

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Bc. Veronika Miltrová**

Analýza exprese cytokinů u MeLiM prasečího modelu regredujícího melanomu  
Cytokine expression in regressive melanoma on porcine MeLiM model

Diplomová práce

Školitelka: Mgr. Helena Skalníková Kupcová, Ph.D.

Praha, 2020

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08.06.2020

Bc. Veronika Miltrová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala zejména Heleně Kupcové Skalníkové za vedení při navrhování experimentů, analýz a i při psaní diplomové práce, za její trpělivost a velmi cenné rady. Dále bych ráda poděkovala Petru Vodičkovi za neskutečnou pomoc při zpracování získaných dat a jejich analýz. Kateřině Kepkové Vodičkové za pomoc se zvládnutím qPCR techniky a všech mezikroků s tím souvisejících, a dále za věnování primerů pro qPCR experiment. Janě Čížkové za pomoc při získání analyzovaného materiálu z MeLiM prasat a její péči o ně, a dále za věnování primerů pro qPCR experiment. Vratislavu Horákovi za pomoc s histologickou analýzou a za poskytnutí podrobných informací ohledně MeLiM modelu. Mé díky patří také Jitce Klučinové a Jaroslavě Šestákové, které byly vždy mou pravou rukou, když jsem potřebovala. Ráda bych poděkovala všem členům laboratoře tvořícím příjemný pracovní kolektiv, kteří mi vždy byli ochotni jakkoliv pomoci. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala svému snoubenci a celé rodině za veškerou podporu během mého studia.

## Abstrakt

Kožní melanom je velmi agresivní nádorové onemocnění se stále se zvyšující incidencí. Vzniká maligní transformací kožních pigmentových buněk (melanocytů). Největší podíl na vzniku melanomu má sluneční UV záření a opakované spálení. Přibližně v 10 % případů melanom vzniká na dědičném podkladě. Pacienti s kožním melanomem diagnostikovaným v časném stádiu bez založených metastáz mají velmi dobrou prognózu a k léčbě mnohdy stačí pouze chirurgické odstranění primárního nádoru. Oproti tomu pokročilá stádia kožního melanomu jsou jen těžko léčitelná a často dochází k progresi onemocnění. Kožní melanom je označován jako imunogenní nádor, který je často infiltrován buňkami imunitního systému. Nádory s infiltrací imunitními buňkami mají lepší prognózu. Může docházet i ke spontánní regresi. Během několika posledních let byl v léčbě melanomu zaznamenán pokrok v terapii s využitím tzv. checkpoints molekul (anti-CTLA-4 a anti-PD-1) k aktivaci pacientova imunitního systému k rozeznání nádorových ložisek. V nádorovém mikroprostředí hrají důležitou roli cytokiny, umožňující komunikaci mezi buňkami a regulující jejich proliferaci a migraci a tím vývoj nádoru. Cytokiny mohou být využity v podpůrné terapii (IL-2, IFN $\alpha$ ).

Tato práce sledovala hladiny exprimovaných cytokinů za využití prasečího modelu dědičného kožního melanomu, konkrétně linie MeLiM prasat. Na tomto unikátním modelu byla sledována exprese cytokinů na úrovni mRNA a proteinů v průběhu počátečních stádií spontánní regrese melanomu. Byla nalezena zvýšená exprese IL-6 v nádorové tkáni oproti okolní zdravé kůži. Následně byly významné změny v expresi cytokinů porovnány s výsledky jiných studií. Analýza imunologických změn během spontánní regrese na MeLiM modelu může pomoci pochopit biologii nádoru a přinést poznatky využitelné i v lidské medicíně.

**Klíčová slova:** kožní melanom, cytokiny, IL-4, IL-6, IL-8, MeLiM, prasečí model, spontánní regrese

## **Abstract**

Cutaneous melanoma is a very aggressive cancer with increasing incidence. It originates from transformed pigmented skin cells (melanocytes). The main risk factor for melanoma development is exposure to UV light and repeated sunburns. In approximately 10 % of cases, melanoma occurs on hereditary basis. Patients with cutaneous melanoma diagnosed in early stages have very good prognosis, with surgical resection of the primary tumour being mostly sufficient for treatment. In contrast, the advanced melanoma stages with metastases are often progressive and refractory to conventional therapies. Cutaneous melanoma is referred to as an immunogenic tumour that is frequently infiltrated by cells of the immune system. Tumours with immune cell infiltration show better prognosis. Spontaneous regression may occur. Over the last few years, progress has been made in the treatment of melanoma using checkpoint molecules (anti-CTLA-4 and anti-PD-1) to activate patients own immune system to recognize tumour lesions. In the tumour microenvironment, cytokines play an important role, enabling communication between cells and regulation of cell proliferation and migration and thus the tumour development. Cytokines (IL-2, IFN $\alpha$ ) can be used in adjuvant therapy of melanoma.

This work analysed levels of expressed cytokines in a porcine model of hereditary cutaneous melanoma – MeLiM pig. In this unique model, cytokine expression was monitored at the mRNA and protein levels during initial stages of melanoma regression. Increased expression of IL-6 in the tumour tissue, compared to adjacent healthy skin, was detected. Subsequently, significant changes in cytokine levels were discussed with findings from other studies. Analysis of immunological changes during melanoma spontaneous regression on MeLiM model might help us to understand the tumour biology and has a potential to bring new knowledge applicable in human medicine.

