přesněji UVB (280-315 nm) jsou nejvíce kancerogenní vlnové délky dosahující zemského povrchu, dokážou proniknout jen několika vrstvami buněk a způsobují tak hlavně epidermální poškození (de Grujil, 2002). UV záření nezasahuje pouze melanocyty, ale ovlivňuje i okolní buňky a extracelulární matrix. V normální epidermis keratinocyty s melanocyty tvoří funkční jednotku a vzájemně se ovlivňují (Kondo a Hearing, 2011). Proto jsme se soustředili na studium vlivu UVB na keratinocyty a jejich možného následného vlivu na chování melanomových buněk. Misovic a spolupracovníci demonstrovali, že krátkodobé ozáření keratinocytů UV světlem má vliv na jejich cytoskelet (Misovic et al., 2013). Vzhledem k tomu, že jsme za normálních okolností opakovaně chronicky vystaveni nízkým dávkám UV záření, tak jsme užili pro simulaci těchto opakovaných dávek ozáření keratinocytů 10 mJ/cm<sup>2</sup> třikrát po sobě. Tato nízká dávka je nižší než dávka, která by způsobila erytém kůže, ale stejně jako dávka vyšší (100 mJ/cm<sup>2</sup>) způsobuje poškození DNA, které je ale do 24 hod opraveno (Dornelles et al., 2004). V kultuře keratinocytů ozářených třikrát po sobě 10 mJ/cm<sup>2</sup> nebyly zaznamenány žádné mrtvé buňky, dávka 100 mJ/cm<sup>2</sup> byla naopak pro většinu keratinocytů letální. Letalita UVB pro keratinocyty se závisí na hustotě buněčné kultury, subkonfluentní kultury jsou méně náchylné k UVB indukované apoptóze nežli keratinocyty ve fázi exponenciálního růstu. Neletální ozáření keratinocytů UVB má vliv na jejich expresní profil,

kdy po ozáření dochází ke změně v expresi řady genů, které souvisí například s apoptózou, opravami DNA, buněčnou adhezí nebo kancerogenezí (Murakami et al., 2001). Zajímavým zjištěním je, že i ozáření keratinocytů, jako pouze součástí nádorového stromatu melanomu, nízkými dávkami UVB ( $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) je schopné pozitivně ovlivnit invazivitu melanomových buněk, která je ještě potencována po přidání fibroblastů a zejména nádorově asociovaných fibroblastů do kultury. V práci Miyaty a kolektivu po ozáření buněčné linie keratinocytů (HaCaT) UVB keratinocyty produkovaly TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  a IL-8 a ovlivnily expresi genů glykosyltransferázy v melanocytech podobně, jako k tomu dochází u melanomu (Miyata et al., 2014).

Na glioblastomy se rovněž v současné době pohlíží jako na komplexní nádory, které jsou tvořeny jak vlastními nádorovými buňkami, tak i biologicky aktivním stromatem. Převážnou část buněčné složky stromatu představují nenádorové astrocyty, endoteliální a imunitní buňky jako mikroglie a makrofágy (da Fonseca a Badie, 2013, Charles et al., 2012). Produkují množství růstových faktorů a cytokinů, které mohou usnadnit nádorové přežití, proliferaci a migraci (Hambardzumyan et al., 2016). Dále byla izolovaná speciální buněčná populace z histologicky normálních chirurgických okrajů, která byla pojmenovaná glioblastomově asociované stromální buňky (GASCs). GASCs se podobají nádorově asociovaným fibroblastům, jsou diploidní a nevykazují změny v genomu typické pro glioblastomové buňky (Clavreul et al., 2012, Clavreul et al., 2014). Mishra a kolektiv prokázali vliv kondiciovaného média z U87 na kmenové mezenchymální buňky kostí dřeně, kdy po expozici tomuto médiu vykazovaly podobnost s nádorově asociovanými myofibroblasty (Mishra et al., 2008). V naší studii jsme přítomnost GFAP-negativních buněk, které exprimují znaky charakteristické pro nádorově asociované fibroblasty (hladký svalový aktin a TE-7) detekovali v blízkosti abnormálních cév glioblastomu. Zdrojem těchto buněk zde mohou být pericyty, které často exprimují hladký svalový aktin a účastní se na tvorbě jizvy v centrálním nervovém systému a mají pozitivní vliv na vaskularizaci nebo mezenchymální buňky atrahované do prostředí glioblastomu (Behnan et al., 2014, Goritz et al., 2011, Wesseling et al., 1995). Pro studium vlivu mezenchymálních buněk na buňky glioblastomu jsme v našem pokusu použili nádorově asociovaných fibroblastů izolovaných ze stromatu maligního melanomu. Prokázali jsme pozitivní vliv kondiciovaných médií z normálních fibroblastů a nádorově asociovaných fibroblastů na proliferaci a migraci glioblastomových buněk. Vliv na proliferaci byl u obou typů médií obdobný, ale kondiciované médium z nádorově asociovaných fibroblastů mělo výrazně větší vliv na migraci. Za tento efekt mohou být zodpovědné různé parakrinní faktory produkované

