

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Studium mezibuněčných interakcí v nádorech

MUDr. Alžběta Jechová

2018

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Anatomický ústav 1. LF UK

Školitel: Prof. MUDr. Karel Smetana ml., DrSc.

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

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Abstrakt

Nádory jsou tvořené vedle vlastních nádorových buněk také mnoha maligně netransformovanými buněčnými elementy a mimobuněčnou složkou. Toto nádorové mikroprostředí ovlivňuje biologické vlastnosti nádoru prostřednictvím přímých i nepřímých mezibuněčných interakcí. Jeho významnou součástí jsou nádorově asociované fibroblasty z části tvořené myofibroblasty. Testovaný syntetický polyamin zabraňuje jejich vzniku, ale postrádá efekt na již vytvořené myofibroblasty nebo hladké svalové buňky. Prezentovaná data ukazují přítomnost buněk s mezenchymálními charakteristikami i ve stromatu glioblastomu, které by mohly mít pozitivní vliv na proliferační aktivitu a invazivitu glioblastomových buněk. Invazivitu buněk melanomu stimulovalo kondiciované médium z kokultury UVB ozářených keratinocytů a neozářených fibroblastů. 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, fibronectin a tenascin-C. Zkoumaný možný vztah výskytu galektinu-1, fibronectinu a tenascin-C v extracelulární matrix k prognóze nebyl v našem souboru pacientů podpořen statisticky významnými výsledky.

Abstract

Besides tumor cells themselves, tumors consist of many non-malignantly transformed cellular elements and an extracellular matrix. This tumor microenvironment significantly influences the biological properties of the tumor through direct/indirect intercellular interactions. Tumor-associated fibroblasts partly formed by myofibroblasts make up an important part of it. The tested polyamine prevents the formation of myofibroblasts but has no effect on those already formed nor on smooth muscle cells. The data show the presence of cells with mesenchymal characteristics, present even in the glioblastoma stroma, which could have a positive effect on proliferative activity and invasiveness of glioblastoma cells. The invasivity of melanoma cells was stimulated by the conditioned medium from UVB irradiated keratinocytes and non-irradiated fibroblasts. We have also attempted to further characterize the squamous 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.

Obsah

1. Úvod	1
2. Hypotézy a cíle disertační práce	4
3. Materiál a metodika.....	5
4. Výsledky.....	6
4.1. Studium dlaždicových karcinomů hlavy a krku	6
4.2. Studium nádorového mikroprostředí melanomu a vlivu UVB záření	9
4.3. Zhodnocení vlivu nádorově asociovaných fibroblastů u glioblastomu.....	10
4.4. Možnost ovlivnění nádorově asociovaných fibroblastů pomocí syntetických polyaminů.....	11
5. Diskuze a závěr.....	13
6. Seznam použité literatury	17

1. Úvod

V rozvinutých zemích, kam patří i Česká Republika, představují onkologická onemocnění druhou nejčastější příčinu úmrtí hned po kardiovaskulárních chorobách. Nádory jsou tvořeny vedle vlastních nádorových buněk také nádorovým mikroprostředím, tzv. stromatem. Mezi populací nádorových buněk a složkami stromatu probíhají neustálé vzájemné interakce buď přímým kontaktem nebo pomocí signálních molekul. 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. Není bez zajímavosti, že nádorové mikroprostředí je do značné míry podobné mikroprostředí hojícího se poranění. Významnou složku nádorového stromatu představují nádorově asociované fibroblasty. 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 tkáňové či orgánové fibrózy. To podporuje hypotézu nádoru jako nehojící se rány (Dvorak 1986).

Součástí nádorového stromatu je dále extracelulární matrix, která kromě mechanické opory rovněž ovlivňuje buněčnou

diferenciaci, přežití, tvar, migraci a mezibuněčnou komunikaci. Charakter extracelulární matrix se liší mezi zdravou a nádorovou tkání a její anomálie mění chování jak nádorových tak stromálních buněk. Například produkce fibronektinu bývá větší v nádorovém stromatu a jeho zvýšená syntéza je připisována hlavně nádorově asociovaným fibroblastům (Wang et al., 2016). Dalšími významnými glykoproteiny extracelulární matrix obratlovců jsou tenasciny. Největší pozornost je věnována tenascinu-C, po narození dochází k jeho expresi za patologických podmínek jako je infekce, zánět a nachází se i ve stromatu mnoha typů nádorů (Chiquet-Ehrismann a Chiquet, 2003).