**Key words:** cutaneous melanoma, cytokines, IL-4, IL-6, IL-8, MeLiM, pig model, spontaneous regression

## Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratek.....	8
1 Úvod.....	10
2 Současný stav poznání .....	12
2.1 Kožní maligní melanom.....	12
2.2 Epidemiologie kožního melanomu .....	14
2.3 Familiární kožní melanom .....	16
2.4 Nádorové mikroprostředí .....	18
2.5 Spontánní regrese kožního maligního melanomu.....	18
2.6 Cytokiny a chemokiny .....	19
2.6.1 Tumor nekrotizující faktor alfa.....	20
2.6.2 Interferon $\gamma$ .....	20
2.6.3 Interleukin 1.....	21
2.6.4 Interleukin 2.....	21
2.6.5 Interleukin 4.....	22
2.6.6 Interleukin 6.....	22
2.6.7 Interleukin 8.....	23
2.6.8 Interleukin 10.....	24
2.6.9 Interleukin 12.....	24
2.6.10 Interleukin 18.....	24
2.6.11 GM-CSF .....	25
2.7 Melanoma-bearing Libechov Minipigs .....	25
3 Cíle práce.....	30
4 Materiál .....	31
4.1 Materiál.....	31
4.2 Chemikálie a roztoky .....	31
4.3 Molekulárně biologické soupravy a chemikálie pro qRT-PCR.....	32
4.4 Primery použité v metodě qRT-PCR.....	32

4.5	Molekulárně biologické soupravy a chemikálie pro imuno-testování založené na Luminex xMAP .....	33
4.6	Molekulárně biologické soupravy a chemikálie pro BCA testování .....	33
4.7	Přístroje a programy.....	33
4.8	Zvířata .....	34
5	Metody .....	35
5.1	Odběr vzorků .....	35
5.2	Příprava krevní plazmy .....	35
5.3	Příprava nádorové tkáně na měření cytokinů pomocí Luminexu .....	36
5.4	Stanovení koncentrace cytokinů v plazmě a supernatantu z nádorové tkáně pomocí Luminex analýzy.....	36
5.5	Izolace celkové RNA z melanomu a zdravé kůže .....	38
5.6	Reverzní transkripce RNA z melanomové a zdravé tkáně .....	38
5.7	Kvantitativní real-time PCR cDNA z melanomové a zdravé tkáně .....	38
5.8	Příprava vzorků z qRT-PCR na sekvenování .....	40
5.9	Histologické barvení kryožezů a jejich vyhodnocení.....	40
5.10	Stanovení koncentrace proteinů v supernatantu z nádorové tkáně .....	41
6	Výsledky.....	42
6.1	Makroskopické a hematologické sledování MeLiM selat .....	42
6.2	Histologická analýza kožního melanomu MeLiM selat .....	45
6.3	Kvantifikace cytokinů v krevní plazmě MeLiM selat .....	47
6.4	Kvantifikace cytokinů na úrovni proteinů v nádorové tkáni .....	52
6.5	Analýza exprese cytokinů na úrovni mRNA v nádorové tkáni a okolní kůži .....	54
6.5.1	Ověření specifické amplifikace při qRT-PCR.....	54
6.5.2	Relativní kvantifikace mRNA kódujících cytokiny pomocí qRT-PCR .....	55
6.6	Korelace exprese mRNA a proteinů v melanomu .....	60
7	Diskuze.....	62
8	Závěr.....	69
9	Seznam použité literatury .....	70
10	Přílohy .....	89

## Seznam zkratek

APCs	Antigen presenting cells	antigen prezentující buňky
BAP1	BRCA1 associated protein 1	BRCA1 asociovaný protein 1
baso	Basophil	basofily
BCA	Bicinchoninic acid	bicinchoninová kyselina
BRAF	B-Raf protein	B-Raf protein
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein	protein rakoviny prsu 1
CD	Cluster of differentiation	diferenční skupina
CDK4	Cyclin dependent kinase 4	cyklin-dependentní kináza 4
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A
Ct	Threshold cycle	prahový cyklus
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4	cytotoxický T-lymfocytární antigen 4
CUSB	Cation efflux system protein cusB	protein kationtového efluxního systému
DCs	Dendritic cells	dendritické buňky
DNA	Deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DP	Double positive	dvojitě pozitivní
eos	Eosinophil	eosinofily
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor	factor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HCT	Hematocrit	hematokrit
HGB	Haemoglobin	hemoglobin
HGF	Hepatocyte growth factor	hepatocytární růstový faktor
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	hypoxantin fosforibosyltransferáza 1
IFN	Interferon	interferon
IL	Interleukin	interleukin
IL-1RA	Interleukin 1 receptor antagonist	IL-1 receptor antagonist
lymph	Lymphocyte	lymfocyty
MAD	Median absolute deviation	střední hodnota absolutní odchylky
MeLiM	Melanoma bearing Libechov Minipig	linie liběchovských miniaturních prasat nesoucích melanom
MFI	Median of fluorescent intensity	medián intensity fluorescence
MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex



MITF	Microphthalmia associated transcription factor	transkripční faktor asociovaný s mikroftalmií
ML-IAP	Melanoma inhibitor of apoptosis	melanomový inhibitor apoptózy
mono	Monocyte	
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
neut	Neutrophil	neutrofil
NK	Natural killer (cell)	přírození zabíječi
NOM	Number of melanoma	počet nádorů u zvířete
PC	Principal Component	hlavní komponenta
PCA	Principal Component Analysis	analýza hlavních komponent
PD-1	Programmed cell death protein 1	protein programované buněčné smrti 1
PDL-1	Programmed death ligand 1	ligand programované buněčné smrti 1
PLT	Platelets	krevní destičky
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction	kvantitativní real-time PCR
RBC	Red blood cell	červené krvinky
RNA	Ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
STAT	Signal transducer and activator of transcription	převodník signálu a aktivátor transkripce
Tc	cytotoxický T-lymfocyt	T cytotoxické lymfocyty
Th	T-helper lymfocyt	T pomocné lymfocyty
TILs	Tumor infiltrating lymphocytes	nádor infiltruující lymfocyty
TNF	Tumor necrosis factor	tumor nekrotizující faktor
TNM	Tumore Node and Metastases	nádor, uzliny a metastázy
Treg	T regulatory lymfocyt	T regulační lymfocyty
UV	ultraviolet	ultrafialový
VEGF	Vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
WBC	White blood cell	bílé krvinky

## 1 Úvod

Kožní maligní melanom je velice agresivní nádorové onemocnění vycházející z pigmentových buněk melanocytů. V současné době, kdy jiné typy nádorových onemocnění zaznamenávají v západním světě spíše pokles incidence, u kožního melanomu incidence naopak stoupá (Ferlay et al., 2015). Hlavním rizikovým faktorem vzniku kožního melanomu je intenzivní expozice pokožky slunečnímu záření. Vznik tohoto nádoru dále ovlivňuje genetická vnímavost, faktory prostředí a imunosuprese (Schadendorf et al., 2015). Přibližně 10 % melanomů se vyskytuje v rodinách, kde přítomnost zárodečných mutací vede ke zvýšené vnímavosti jedinců ke vzniku onemocnění. Prognóza pacientů je vysoce závislá na stádiu nádorového ložiska v době diagnózy. Při včasné diagnóze (stádium 1) je přibližně 99 % pravděpodobnost pětiletého přežití. Naopak nádory šířící se mimo svou původní lokalizaci mají velmi špatnou prognózu. V posledních letech došlo ke skokovému posunu v léčebných metodách kožního melanomu, nově jsou využívány inhibitory kináz a blokátory molekul kontrolních uzlů.