nádorově asociovanými fibroblasty. Mezi ně patří např. galektin-1, který podporuje migraci glioblastomových buněk nebo IL-6, TGF- $\beta$  a další růstové faktory a chemokiny jako CXCL-12 (Camby et al., 2002, Cirri a Chiarugi, 2011). Zdá se tedy, že mezibuněčné interakce v nádorech nejsou zcela nádorově specifické, ale jedná se nejspíše o obecněji platné mechanismy. Což je v souladu i s dřívější studií, kdy bylo dokázáno, že nádorově asociované fibroblasty z různých nádorů (metastázy karcinomu prsu, bazocelulárního karcinomu kůže, dlaždicového karcinomu dutiny ústní a melanomu) dokáží ovlivnit epiteliální EM-G3 buňky prsního karcinomu (Dvorankova et al., 2012).

Současné poznatky tedy ukazují, že mezibuněčné interakce mezi nádorovými buňkami a stromatem významně ovlivňují biologii maligních nádorů. Nádorové mikroprostředí se tak stává novým možným terapeutickým cílem při léčbě nádorových onemocnění (Bremnes et al., 2011). Mezi významnou součástí nádorového stromatu patří nádorově asociované fibroblasty, které se účastní na produkci extracelulární matrix a zároveň mají podíl i na její degradaci. Tvoří širokou škálu lokálních mediátorů zahrnujících růstové faktory a tím ovlivňují nádorové ale i ostatní stromální buňky (Cirri a Chiarugi, 2011). Část nádorově asociovaných fibroblastů tvoří terminálně diferenciované myofibroblasty, které jsou považované za aktivní formu fibroblastů (De Wever et al., 2008, Madar et al., 2013). Jejich tvorbu podporuje TGF- $\beta$ 1 a galektin-1, proto se užití jejich inhibitorů nabízí jako jeden z možných cílů protinádorové terapie, která by byla využitelná i u dalších procesů, na kterých se myofibroblasty účastní, jako je fibróza, ateroskleróza nebo jizvení (De Wever a Mareel, 2003, Koonce et al., 2017). Proto jsme se v poslední předkládané práci zaměřili přímo na blokádu tvorby myofibroblastů z fibroblastů stimulovaných TGF- $\beta$ 1 a galektinem-1. Vzhledem k prokázaným interakcím polyaminů s buněčným cytoskeletem byl testován vliv syntetického polyaminu BPA-C8 připraveného nositelem Nobelovy ceny za chemii J.-M. Lehnem na tvorbu myofibroblastů. Přidání tohoto polyaminu do kultivačního média narušuje tvorbu myofibroblastů z lidských dermálních fibroblastů stimulovaných TGF- $\beta$ 1 a galektinem-1, ale neovlivňuje buňky s již vytvořeným hladkým svalovým aktinem. Tento jev je doprovázen snížením buněčné viability. Ovlivněním nádorově asociovaných fibroblastů se zabývají i jiné práce. Dalším z jejich znaků je například exprese FAP (fibroblast activation protein alpha), která bývá zároveň spojena s horší prognózou (Hamson et al., 2014, Hua et al., 2011, Spaeth et al., 2009). Teichgräber a spolupracovníci demonstrovali, že ztráta exprese FAP na buněčném povrchu vede ke snížení invazivních schopností nádorově asociovaných fibroblastů (Teichgraber et al., 2015). Je zkoumána řada jeho inhibitorů, které by mohly být využity v protinádorové terapii (Jansen et al., 2013, Poplawski et al., 2013). Polykationty jsou schopné přerušit buněčnou polymerizaci

aktinu (Shikinaka et al., 2009). Syntetický polyamin tímto způsobem brání tvorbě vláken hladkého svalového aktinu, což může být pro buňku fatální, ale zároveň to ovlivňuje i další procesy, jako je například tvorba extracelulární matrix. Extracelulární matrix bohatá na galektin-1 a tenascin je spojená s nádorovou progresí (Adams et al., 2002, Valach et al., 2012). Snížení tvorby myofibroblastů a biologicky aktivní extracelulární matrix tak má potenciál pro otevření nové cesty v léčbě nádorových onemocnění.

## 6. Závěr

V předkládané disertační práci jsme prokázali, že:

1. Mezi jednotlivými vzorky dlaždicových karcinomů hlavy a krku, vzorky tkáně z okolí nádorů a normální sliznice existují rozdíly v genové expresi a i v charakteru extracelulární matrix. Vzorky od jednotlivých pacientů vykazují značnou interindividuální variabilitu. Je zajímavé, že makroskopicky nepostížená tkáň z okraje chirurgického resektátu vykazuje určitou podobnost s tkání vlastního nádoru. A i když jsou zde patrné určité trendy v prognóze pacientů ve vztahu k charakteru extracelulární matrix, tak k dosažení statisticky významných výsledků by byla vhodná analýza většího souboru pacientů.
2. Ozáření keratinocytů dávkou UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup> je pro většinu buněk letální, ale poškození DNA je pozorováno i po ozáření dávkou 10 mJ/cm<sup>2</sup>. UVB ozářené keratinocyty zejména společně s normálními nebo nádorově asociovanými fibroblasty stimulují invazivitu buněk melanomu. Zaznamenali jsme výraznější efekt u keratinocytů ozářených opakovaně nízkou dávkou.
3. Byla prokázána přítomnost buněk s mezenchymovými charakteristikami ve stromatu glioblastomu. Normální i nádorově asociované fibroblasty stimulují proliferaci glioblastomových buněk, ale kondicionané médium z nádorově asociovaných fibroblastů má větší chemotaktický efekt při studiu migrace buněk glioblastomu. Výše diskutované poznatky podporují hypotézu, že nádorové stroma, konkrétně buňky podobné nádorově asociovaným fibroblastům, je důležité i u těchto letálních mozkových tumorů.
4. Část populace nádorově asociovaných fibroblastů je tvořena myofibroblasty. Polyaminy ovlivňují aktinový cytoskelet a mají inhibující efekt na tvorbu myofibroblastů indukovanou TGF-β1 a galektinem-1 a žádný efekt na již existující SMA pozitivní buňky. Zamezení tvorby aktivní formy nádorově asociovaných fibroblastů, kterou představují právě myofibroblasty, by mohlo být využito v rámci vývoje nových terapeutických možností zacílených na nádorové stroma.

## 7. Seznam použité literatury

Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 2002; 296(5573): 1653-1655.

Abbas O, Miller DD, Bhawan J. Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Dermatopathol*. 2014; 36(5): 363-379.

Acikalin MF, Etiz D, Gurbuz MK, Ozudogru E, Canaz F, Colak E. Prognostic significance of galectin-3 and cyclin D1 expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Med Oncol*. 2012; 29(2): 742-749.

Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC. Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res*. 2002; 62(11): 3289-3297.

Advedissian T, Deshayes F, Viguier M. Galectin-7 in Epithelial Homeostasis and Carcinomas. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(12).

Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie TX, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Weinstein JN, Trevino L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Wheeler DA, Kinzler KW, Myers JN. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011; 333(6046): 1154-1157.

Alfaro C, Sanmamed MF, Rodriguez-Ruiz ME, Teijeira A, Onate C, Gonzalez A, Ponz M, Schalper KA, Perez-Gracia JL, Melero I. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treat Rev*. 2017; 60(24-31).

Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther*. 2015; 152(63-82).

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363(1): 24-35.

Asgarian-Omran H, Forghani P, Hojjat-Farsangi M, Roohi A, Sharifian RA, Razavi SM, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H, Shokri F. Expression profile of galectin-1 and galectin-3 molecules in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest*. 2010; 28(7): 717-725.

Ashizawa T, Okada R, Suzuki Y, Takagi M, Yamazaki T, Sumi T, Aoki T, Ohnuma S, Aoki T. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor. *Gastric Cancer*. 2005; 8(2): 124-131.

Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, Neuzillet C, Albert S, Raymond E, Faivre S. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40(2): 307-319.

Atula T, Hedstrom J, Finne P, Leivo I, Markkanen-Leppanen M, Haglund C. Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2003; 23(3C): 3051-3056.

Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care.* 2013; 22(8): 407-408, 410-412.

Baldus SE, Zirbes TK, Weingarten M, Fromm S, Glossmann J, Hanisch FG, Monig SP, Schroder W, Flucke U, Thiele J, Holscher AH, Dienes HP. Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation. *Tumour Biol.* 2000; 21(5): 258-266.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005; 7(3): 211-217.

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 1994; 76(4): 597-598.

Behnan J, Isakson P, Joel M, Cilio C, Langmoen IA, Vik-Mo EO, Badn W. Recruited brain tumor-derived mesenchymal stem cells contribute to brain tumor progression. *Stem Cells.* 2014; 32(5): 1110-1123.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3(7): 730-737.

Brandner JM, Haass NK. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology.* 2013; 45(5): 443-452.

Brellier F, Chiquet-Ehrismann R. How do tenascins influence the birth and life of a malignant cell? *J Cell Mol Med.* 2012; 16(1): 32-40.

Bremnes RM, Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, Camps C, Marinez I, Busund LT. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011; 6(1): 209-217.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970; 172(5): 902-908.

Bruce WR, Van Der Gaag H. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature.* 1963; 199(79-80).