Většina proteinů včetně proteinů podílejících se na vytváření nádorového mikroprostředí prochází základní posttranslační modifikací glykosylací. Specifické 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. Skupině lektinů, které mají schopnost vázat β -galaktosidy, se říká galektiny. V kancerogenezi jsou nejvíce diskutovány galektiny-1, -3 a -7.

V rámci spolupráce s prof. J. M. Lehnem (Institut de Sciences et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS), Univerzita ve Štrasburku) byl studován vliv vysoce molekulárně definovaných polyaminů jako potencionálního léčiva ovlivňujícího nádorové mikroprostředí, konkrétně tvorbu myofibroblastů. Polykationty včetně polyaminů díky pozitivnímu náboji dokáží indukovat tvorbu svazků aktinových vláken prostřednictvím nespecifických elektrostatických interakcí eliminací odporu mezi jednotlivými molekulami G-aktinu nebo mezi aktinovými vlákny (Tang a Janmey, 1996).

Vzhledem k dlouholeté spolupráci mezi Anatomickým ústavem s Klinikou otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN Motol a Dermatovenerologickou klinikou VFN jsem v rámci svého postgraduálního studia pokračovala ve zkoumání nádorového stromatu a mezibuněčných interakcí u dlaždicových karcinomů hlavy a krku a melanomu. Dále jsme díky projektu GAUK rozvinuli spolupráci s Ústavem biochemie a experimentální onkologie a soustředili se tak na nádorové stroma i u glioblastomů.

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 předkládané disertační práci byly analyzovány vzorky dlaždicových karcinomů hlavy a krku poskytnuté Klinikou otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN Motol, Katedra IPVZ, vzorky melanomu odebrané na Dermatologické klinice VFN a 1. LF UK a vzorky glioblastomu od pacientů léčených na Neurochirurgickém oddělení Nemocnice na Homolce. Kontrolní vzorky zdravé kůže poskytla Klinika plastické chirurgie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady 3. LF UK. Vzorky tkání se dále zpracovaly k izolaci primárních kultur a ke zhotovení zmražených řezů. Dále byla využita primární kultura hladkých svalových buněk z krysí aorty od Doc. MUDr. Lucie Bačákové CSc. z Fyziologického ústavu Akademie věd České Republiky a komerčně dostupné glioblastomové (U87, U373, T98G) a melanomové linie (BLM a A2058). Kultivace buněk probíhala v laboratoři tkáňových kultur za specifických podmínek podle charakteru a potřeb příslušných pokusů. 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. Transkripční profil studovaných buněk a tkání se stanovil za spolupráce s Ústavem molekulární genetiky AV, v.v.i., Oddělení genomiky a informatiky. Pro vyhodnocení míry senescence a proporce mrtvých buněk v kultuře sloužily běžně komerčně dostupné kity a k posouzení míry poškození DNA se využilo jednobuněčné gelové elektroforézy (kometový test). Polyamin BPA-C8 poskytla spolupracující laboratoří prof. Jean-Marie Lehna, Institut de Sciences et d'Ingénierie Supramoléculaire (ISIS), Université de Strasbourg.

4. Výsledky

4.1. Studium dlaždicových karcinomů hlavy a krku

Provedli jsme genomovou analýzu u vzorků odebraných od sedmi pacientů s dlaždicovým karcinomem orofaryngu. Od každého pacienta byl zkoumán vzorek tkáně tumoru, tkáně z okolí tumoru (okraj chirurgického resektátu) a normální tkáně z kontralaterální bukální sliznice. Expresní profil tumoru se liší od profilu zdravé tkáně ve 281 genech a profil tkáně z okolí tumoru od zdravé tkáně v 276 genech. Dále byly vzorky podrobeny imunohistochemické analýze na přítomnost galektinů a keratinů. Ukázaly se 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. 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 eventuální přítomnost nádorových buněk i v okraji chirurgického resektátu.

V další 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 charakterem extracelulární matrix a rozdíly v expresním profilu a prognózou. Tyto vzorky byly podrobeny imunohistochemické analýze na přítomnost tenascin-C (Ten), fibronektinu (Fn) a galektinu-1 (Gal-1) jakožto složek extracelulární matrix a u 26 vzorků byl zhotoven RNA profil se soustředěním na rozdíly mezi Ten⁺ a Ten⁻ nádory. Zjistila se určitá podobnost ve výskytu Ten a Gal-1, které byly silně exprimovány ve vzorcích karcinomu. Kombinace exprese Ten⁺Fn⁺Gal-1⁺ se vyskytuje statisticky významně častěji ve vzorcích nádoru (55%) než u zdravé tkáně (9%) a naopak kombinace Ten⁻Fn⁺Gal-1⁻ (45%) a Ten⁻Fn⁻Gal-1⁻ (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 ($Ten^+Fn^+Gal-1^+$ - 24%, $Ten^-Fn^+Gal-1^-$ - 36%, $Ten^-Fn^-Gal-1^-$ - 33%).