Nádorové mikroprostředí melanomu je velice heterogenní. Je tvořeno nejen maligními melanocyty, ale i keratinocyty a podpůrnými buňkami stromatu (fibroblasty, endotelové buňky, imunitní buňky, aj.) a extracelulárním prostředím (např. extracelulární matrix). Vzájemné interakce složek mikroprostředí ovlivňují vznik, růst a šíření nádoru. Melanom je imunogenní nádor, často hojně infiltrovaný imunitními buňkami, což ovlivňuje prognózu onemocnění. V komunikaci mezi buňkami nádorového mikroprostředí a zároveň v regulaci imunitní odpovědi hrají velmi důležitou roli signální proteiny, zejména pak cytokiny.

Cytokiny jsou sekretované proteiny, které jsou schopny regulovat, aktivovat nebo naopak inhibovat aktivitu imunitních buněk a současně ovlivňují sekreci jiných cytokinů a regulačních faktorů. Cytokiny a jejich receptory se používají v klinické praxi k diagnostice a prognostice nádorových onemocnění. Další využití mají v terapii, kde pomocí cytokinů lze ovlivnit nastavení imunitního systému a podpořit či nastartovat přirozenou protinádorovou imunitu. V této oblasti nejsou však ještě všechna místa probádána a vzhledem k nízkým koncentracím sekretovaných cytokinů je celý systém velice citlivý k disharmonii a k vnějším zásahům. Proto je nutno stále rozvíjet naše poznatky o systému jako celku a snažit se mu porozumět. Tyto poznatky lze potom uplatnit ke zlepšení diagnostických i terapeutických postupů a zvýšit tak šanci pacientů na přežití.

Tato práce je zaměřena na analýzu exprese a hladin sekretovaných cytokinů u kožního melanomu na prasečím modelu dědičného melanomu. Prasečí model vykazuje člověku podobnou histologickou stavbu kůže. Linie liběchovských miniaturních prasat nesoucích melanoma (MeLiM – Melanoma bearing Libechov Minipig) byla vyšlechtěna křížením spontánním melanomem postižených jedinců v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově, kde svoji diplomovou práci vypracovávám. Cytokiny jsem sledovala během vývoje onemocnění na úrovni mediátorových ribonukleových kyselin (mRNA) a současně na úrovni proteinů. K detekci cytokinů na úrovni proteinů jsem použila vysoce citlivou metodu multiplexní průtokové cytometrie – Luminex xMAP analýzu, s jejíž pomocí jsme schopni detekovat i velmi nízké koncentrace proteinů a zaznamenat změny v jejich sekreci. Hladiny cytokinů jsou porovnány s histologickým nálezem a celkovým stavem zvířat s cílem najít molekuly související s regresí nádorových ložisek.

V krevní plazmě MeLiM selat s regredujícím průběhem onemocnění jsme prokázali vyšší hladiny interleukinu 4 (IL-4) oproti krevní plazmě selat s progredujícím vývojem melanomu. V nádorové tkáni jsme zjistili vyšší hladiny mRNA kódující cytokiny IL-6 a IL-1 $\beta$  než v okolní zdravé kůži.

## 2 Současný stav poznání

### 2.1 Kožní maligní melanom

Kožní maligní melanom je zhoubné nádorové onemocnění, vznikající z melanocytů. Melanocyty jsou kožní pigmentové buňky původem z neurální lišty, které během embryogeneze osídlují epidermis. Melanocyty jsou zodpovědné především za produkci a transfer biopolymeru melaninu do okolních buněk, a to převážně do keratinocytů. Epidermální melanocyty tvoří silné a těsné kontakty s okolními keratinocyty, a právě díky těmto těsným spojmům je přenos melaninu umožněn. Melanin je pigment, který má za úkol chránit kůži před ultrafialovým (UV) zářením. Melanocyty se nejvíce vyskytují v kůži, dále pak ve vlasových folikulech, vnitřním uchu a meningách uveálního traktu oka (Cichorek et al., 2013).