- Cada Z, Chovanec M, Smetana K, Betka J, Lacina L, Plzak J, Kodet R, Stork J, Lensch M, Kaltner H, Andre S, Gabius HJ. Galectin-7: will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous cell and basal cell carcinomas? *Histol Histopathol.* 2009; 24(1): 41-48.
- Cada Z, Plzak J, Chovanec M, Dvorankova B, Lacina L, Szabo P, Smetana K, Jr., Betka J. [Galectins in squamous cell carcinomas of the head and neck cancers]. *Cas Lek Cesk.* 2008; 147(11): 559-563.
- Camby I, Belot N, Lefranc F, Sadeghi N, de Launoit Y, Kaltner H, Musette S, Darro F, Danguy A, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61(7): 585-596.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16(11): 137R-157R.
- Carnero A, Garcia-Mayea Y, Mir C, Lorente J, Rubio IT, ME LL. The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy. *Cancer Treat Rev.* 2016; 49(25-36).
- Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, Sobel ME. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol.* 1996; 179(1): 43-48.
- Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011; 1(4): 482-497.
- Clavreul A, Etcheverry A, Chassevent A, Quillien V, Avril T, Jourdan ML, Michalak S, Francois P, Carre JL, Mosser J, Grand Ouest Glioma Project N, Menei P. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *J Neurooncol.* 2012; 106(3): 493-504.
- Clavreul A, Guette C, Faguer R, Tetaud C, Boissard A, Lemaire L, Rousseau A, Avril T, Henry C, Coqueret O, Menei P. Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *J Pathol.* 2014; 233(1): 74-88.
- Cousin JM, Cloninger MJ. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(9).
- da Fonseca AC, Badie B. Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013(264124).
- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating g. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* 2005; 366(9499): 1784-1793.



De Cecco L, Nicolau M, Giannoccaro M, Daidone MG, Bossi P, Locati L, Licitra L, Canevari S. Head and neck cancer subtypes with biological and clinical relevance: Meta-analysis of gene-expression data. *Oncotarget*. 2015; 6(11): 9627-9642.

de Grujil FR. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002; 15(5): 316-320.

de la Fuente H, Cibrian D, Sanchez-Madrid F. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response. *FEBS Lett*. 2012; 586(18): 2897-2905.

De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*. 2008; 123(10): 2229-2238.

De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*. 2003; 200(4): 429-447.

Degen M, Brellier F, Kain R, Ruiz C, Terracciano L, Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior. *Cancer Res*. 2007; 67(19): 9169-9179.

DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29(2): 309-316.

Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005; 13(1): 7-12.

Dhawan P, Richmond A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol*. 2002; 72(1): 9-18.

Dionne LK, Driver ER, Wang XJ. Head and Neck Cancer Stem Cells: From Identification to Tumor Immune Network. *J Dent Res*. 2015; 94(11): 1524-1531.

Dong YL, Kabir SM, Lee ES, Son DS. CXCR2-driven ovarian cancer progression involves upregulation of proinflammatory chemokines by potentiating NF-kappaB activation via EGFR-transactivated Akt signaling. *PLoS One*. 2013; 8(12): e83789.

Dornelles S, Goldim J, Cestari T. Determination of the minimal erythema dose and colorimetric measurements as indicators of skin sensitivity to UV-B radiation. *Photochem Photobiol*. 2004; 79(6): 540-544.

Dvorak HF. Tumor Stroma, Tumor Blood Vessels, and Antiangiogenesis Therapy. *Cancer J*. 2015; 21(4): 237-243.

Dvorankova B, Smetana K, Jr., Rihova B, Kucera J, Mateu R, Szabo P. Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol.* 2015; 143(5): 463-469.

Dvorankova B, Szabo P, Kodet O, Strnad H, Kolar M, Lacina L, Krejci E, Nanka O, Sedo A, Smetana K, Jr. Intercellular crosstalk in human malignant melanoma. *Protoplasma.* 2017; 254(3): 1143-1150.

Dvorankova B, Szabo P, Lacina L, Gal P, Uhrova J, Zima T, Kaltner H, Andre S, Gabius HJ, Sykova E, Smetana K, Jr. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs.* 2011; 194(6): 469-480.

Dvorankova B, Szabo P, Lacina L, Kodet O, Matouskova E, Smetana K, Jr. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol.* 2012; 137(5): 679-685.

Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13(11): 759-771.

Ellis CE, Naicker D, Basson KM, Botha CJ, Meintjes RA, Schultz RA. Damage to some contractile and cytoskeleton proteins of the sarcomere in rat neonatal cardiomyocytes after exposure to pavetamine. *Toxicon.* 2010; 55(6): 1071-1079.

Epifano C, Perez-Moreno M. Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. *Cell Adh Migr.* 2012; 6(3): 261-273.

Erez N, Glanz S, Raz Y, Avivi C, Barshack I. Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 437(3): 397-402.

Esparza R, Azad TD, Feroze AH, Mitra SS, Cheshier SH. Glioblastoma stem cells and stem cell-targeting immunotherapies. *J Neurooncol.* 2015; 123(3): 449-457.

Farhad M, Rolig AS, Redmond WL. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology.* 2018; 7(6): e1434467.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6): 453-458.

Gal P, Varinska L, Faber L, Novak S, Szabo P, Mitrengova P, Mirossay A, Mucaji P, Smetana K. How Signaling Molecules Regulate Tumor Microenvironment: Parallels to Wound Repair. *Molecules.* 2017; 22(11).