Nebyl prokázán žádný relevantní vztah mezi pozitivitou pro Ten, Fn nebo Gal-1 a stupněm postižení lymfatických uzlin. Nenašel se ani statisticky významný rozdíl v prognóze u Ten^+ a Ten^- nádorů, i když je zde patrný určitý trend, že pacienti s Ten^+ 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).

RNA microarray analýza ukázala, že Ten^+ a Ten^- nádory se liší v expresi 115 genů, mezi kterými jsou i kinázy a jejich receptory, které jsou asociované s nádorovou progresí. Dále dochází k rozdílné expresi u 154 genů u okolní nádorové tkáně u Ten^+ a Ten^- nádorů. Jedná se o zvýšenou expresi genů asociovaných s lipidovým metabolismem ve tkáni z okolí nádoru u Ten^- tumorů. RNA profil zdravé tkáně se ukázal jako podobný u Ten^+ a Ten^- nádorů.

4.2. Studium nádorového mikroprostředí melanomu a vlivu UVB záření

V práci týkající se melanomu 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). 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 ZAM. Melanomové buněčné linie BLM a A2058 byly kultivovány ve 3D kolagenních gelech. Ozáření keratinocytů nízkou dávkou (10 mJ/cm^2) mělo pouze malý stimulační efekt na migraci melanomových buněk (větší efekt u linie A2058), ozáření keratinocytů vyššími dávkami (50 a 100 mJ/cm^2) tento efekt postrádalo. Následně byl porovnáván vliv keratinocytů ozářených třemi po sobě následujícími nízkými dávkami 10 mJ/cm^2 a keratinocytů ozářených jednorázově vysokou dávkou 100 mJ/cm^2 . K takto ozářeným keratinocytům byly přidány HF a CAF do insertové kokultury a odebráno příslušné kondiciované médium.

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 byl výraznější u keratinocytů ozářených opakovaně nízkou dávkou.

Po ozáření keratinocytů 10 i 100 mJ/cm² 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/cm² neobsahuje téměř žádné mrtvé buňky bez ohledu na přítomnost HF nebo CAF, kdežto ozáření dávkou 100 mJ/cm² je pro většinu keratinocytů letální.

4.3. Zhodnocení vlivu nádorově asociovaných fibroblastů u glioblastomu

Přítomnost buněk podobných nádorově asociovaným fibroblastům u glioblastomu jsme ověřili imunofluoresčenčním obarvením zmrazených řezů vzorků glioblastomů získaných od 20 pacientů s neléčeným a nově diagnostikovaným glioblastomem na markery typické pro nádorově asociované fibroblasty a to konkrétně hladký svalový aktin (SMA) a TE-7. Oba markery byly exprimovány

v GFAP-negativních buňkách (glial fibrillary acidic protein), které se zejména nacházely v okolí abnormálních cév. Použili jsme fibroblasty izolované ze stromatu maligního melanomu jako model nádorově asociovaných fibroblastů odvozených od tumoru neuroektodermového původu (buněčná linie ZAM). Byl zkoumán jejich vliv na proliferaci a migraci glioblastomových buněk.

Kondiciovaná média z nádorově asociovaných fibroblastů a z normálních zdravých lidských fibroblastů podporovala růst glioblastomových buněk, rozdíl mezi nimi nebyl statisticky významný. Dále byl hodnocen jejich možný efekt na migraci glioblastomových buněk a to pomocí „*transwell migration assay*“. 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

Část nádorově asociovaných fibroblastů 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. Testovali jsme vliv syntetického polyaminu BPA-C8 na tvorbu myofibroblastů v buněčné kultuře zdravých lidských dermálních fibroblastů stimulovaných TGF- β 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- β 1 spolu s galektinem-1 tvorbu myofibroblastů potencuje a obě substance mají rovněž stimulační vliv na tvorbu extracelulární matrix konkrétně charakterizované vyšší produkcí galektinu-1 a tenascinu. Obě testované koncentrace BPA-C8 (20 μ M a 100 μ M) tento efekt kompletně inhibovaly. Pouze 100 μ M koncentrace BPA-C8 v kultivačním médiu nápadně redukovala počet fibroblastů. Pozitivní proliferační efekt TGF- β 1 a galektinu-1 byl potlačen oběma testovanými koncentracemi (20 μ M a 100 μ M) užitého polyaminu. 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. Výskyt buněk