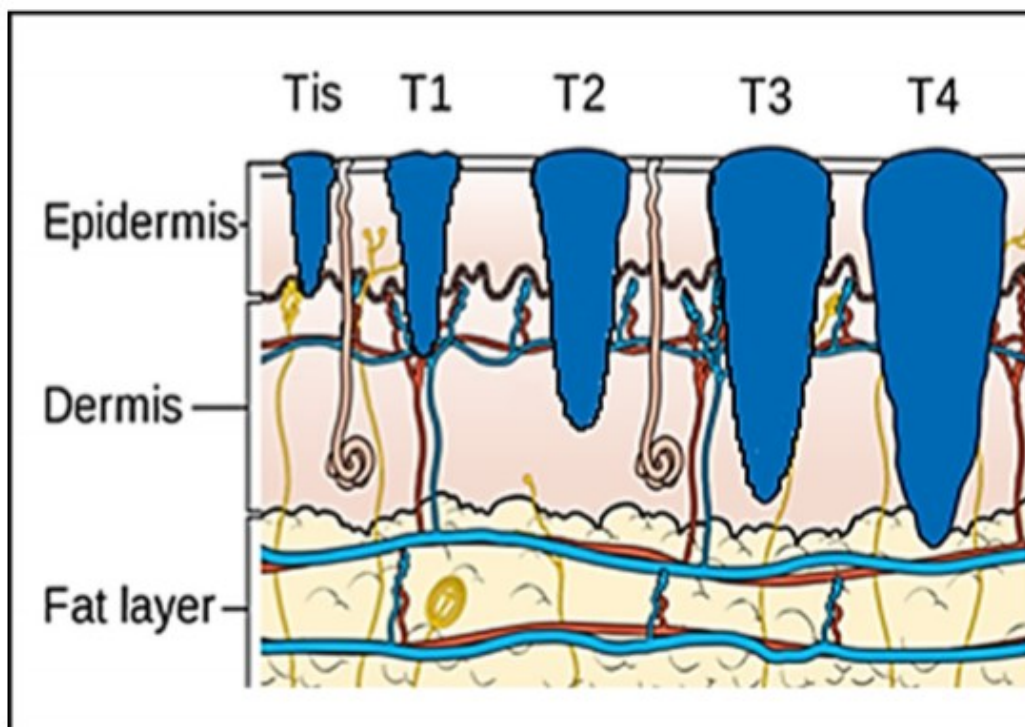
Maligní melanom je považován za jedno z nejagresivnějších nádorových onemocnění, které je zároveň velmi terapeuticky rezistentní. Podle dostupných dat dochází ke stále se zvyšující incidenci tohoto nádorového onemocnění, zejména v evropské, severoamerické a australské populaci.

Melanomogeneze neboli proces, kdy se z melanocytů stává melanom je několika krokový proces. Při maligní transformaci dochází k proliferaci melanocytů a formování névů nebo benigní kožní léze, kde se melanocyty seskupují a ztrácejí svůj charakteristický kontakt s keratinocyty (Haass et al., 2005). Za běžných podmínek homeostáza určuje, zda buňka zůstává v klidovém stavu, proliferuje, diferencuje nebo podléhá apoptóze. Homeostatické podmínky nastavují keratinocyty pomocí komplexního systému parakrinních růstových faktorů a mezibuněčných adhezních molekul. V momentě vychýlení z homeostatického stavu (snížená exprese receptorů na melanocytech, zvýšená exprese receptorů a signálních molekul, ztráta ukotvení k bazální membráně) může docházet k dysregulaci buněčného cyklu a nekontrolované proliferaci, která může vygradovat až ke vzniku kožního melanomu.

K diagnostice se používá klasifikační algoritmus ABCDE – asymetrie (**A**symmetry), nepravidelné ohraničení (**B**order), barevná pestrost (**C**olor), průměr (**D**iameter) a vývoj v čase (**E**volving). V konečném důsledku rozlišujeme několik stádií melanomu, podle rozličných měřítek, např. Clarkeho stupnice, Breslowova stupnice a TNM klasifikace (rozsah primárního nádoru, metastázy v regionálních lymfatických uzlinách, vzdálené metastázy). Kožní melanom se vyskytuje ve čtyřech základních histologických typech – povrchově se šířící melanom,

nodulární melanom, lentigo maligna melanom a akrolentiginózní melanom (Rastrelli et al., 2014).

Na obrázku č. 1 je znázorněn rozsah primárního nádoru (T) a postupné prorůstání nádoru vrstvami kůže (Satheesha et al., 2017).



**Obr. č. 1: T stádia melanomu.** Na základě hloubky primárního nádoru je určováno stádium melanomu. „Tis“ představuje počáteční fázi melanomu a nádor je lokalizován v epidermis (tj. pokožce). Primární nádor T1 má hloubku menší než 1 mm a je stále lokalizován v epidermis. Pokud došlo k růstu nádoru do škáry (dermis) a jeho hloubka je pohybuje od 1 mm do 2 mm, je nádor v T2 stádiu. Stádium T3 zahrnuje nádory tloušťky primárního ložiska 2 až 4 mm, pokud jsou stále lokalizovány v dermis. Pokud je hloubka růstu primárního nádoru větší než 4 mm a šíří se mimo dermis, je označován stádiem T4 (Satheesha et al., 2017).

V léčbě melanomu se používá chirurgické vyříznutí, chemoterapie, cílená terapie a imunoterapie, někdy je zařazena i radioterapie (Crompton et al., 2019). Nádory v pokročilých stádiích na léčbu reagují jen omezeně. Často v praxi dochází ke kombinaci různých léčebných postupů.

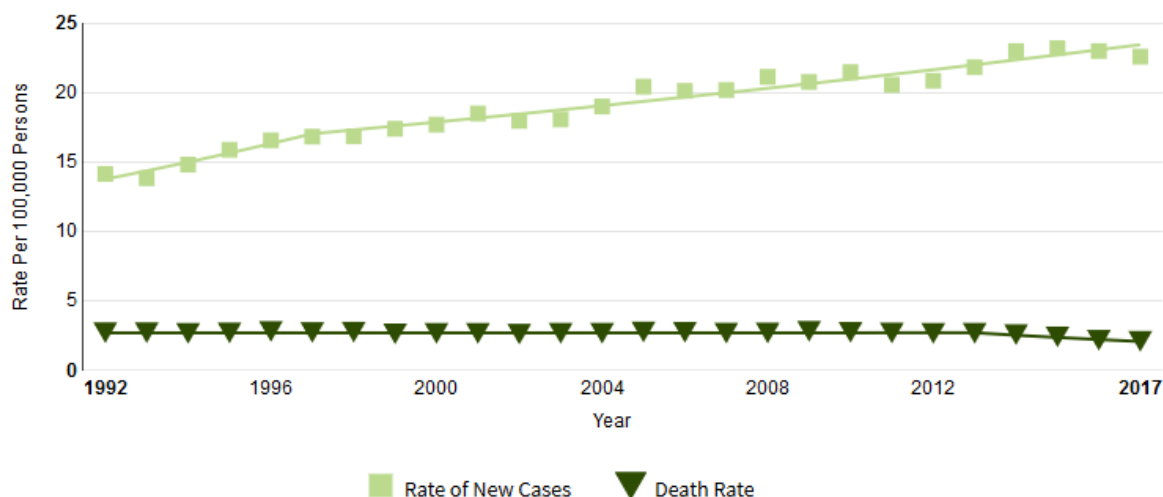
Kromě klasické léčby pomocí excize, chemoterapie a případně radioterapie se v klinické léčbě využívá i imunogenity vlastního nádoru. V posledních 20 letech byla snaha využít IL-2 k aktivaci T a B lymfocytů v boji s nádorovými ložisky u metastazujících melanomů. Tato léčba je však úspěšná jen u některých pacientů a je často doprovázena vedlejšími účinky. K aktivaci imunitního systému se od roku 2011 využívá i interferon  $\alpha$ -2b (IFN $\alpha$ -2b). K obrovským