- Garana RM, Petroll WM, Chen WT, Herman IM, Barry P, Andrews P, Cavanagh HD, Jester JV. Radial keratotomy. II. Role of the myofibroblast in corneal wound contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992; 33(12): 3271-3282.
- Gilain L, Houette A, Montalban A, Mom T, Saroul N. Mucosal melanoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2014; 131(6): 365-369.
- Ginsberg MH. Integrin activation. *BMB Rep*. 2014; 47(12): 655-659.
- Gires O, Mack B, Rauch J, Matthias C. CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 343(1): 252-259.
- Goodpaster T, Legesse-Miller A, Hameed MR, Aisner SC, Randolph-Habecker J, Collier HA. An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56(4): 347-358.
- Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisen J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*. 2011; 333(6039): 238-242.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-899.
- Guidi A, Codeca C, Ferrari D. Chemotherapy and immunotherapy for recurrent and metastatic head and neck cancer: a systematic review. *Med Oncol*. 2018; 35(3): 37.
- Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 802(31-47).
- Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 2016; 19(1): 20-27.
- Hamson EJ, Keane FM, Tholen S, Schilling O, Gorrell MD. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics Clin Appl*. 2014; 8(5-6): 454-463.
- Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21(3): 309-322.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-674.
- Hogan SA, Levesque MP, Cheng PF. Melanoma Immunotherapy: Next-Generation Biomarkers. *Front Oncol*. 2018; 8(178).

Hsia HC, Schwarzbauer JE. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem*. 2005; 280(29): 26641-26644.

Hua X, Yu L, Huang X, Liao Z, Xian Q. Expression and role of fibroblast activation protein-alpha in microinvasive breast carcinoma. *Diagn Pathol*. 2011; 6(111).

Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987; 48(4): 549-554.

Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(20): 12877-12882.

Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA, Jr., Asher AL, Bernstein M, Lillehei KO, Brem H, Berger MS, Laws ER, Glioma Outcomes Project I. Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. *JAMA*. 2005; 293(5): 557-564.

Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. 2012; 60(3): 502-514.

Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76(11): 1352-1364.

Chiquet-Ehrismann R. Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia*. 1995; 51(9-10): 853-862.

Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol*. 2003; 200(4): 488-499.

Chovanec M, Smetana K, Jr., Plzak J, Betka J, Plzakova Z, Stork J, Hrdlickova E, Kuwabara I, Dvorankova B, Liu FT, Kaltner H, Andre S, Gabius HJ. Detection of new diagnostic markers in pathology by focus on growth-regulatory endogenous lectins. The case study of galectin-7 in squamous epithelia. *Prague Med Rep*. 2005; 106(2): 209-216.

Jansen K, Heirbaut L, Cheng JD, Joossens J, Ryabtsova O, Cos P, Maes L, Lambeir AM, De Meester I, Augustyns K, Van der Veken P. Selective Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine Scaffold. *ACS Med Chem Lett*. 2013; 4(5): 491-496.

Jobe NP, Rosel D, Dvorankova B, Kodet O, Lacina L, Mateu R, Smetana K, Brabek J. Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem Cell Biol*. 2016; 146(2): 205-217.

Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*. 2000; 218(2): 235-259.

Jones PL, Jones FS. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol.* 2000; 19(7): 581-596.

Kaltner H, Toegel S, Caballero GG, Manning JC, Ledeen RW, Gabius HJ. Galectins: their network and roles in immunity/tumor growth control. *Histochem Cell Biol.* 2017; 147(2): 239-256.

Kaur M, Kaur T, Kamboj SS, Singh J. Roles of Galectin-7 in Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17(2): 455-461.

Kayser K, Hoefft D, Hufnagi P, Caselitz J, Zick Y, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ. Combined analysis of tumor growth pattern and expression of endogenous lectins as a prognostic tool in primary testicular cancer and its lung metastases. *Histol Histopathol.* 2003; 18(3): 771-779.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141(1): 52-67.

Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One.* 2012; 7(2): e30563.

Kim SJ, Lee SJ, Sung HJ, Choi IK, Choi CW, Kim BS, Kim JS, Yu W, Hwang HS, Kim IS. Increased serum 90K and Galectin-3 expression are associated with advanced stage and a worse prognosis in diffuse large B-cell lymphomas. *Acta Haematol.* 2008; 120(4): 211-216.

Kolar M, Szabo P, Dvorankova B, Lacina L, Gabius HJ, Strnad H, Sachova J, Vlcek C, Plzak J, Chovanec M, Cada Z, Betka J, Fik Z, Paces J, Kovarova H, Motlik J, Jarkovska K, Smetana K, Jr. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell.* 2012; 104(12): 738-751.

Kondo T, Hearing VJ. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol.* 2011; 6(1): 97-108.

Koonce NA, Griffin RJ, Dings RPM. Galectin-1 Inhibitor OTX008 Induces Tumor Vessel Normalization and Tumor Growth Inhibition in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Models. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(12).

Kopantzev EP, Vayshlya NA, Kopantseva MR, Egorov VI, Pikunov M, Zinovyeva MV, Vinogradova TV, Zborovskaya IB, Sverdlov ED. Cellular and molecular phenotypes of proliferating stromal cells from human carcinomas. *Br J Cancer.* 2010; 102(10): 1533-1540.

Koslabova E, Hamsikova E, Salakova M, Klozar J, Foltynova E, Salkova E, Rotnaglova E, Ludvikova V, Tachezy R. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer.* 2013; 133(8): 1832-1839.

- Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, Zheng L. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med.* 2009; 206(6): 1327-1337.
- Kucera R, Topolcan O, Treskova I, Kinkorova J, Windrichova J, Fuchsova R, Svobodova S, Treska V, Babuska V, Novak J, Smejkal J. Evaluation of IL-2, IL-6, IL-8 and IL-10 in Malignant Melanoma Diagnostics. *Anticancer Res.* 2015; 35(6): 3537-3541.
- Kučera J, Dvořánková B, Smetana K, Szabo P, Kodet O. Fibroblasts isolated from the malignant melanoma influence phenotype of normal human keratinocytes. *Journal of Applied Biomedicine.* 2015; 13(3): 195-198.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta.* 2008; 228(3): 367-381.
- Lacina L, Dvorankova B, Smetana K, Jr., Chovanec M, Plzak J, Tachezy R, Kideryova L, Kucerova L, Cada Z, Boucek J, Kodet R, Andre S, Gabius HJ. Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int J Radiat Biol.* 2007; 83(11-12): 837-848.
- Lacina L, Kodet O, Dvorankova B, Szabo P, Smetana K, Jr. Ecology of melanoma cell. *Histol Histopathol.* 2018; 33(3): 247-254.
- Lacina L, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Pytlik R, Kideryova L, Kucerova L, Plzakova Z, Stork J, Gabius HJ, Andre S. Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2007; 156(5): 819-829.
- Lahm H, Andre S, Hoefflich A, Kaltner H, Siebert HC, Sordat B, von der Lieth CW, Wolf E, Gabius HJ. Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J.* 2004; 20(4): 227-238.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(3): 178-196.
- Lang D, Mascarenhas JB, Shea CR. Melanocytes, melanocyte stem cells, and melanoma stem cells. *Clin Dermatol.* 2013; 31(2): 166-178.
- Lefevre PL, Palin MF, Murphy BD. Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr Rev.* 2011; 32(5): 694-712.
- Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem.* 2007; 101(4): 805-815.
- Lorusso G, Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130(6): 1091-1103.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131(6): 803-820.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(12).

Luo M, Clouthier SG, Deol Y, Liu S, Nagrath S, Azizi E, Wicha MS. Breast cancer stem cells: current advances and clinical implications. *Methods Mol Biol.* 2015; 1293(1-49).

Lyons AJ, Bateman AC, Spedding A, Primrose JN, Mandel U. Oncofetal fibronectin and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 39(6): 471-477.

Madar S, Goldstein I, Rotter V. 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. *Trends Mol Med.* 2013; 19(8): 447-453.

Matsuda S, Yan T, Mizutani A, Sota T, Hiramoto Y, Prieto-Vila M, Chen L, Satoh A, Kudoh T, Kasai T, Murakami H, Fu L, Salomon DS, Seno M. Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche. *Int J Cancer.* 2014; 135(1): 27-36.

Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, He Y, Burrall B, Duong C, Kloxin AM, Sultani H, Wilken R, Martinez SR, Patel F. Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol.* 2015; 95(5): 516-524.

Mhaweck P, Dulguerov P, Assaly M, Ares C, Allal AS. EB-D fibronectin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2005; 41(1): 82-88.

Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, Orend G. Advances in tenascin-C biology. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(19): 3175-3199.

Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW, Banerjee D. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 2008; 68(11): 4331-4339.

Misovic M, Milenkovic D, Martinovic T, Ciric D, Bumbasirevic V, Kravic-Stevovic T. Short-term exposure to UV-A, UV-B, and UV-C irradiation induces alteration in cytoskeleton and autophagy in human keratinocytes. *Ultrastruct Pathol.* 2013; 37(4): 241-248.

Miyata M, Ichihara M, Tajima O, Sobue S, Kambe M, Sugiura K, Furukawa K, Furukawa K. UVB-irradiated keratinocytes induce melanoma-associated ganglioside GD3 synthase gene in melanocytes via secretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 445(2): 504-510.

Motlik J, Klima J, Dvorankova B, Smetana K, Jr. Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenology.* 2007; 67(1): 105-111.

Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering DC. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol.* 2007; 171(5): 1608-1618.

Muhlrad A, Grintsevich EE, Reisler E. Polycation induced actin bundles. *Biophys Chem.* 2011; 155(1): 45-51.

Murakami T, Fujimoto M, Ohtsuki M, Nakagawa H. Expression profiling of cancer-related genes in human keratinocytes following non-lethal ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci.* 2001; 27(2): 121-129.

Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer.* 2014; 110(2): 469-478.

Nedeva I, Koripelly G, Caballero D, Chieze L, Guichard B, Romain B, Pencreach E, Lehn JM, Carlier MF, Riveline D. Synthetic polyamines promote rapid lamellipodial growth by regulating actin dynamics. *Nat Commun.* 2013; 4(2165).

Nedoszytko B, Sokolowska-Wojdylo M, Ruckemann-Dziurdzinska K, Roszkiewicz J, Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014; 31(2): 84-91.

Noda Y, Kishino M, Sato S, Hirose K, Sakai M, Fukuda Y, Murakami S, Toyosawa S. Galectin-1 expression is associated with tumour immunity and prognosis in gingival squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 2017; 70(2): 126-133.