pozitivních na β -galaktosidasu, která je vázaná na senescenci, byl hojnější v místech o větší buněčné hustotě ve stimulovaných kulturách TGF- β 1 s galektinem-1. Tento počet senescentních buněk výrazně klesl, když kultivační médium obsahovalo kombinaci TGF- β 1, galektin-1 a BPA-C8 (100 μ 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. Výsledky ukázaly, že efekt BPA-C8 na hladké svalové buňky nebo na již vytvořené myofibroblasty je zanedbatelný, stejně tak jako jeho vliv na již vytvořený fibronectin extracelulární matrix.

5. Diskuze a závěr

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.

1. Ve dvou z předkládaných prací byly studovány a porovnávány vlastnosti vzorků dlaždicového karcinomu hlavy a krku, tkáně z okraje chirurgického resektátu a zdravé sliznice z kontralaterální strany dutiny ústní a hledány nové možné prognostické znaky, které by umožnily jednotlivé nádory lépe charakterizovat a

nastavit tak individuálně přizpůsobenou terapii. 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. Je zajímavé, že makroskopicky nepostižená tkáň z okraje chirurgického resektátu vykazuje určitou podobnost s tkání vlastního nádoru. 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). 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. RNA microarray analýza ukázala, že Ten⁺ a Ten⁻ nádory se liší v expresi 115 genů. 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. Absence vztahu mezi expresí tenascinu a prognózou u orálních a faryngeálních

karcinomů již byla ale zaznamenána i v jiné práci (Atula et al., 2003).

2. Druhým cílem bylo zhodnocení vlivu UVB záření na nádorové stroma melanomu, konkrétně keratinocyty a následný efekt na melanomové buňky. V normální epidermis keratinocyty s melanocyty tvoří funkční jednotku a vzájemně se ovlivňují. Dokázali jsme, 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- α , IL-6, IL-1 β a IL-8 a ovlivnily expresi genů glykosyltransferázy v melanocytech podobně, jako k tomu dochází u melanomu (Miyata et al., 2014).
3. V další práci jsme se věnovali studiu potenciálního vlivu nádorově asociovaných fibroblastů na buňky glioblastomu. Prokázali jsme přítomnost buněk s mezenchymovými charakteristikami ve stromatu glioblastomu a výše diskutované poznatky podporují hypotézu, že nádorové stroma, konkrétně buňky podobné nádorově asociovaným fibroblastům, je důležité i

u těchto letálních mozkových tumorů. V literatuře byla popsána 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).

4. V posledním vymezeném cíli jsme se soustředili na možnost ovlivnění nádorově asociovaných fibroblastů pomocí syntetických polyaminů. Ty mají vliv na morfologii a biologické vlastnosti aktinového cytoskeletu a mají inhibující efekt na tvorbu myofibroblastů indukovanou TGF- β 1 a galektinem-1 a žádný efekt na již existující SMA pozitivní buňky. Extracelulární matrix bohatá na galektin-1 a tenascin je spojená s nádorovou progresí (Adams et al., 2002). Snížení tvorby myofibroblastů a biologicky aktivní extracelulární matrix tak má potenciál pro otevření nové cesty v léčbě nádorových onemocnění.

6. Seznam použité literatury

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.

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.

Clavreul A, Etcheverry A, Chassevent A, Quillien V, Avril T, Jourdan ML, Michalak S, Francois P, Carre JL, Mosser J, Grand O, Oest Glioma Project N, Menei P. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *J Neurooncol.* 2012; 106(3): 493-504.

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

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.

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.

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.

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

Seznam publikací

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertační práce

S IF:

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- β 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**
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**
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**
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

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 induced by UV-irradiated keratinocytes.** *Histochem Cell Biol.* 2018; 149(5): 503-516. IF 2,164

Bez IF: 0

Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertační práce

S IF: 0

Bez IF:

1. Mifková A., Živicová V., Kluh J., Lis J., Plzák J., Fík Z., Bouček J. **Osteomyelitis centrální části baze lebni.** *Otorinolaryng. a foniatic.* 2018; 67(1): 32-35
2. Mifková A., Kratochvíl V., Kešner A., Skřivan J., Plzák J. **Endoskopická resekce juvenilního angiofibromu nosohltanu** *Otorinolaryng. a foniatic.* 2018; 67(3): 43-48