pokrokům a zefektivnění terapie došlo po zavedení protilátek proti molekulám kontrolních uzlů, kam patří cytotoxický T-lymfocytární antigen 4 (CTLA-4) a molekula programované buněčné smrti 1 (PD-1) a ligand programované buněčné smrti 1 (PDL-1) (Hartman & Lin, 2019). Tyto moderní imunoterapie mají za cíl zejména zvýšit počet cytotoxických lymfocytů diferenciací skupiny 8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>).

## 2.2 Epidemiologie kožního melanomu

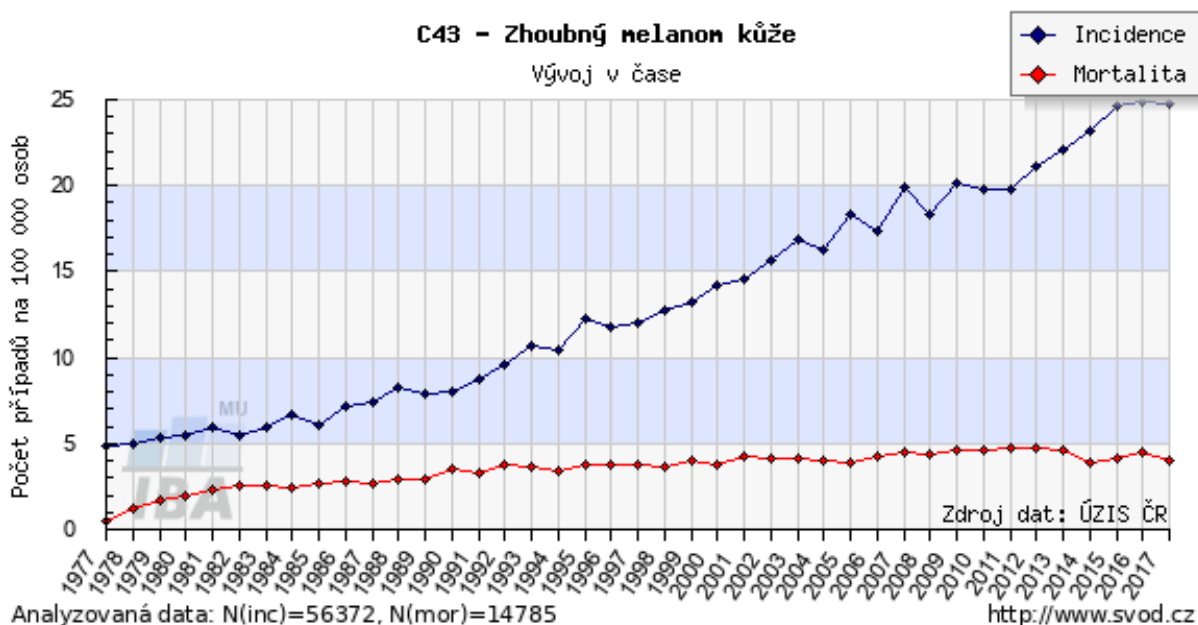
Kožní melanom je multifaktoriální onemocnění vznikající interakcí mezi genetickou predispozicí a faktory vnějšího prostředí. Mezi hlavní rizikové faktory podílející se na etiopatogenezi kožního melanomu patří velké množství běžných melanocytárních névů, atypické névy, světlý kožní fenotyp, vystavení UV záření a pozitivní rodinná anamnéza (Rossi et al., 2019). UV záření má velký vliv na vývoj melanomu, a to až u 90 % případů (Jr et al., 2015). Podíl na vzniku melanomu mohou mít i genetické predispozice a přibližně v 10 % případů se melanom vyskytuje v rodinách (familiární melanom) (Florell et al., 2005).

V posledních dekádách dochází ke zvýšení incidence kožního melanomu v celosvětové populaci, a to o 3-8 % ročně (Erickson & Driscoll, 2010; Garbe & Leiter, 2009; *Melanoma Skin Cancer | Understanding Melanoma*, n.d.). Tento trend je zaznamenán na obrázku č. 2.