Nong Y, Wu D, Lin Y, Zhang Y, Bai L, Tang H. Tenascin-C expression is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (HCC) patients and the inflammatory cytokine TNF-alpha-induced TNC expression promotes migration in HCC cells. *Am J Cancer Res.* 2015; 5(2): 782-791.

Ogata H, Sekikawa A, Yamagishi H, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Ito Y, Fujita M, Tsubaki M, Kato H, Fujimori T, Fukui H. GROalpha promotes invasion of colorectal cancer cells. *Oncol Rep.* 2010; 24(6): 1479-1486.

Okami K. Clinical features and treatment strategy for HPV-related oropharyngeal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2016; 21(5): 827-835.

Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.* 2006; 244(2): 143-163.

Oriol-Audit C, Hosseini MW, Lehn JM. 'Superpolyamines'. Macrocyclic polyamines induce highly efficient actin polymerization. *Eur J Biochem.* 1985; 151(3): 557-559.



Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010; 29(8): 1093-1102.

Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002; 115(Pt 20): 3861-3863.

Perri F, Pacelli R, Della Vittoria Scarpati G, Cella L, Giuliano M, Caponigro F, Pepe S. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications. *Head Neck*. 2015; 37(5): 763-770.

Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ, Ronnov-Jessen L. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol*. 2003; 162(2): 391-402.

Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*. 2014; 15(12): 1243-1253.

Plzak J, Betka J, Smetana K, Jr., Chovanec M, Kaltner H, Andre S, Kodet R, Gabius HJ. Galectin-3 - an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004; 40(15): 2324-2330.

Plzak J, Lacina L, Chovanec M, Dvorankova B, Szabo P, Cada Z, Smetana K, Jr. Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties. *Anticancer Res*. 2010; 30(2): 455-462.

Podgornik H, Sok M, Kern I, Marc J, Cerne D. Lipoprotein lipase in non-small cell lung cancer tissue is highly expressed in a subpopulation of tumor-associated macrophages. *Pathol Res Pract*. 2013; 209(8): 516-520.

Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*. 2009; 25(1): 30-38.

Poplawski SE, Lai JH, Li Y, Jin Z, Liu Y, Wu W, Wu Y, Zhou Y, Sudmeier JL, Sanford DG, Bachovchin WW. Identification of selective and potent inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase. *J Med Chem*. 2013; 56(9): 3467-3477.

Poste AE, Grung M, Wright RF. Amines and amine-related compounds in surface waters: a review of sources, concentrations and aquatic toxicity. *Sci Total Environ*. 2014; 481(274-279).

Probstmeier R, Nellen J, Gloor S, Wernig A, Pesheva P. Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res*. 2001; 64(1): 70-78.

Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014; 28(6): 1005-1011.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 8): 1281-1283.

Rybinski B, Franco-Barraza J, Cukierman E. The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. *Physiol Genomics.* 2014; 46(7): 223-244.

Sakaki M, Fukumori T, Fukawa T, Elsamman E, Shiirevnyamba A, Nakatsuji H, Kanayama HO. Clinical significance of Galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma. *J Med Invest.* 2010; 57(1-2): 152-157.

Shikinaka K, Kakugo A, Osada Y, Gong JP. Mechanism on polarity sorting of actin bundles formed with polyocations. *Langmuir.* 2009; 25(3): 1554-1557.

Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, Dean WB, Taylor G, van Vlijmen IM, van Haren B, Miller WL, Bristow J. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med.* 2001; 345(16): 1167-1175.

Scherberich A, Tucker RP, Samandari E, Brown-Luedi M, Martin D, Chiquet-Ehrismann R. Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 4): 571-581.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(1): 7-30.

Simonelli M, Persico P, Perrino M, Zucali PA, Navarra P, Pessina F, Scorsetti M, Bello L, Santoro A. Checkpoint inhibitors as treatment for malignant gliomas: "A long way to the top". *Cancer Treat Rev.* 2018; 69(121-131).

Singh S, Chellappan S. Lung cancer stem cells: Molecular features and therapeutic targets. *Mol Aspects Med.* 2014; 39(50-60).

Smetana K, Jr., Dvorankova B, Lacina L, Cada Z, Vonka V. Human hair follicle and interfollicular keratinocyte reactivity to mouse HPV16-transformed cells: an in vitro study. *Oncol Rep.* 2008; 20(1): 75-80.

Smetana K, Jr., Lacina L, Szabo P, Dvorankova B, Broz P, Sedo A. Ageing as an Important Risk Factor for Cancer. *Anticancer Res.* 2016; 36(10): 5009-5017.

Smetana K, Jr., Plzak J, Dvorankova B, Holikova Z. Functional consequences of the glycophenotype of squamous epithelia--practical employment. *Folia Biol (Praha).* 2003; 49(3): 118-127.

Solis D, Bovin NV, Davis AP, Jimenez-Barbero J, Romero A, Roy R, Smetana K, Jr., Gabius HJ. A guide into glycosciences: How chemistry, biochemistry and biology cooperate to crack the sugar code. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1850(1): 186-235.