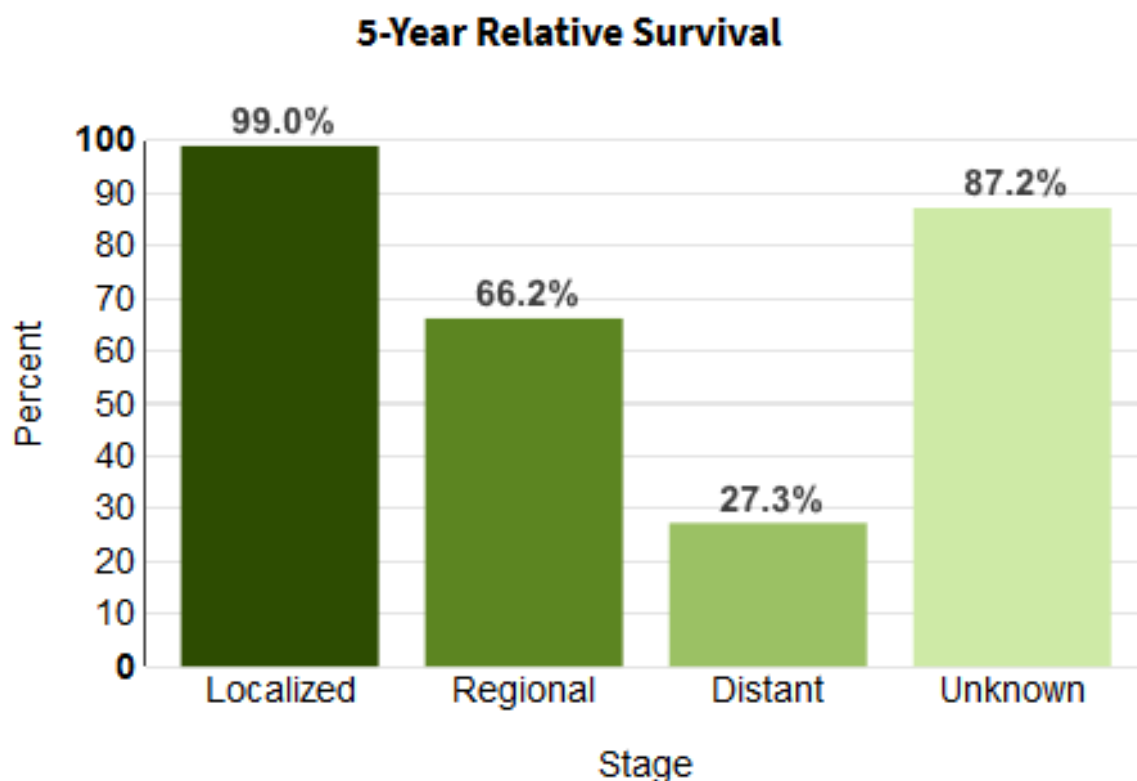
**Obr. č. 2: Incidence melanomu.** Grafické znázornění zvyšující se incidence melanomu mezi roky 1992 až 2017 ve Spojených státech Amerických (hodnota vztažena na 100 000 osob). Stejný trend je sledován na Evropské úrovni i v jednotlivých samostatných státech (*Melanoma of the Skin - Cancer Stat Facts*, n.d.).

V České republice patří kožní melanom u obou pohlaví mezi jedno z nejčastěji diagnostikovaných nádorových onemocnění. Ročně je v ČR diagnostikováno okolo 2000 případů. Stejně jako ve světě i u nás incidence nových případů narůstá (obr. č. 3) (SVOD Report, n.d.).



**Obr. č. 3: Incidence a mortalita.** Časový vývoj incidence a mortality maligního melanomu v České Republice mezi lety 1977 až 2017 (SVOD Report, n.d.).

Na rozdíl od vzrůstající incidence má mortalita u maligního melanomu v ČR setrvalý až klesající trend (obr. č. 3). To může být z velké části způsobeno včasnou diagnostikou. Raná stádia, kdy je nádor lokalizovaný a jde snadno operativně odstranit, mají vysokou šanci na úspěšnou léčbu (u pacientů diagnostikovaných v I. stádiu kožního je zhruba 99 % šance 5letého přežití) (2018a, 2018b). Nádory v pozdějších stádiích, zejména pak s tvorbou metastáz (nejčastěji např. v regionálních lymfatických uzlinách, slezině, plicích, mozku), jsou často rezistentní ke konvenčním terapiím a mají rychlý progresivní průběh končící fatálně (Soengas & Lowe, 2003). Obrázek č. 4 ukazuje pětileté přežití u pacientů podle stádia nádoru v době diagnózy.



**Obr.č. 4:** Grafické znázornění pětiletého přežití pacientů s melanomem, podle rozsahu primárního ložiska. Počet přeživších je vyjádřen v procentech. U lokalizovaného kožního melanomu bez zasažení regionálních lymfatických přežívá min. 5 let 99 % pacientů. Při postižení regionálních lymfatických uzlin klesne 5-leté přežití na 66.2 %. Jsou-li založeny i vzdálené metastázy je pravděpodobnost 5-letého přežití pouze 27,3 % (*Melanoma of the Skin - Cancer Stat Facts*, n.d.).

Velkou nadějí pro léčbu a prognostickou diagnostiku metastáz maligního melanomu je validace a predikce biomarkerů spojených s tímto onemocněním.

### 2.3 Familiární kožní melanom

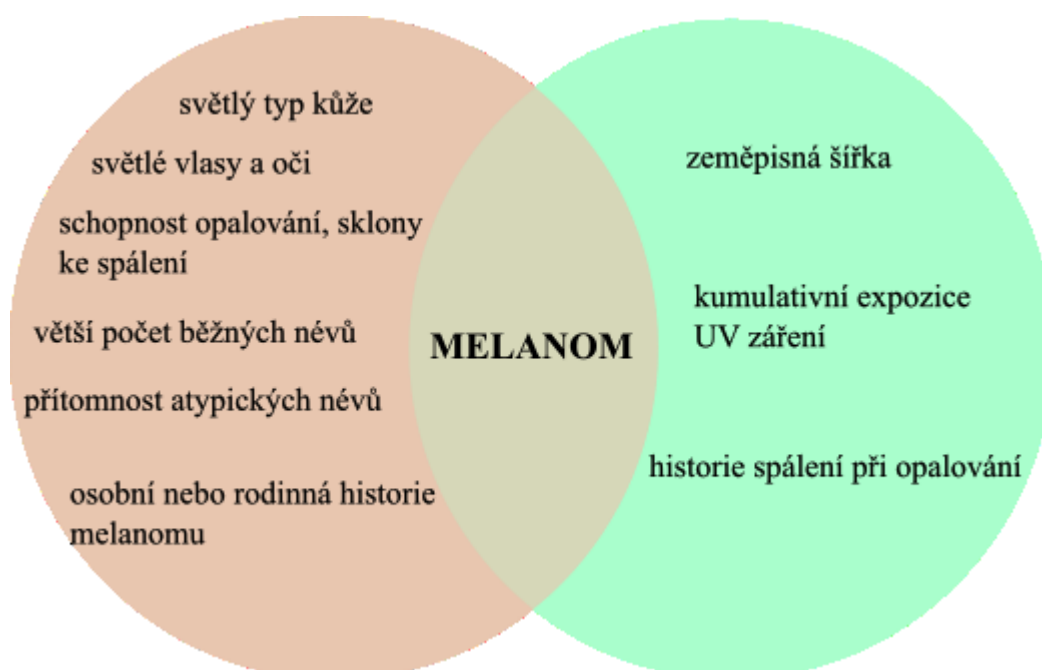
Jak již bylo řečeno, přibližně u 8 až 12 % pacientů dochází k familiárnímu výskytu kožního melanomu. Definice familiárního melanomu je spojená s pozitivní rodinnou anamnézou, kde se vyskytují dva melanomové novotvary v přímé příbuznosti nebo tři a více pacientů s melanomem z jedné a té samé strany rodiny (Gandini et al., 2005). S větším rizikem vzniku kožního melanomu je spojován i určitý fenotyp člověka, obecně označován jako světlý fototyp (fototyp I). Tento fototyp se vyznačuje především světlou kůží, větším množstvím pih, blondatými, světlými nebo zrzavými vlasy, modrýma, zelenýma nebo šedýma očima. Kožní melanom je u těchto pacientů často diagnostikován v mladším věku (<40 let).



Bylo objeveno několik genů, jejichž zárodečná mutace může vést k familiárnímu výskytu kožního melanomu. Jako první s predispozicí ke vzniku melanomu byl identifikován gen inhibitoru cyklin-dependentní kinázy 2A (CDKN2A), který kóduje p16<sup>INK4A</sup> a p14<sup>ARF</sup> tumor supresorové proteiny (CDKN2A Gene - GeneCards | ARF Protein | ARF Antibody, n.d.). Protein p16<sup>INK4A</sup> v případě mutace není schopen inhibovat cyklin-dependentní kinázu 4 (CDK4) a její enzymatickou aktivitu (Wölfel et al., 1995). Četnost výskytu konkrétní mutace záleží na rodinné anamnéze a zeměpisné lokalizaci (Goldstein et al., 2006). Zatím známe asi 30 missense mutací na CDKN2A, z toho se nejčastěji vyskytuje pouze pět variant (Goldstein et al., 2006). Ukázalo se, že jak CDKN2A, tak CDK4 představují geny, jejichž mutace výrazně zvyšují pravděpodobnost vývoje maligního melanomu (angl. High susceptibility genes).

Další mutace ovlivňující vznik melanomu byla identifikována v genu pro prsní rakovinu 1 (BRCA1) asociovaném proteinu 1 (BAP1). Mutace tohoto genu vede ke ztrátě exprese BAP1. BAP1 funguje jako součást proteinů reagující na poškození deoxyribonukleových kyselin (DNA), oprava dvouřetězcových zlomů (Ismail et al., 2014). Zárodečné mutace transkripčního faktoru asociovaného s mikroftalmií (MITF) zvyšují riziko vzniku kožního melanomu třikrát až pětkrát (Soura et al., 2016). MITF je hlavním transkripčním regulátorem melanomového inhibitoru apoptózy (ML-IAP), který je exprimován v nádorové tkáni melanomu. Z tohoto důvodu by MITF mohl mít vliv na progresi nádoru (Dynek et al., 2008).

Genové mutace jsou spojené s dřívější incidencí kožního melanomu, oproti rodinám bez mutací se melanom vyskytuje až o 9 let dříve (Goldstein et al., 2006).



**Obr.č. 5: Příčiny melanomu.** *Melanom je multifaktoriální onemocnění, na kterém se podílí jak genetické (vlevo), tak environmentální (napravo) faktory podporující vývoj nádorového onemocnění. Obrázek upraven podle předlohy (Psaty et al., 2010).*

## 2.4 Nádorové mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí je velice heterogenní a neskládá se pouze z transformovaných melanocytů, ale také ze zdravých stromálních buněk, jako jsou keratinocyty, fibroblasty, endotelové buňky a buňky imunitního systému. Interakce mezi maligními buňkami a podpůrnými buňkami stromatu, interakce buněk s extracelulárními složkami, jako jsou extracelulární matrix či sekretované faktory, se dohromady účastní regulace růstu a šíření maligního melanomu nebo mohou ovlivňovat i odpověď nádoru na léčbu.

## 2.5 Spontánní regrese kožního maligního melanomu

U 10-50 % případů kožního melanomu dochází k samovolnému vymizení části primárního ložiska, tj. částečné spontánní regresi (Blessing et al., 1990; Bodurtha et al., 1976; Kalialis et al., 2008). Spontánní regrese je Eversonem a Colem definována jako „částečné nebo úplné vymizení maligního nádoru při absenci veškeré léčby nebo v přítomnosti terapie, která je považována za nedostatečnou k tomu, aby měla významný vliv na neoplastické onemocnění“ (Cole & Everson, 1956). Úplné vymizení primárního ložiska (kompletní regrese) je u člověka zdokumentována jen v několika desítkách případů. Spontánní regrese je velice dynamický proces, při kterém dochází k infiltraci nádorového ložiska T lymfocyty (Osella-Abate et al., 2019), destrukci melanomových buněk a nádorová tkáň je poté nahrazena tkání pojivovou s vysokým zastoupením kolagenu a lamininu (Planska et al., 2018; Wenzel et al., 2005). Regrese u kožního melanomu je spojena s autoimunitní depigmentací kůže, vlasů a oční duhovky a s výskytem vitiliga (Maio, 2012; Vincent-Naulleau et al., 2004). K depigmentaci vlasů dochází obvykle lokalizovaným vybělováním od nádorového ložiska, ale není vyloučeno ani náhodné vybělování kdekoliv po těle.

Maligní melanom je označován jako imunogenní nádor. Označení získal z důvodu častějšího výskytu spontánní regrese oproti jiným nádorovým onemocněním, lepší prognózou díky přítomnosti nádor infiltrujících lymfocytů (TILs) a také díky pozitivním efektům imunoterapií (Everson, 1964). Jedním z možných vysvětlení častého pozorování částečné regrese u melanomu je jeho snadná vizualizace, vzhledem k umístění nádoru na povrchu těla (Maio, 2012). Kožní melanom je schopen vyvolat imunitní reakci a aktivovat imunitní systém.