Song L, Tang JW, Owusu L, Sun MZ, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta*. 2014; 431(185-191).

Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 2009; 4(4): e4992.

Strnad H, Lacina L, Kolar M, Cada Z, Vlcek C, Dvorankova B, Betka J, Plzak J, Chovanec M, Sachova J, Valach J, Urbanova M, Smetana K, Jr. Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochem Cell Biol*. 2010; 133(2): 201-211.

Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5(12): 1640-1646.

Sulic S, Panic L, Dikic I, Volarevic S. Deregulation of cell growth and malignant transformation. *Croat Med J*. 2005; 46(4): 622-638.

Sun W, Gaykalova DA, Ochs MF, Mambo E, Arnaoutakis D, Liu Y, Loyo M, Agrawal N, Howard J, Li R, Ahn S, Fertig E, Sidransky D, Houghton J, Buddavarapu K, Sanford T, Choudhary A, Darden W, Adai A, Latham G, Bishop J, Sharma R, Westra WH, Hennessey P, Chung CH, Califano JA. Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2014; 74(4): 1091-1104.

Szabo P, Kolar M, Dvorankova B, Lacina L, Stork J, Vlcek C, Strnad H, Tvrdek M, Smetana K, Jr. Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells. *Biol Cell*. 2011; 103(5): 233-248.

Szabo P, Valach J, Smetana K, Jr., Dvorankova B. Comparative analysis of IL-8 and CXCL-1 production by normal and cancer stromal fibroblasts. *Folia Biol (Praha)*. 2013; 59(3): 134-137.

Tang JX, Janmey PA. The polyelectrolyte nature of F-actin and the mechanism of actin bundle formation. *J Biol Chem*. 1996; 271(15): 8556-8563.

Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol*. 2014; 26(1): 54-74.

Teichgraber V, Monasterio C, Chaitanya K, Boger R, Gordon K, Dieterle T, Jager D, Bauer S. Specific inhibition of fibroblast activation protein (FAP)-alpha prevents tumor progression in vitro. *Adv Med Sci*. 2015; 60(2): 264-272.

Thiery JP. [Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression]. *Bull Acad Natl Med*. 2009; 193(9): 1969-1978; discussion 1978-1969.

Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1855(2): 235-247.

Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F, Griffioen AW. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(43): 15975-15980.

Thomas F, Delmar P, Vergez S, Rochaix P, Hennebelle I, McLoughlin P, Benlyazid A, Sarini J, Delord JP. Gene expression profiling on pre- and post-erlotinib tumors from patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013; 35(6): 809-818.

Valach J, Fik Z, Strnad H, Chovanec M, Plzak J, Cada Z, Szabo P, Sachova J, Hroudova M, Urbanova M, Steffl M, Paces J, Mazanek J, Vlcek C, Betka J, Kaltner H, Andre S, Gabius HJ, Kodet R, Smetana K, Jr., Gal P, Kolar M. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer*. 2012; 131(11): 2499-2508.

Volkmer B, Greinert R. UV and children's skin. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011; 107(3): 386-388.

Wang K, Seo BR, Fischbach C, Gourdon D. Fibronectin Mechanobiology Regulates Tumorigenesis. *Cell Mol Bioeng*. 2016; 9(1-11).

Wei ZW, Xia GK, Wu Y, Chen W, Xiang Z, Schwarz RE, Brekken RA, Awasthi N, He YL, Zhang CH. CXCL1 promotes tumor growth through VEGF pathway activation and is associated with inferior survival in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2015; 359(2): 335-343.

Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, Nishikawa R, Rosenthal M, Wen PY, Stupp R, Reifenberger G. Glioma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1(15017).

Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008; 359(5): 492-507.

Werb Z, Lu P. The Role of Stroma in Tumor Development. *Cancer J*. 2015; 21(4): 250-253.

Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJ, Link M, Burger PC, Ruiter DJ. Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995; 54(3): 304-310.

Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*. 2006; 66(4): 1883-1890; discussion 1895-1886.

Winston MJ, D'Souza G, Fakhry C. Treatment preferences in human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Future Oncol*. 2018.

- Woodward WA, Hill RP. Cancer Stem Cells. *Recent Results Cancer Res.* 2016; 198(25-44).
- Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2002; 4(4): 278-299.
- Xia S, Lal B, Tung B, Wang S, Goodwin CR, Lattera J. Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. *Neuro Oncol.* 2016; 18(4): 507-517.
- Xie L, Ni WK, Chen XD, Xiao MB, Chen BY, He S, Lu CH, Li XY, Jiang F, Ni RZ. The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138(6): 1035-1043.
- Yang ZT, Yeo SY, Yin YX, Lin ZH, Lee HM, Xuan YH, Cui Y, Kim SH. Tenascin-C, a Prognostic Determinant of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One.* 2016; 11(1): e0145807.
- Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014; 141(2): 125-139.
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007; 67(21): 10123-10128.
- Zou A, Lambert D, Yeh H, Yasukawa K, Behbod F, Fan F, Cheng N. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF-beta signaling proteins. *BMC Cancer.* 2014; 14(781).