Infiltrované imunitní buňky poté sekretují důležité látky pro destrukci nádorové tkáně, dysregulaci nádorového mikroprostředí a vytváří zánětlivé reakce. Veškeré tyto reakce vyvolávají kaskádu dalších imunitních protinádorových odpovědí a zvyšují pravděpodobnost regrese melanomu (Bourneuf, 2017; Cole & Everson, 1956).

## 2.6 Cytokiny a chemokiny

Cytokiny a chemokiny hrají velmi důležitou roli v regulačních mechanismech nádorového mikroprostředí. Cytokiny jsou malé sekretované proteiny zodpovědné za buněčnou proliferaci, migraci a polarizaci imunitní odpovědi. Jsou produkovány buňkami imunitního systému, ale stejně tak i neimunitními buňkami z okolní tkáně. Většina cytokinů má pleiotropní účinek a zprostředkovává komunikaci mezi buňkami. Jednotlivé cytokiny se vzájemně ovlivňují a často se mohou i zastupovat. Tato kaskáda vzájemné regulace a interakce se označuje jako tzv. cytokinová síť (Borish & Steinke, 2003). Nespornou výhodou cytokinů je, že působí velice rychle a při velmi nízkých koncentracích, díky čemuž může organismus reagovat velmi pohotově. Ale proto je také nezbytné při jejich detekci využívat vysoce senzitivní imunologické techniky, které jsou citlivé i k relativně malým změnám v hladinách cytokinů (Valekova et al., 2015).

Cytokiny jsou dynamické proteiny, které mají mnoho funkcí – aktivační, regulační, prozánětlivé, protizánětlivé, růstové a ovlivňují i diferenciaci a proliferaci buněk. V neposlední řadě se cytokiny také podílejí na protinádorové imunitní odpovědi a mají na svědomí nastavení imunitního systému pacienta, kde dochází k odstranění nádorových buněk nebo jejich toleranci. V důsledku toho může docházet k růstu nádoru, infiltraci nádorového stromatu imunitními buňkami, angiogenezi a tvorbě metastáz.

Imunitní odpověď pacienta na nádorové onemocnění lze predikovat na základě hladin cytokinů přítomných v tělních tekutinách (např. v krevním séru, plazmě). Tyto poznatky lze také využít při určování efektivní cílené terapie proti onemocnění u jednotlivých pacientů. V pilotní studii sérových cytokinů u pacientů s maligním melanomem byla pozorována korelace zvyšující se hladiny IL-6, IL-8 a vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) se vzrůstající závažností nádoru (Kučera et al., 2019). V následujících odstavcích jsou popsány významné cytokiny se vztahem k nádorovým onemocněním, zejména k melanomu.

### 2.6.1 Tumor nekrotizující faktor alfa

Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF $\alpha$ ) někdy také označován jako kachektin patří do nadrodiny TNF/TNFR cytokinů, jejichž společným znakem je tvorba trimerů (Vanamee & Faustman, 2018). Produkce tohoto cytokinu je zprostředkována především aktivovanými makrofágy, mimo ně je TNF $\alpha$  produkován také mnoha dalšími buněčnými typy, jako např. CD4<sup>+</sup> lymfocyty, buňkami přirozených zabíječů (NK), neutrofilů a žírnými buňkami (El-Tahan et al., 2016). TNF $\alpha$  je prozánětlivý cytokin akutní fáze reakce (Idriss & Naismith, 2000).

TNF $\alpha$  u onkologických pacientů způsobuje kachexii. Syndrom je charakterizován chřadnutím, chronickou ztrátou svalové a tukové tkáně, dysregulací metabolismu a ovlivněním celkové kvality života pacienta. Produkce tohoto cytokinu je často spojována se špatnou prognózou vývoje onemocnění (Patel & Patel, 2017). U kožního melanomu byl TNF $\alpha$  společně s dalšími cytokiny (např. IL-6 a IL-8) navržen jako jeden z biomarkerů k diagnostice a prognostice onemocnění (Balkwill, 2006). V terapii se TNF $\alpha$  používá u recidivujícího kožního melanomu končetin pomocí hypertermické perfúze izolované končetiny, kdy je cytokin podáváno lokálně do oběhu odděleného od zbytku těla pacienta (Eggermont et al., 2003; Lejeune, 2002).

### 2.6.2 Interferon $\gamma$

IFN $\gamma$  je pleiotropní imunomodulátor spadající do skupiny IFN typu II. IFN $\gamma$  ovlivňuje současně vrozenou i adaptivní imunitní odpověď. Je produkován primárně aktivovanými T lymfocyty (CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buňkami) a NK buňkami (Kasahara et al., 1983). IFN $\gamma$  je synergní s dalšími cytokiny, konkrétně s IL-12 a IL-18 (Ikeda et al., 2002). Nejvýznamnější role IFN $\gamma$  je při regulaci hlavního histokompatibilního komplexu I (MHC I) na povrchu buněk a zajištění jejich vyšší exprese, která napomáhá aktivaci a prezentaci antigenů u antigen prezentujících buněk (APCs) (Seliger et al., 2008).

IFN $\gamma$  má nespočet protinádorových efektů zahrnující již zmíněnou regulaci prezentace antigenů, mimo to podporuje zánětlivé a chemotaktické signály, aktivaci leukocytů a má protiangiogení efekt (Burke & Young, 2019). Může přímo aktivovat kaspázy v nádorových buňkách, což má za následek apoptózu těchto buněk (Chin et al., 1997). IFN $\gamma$  vykazuje více mechanismů, jak vyvolat u buněk apoptózu a celkově aktivovat imunitní odpověď. Přítomnost IFN $\gamma$  u pacientů s melanomem je asociováno s lepší prognózou a delším přežitím pacientů (Kwon, 2018). Byly provedeny studie, které naznačují, že pokud jsou zasaženy regionální lymfatické uzliny metastázami, dochází ke snížení exprese IFN $\gamma$  a nedochází k protinádorové imunitní odpovědi a probíhá regrese nádoru (Vuletić et al., 2015). Tyto studie ukazují význam

IFN $\gamma$  jako mediátoru u adaptivní imunitní odpovědi v protinádorové odpovědi. V léčbě nádorového onemocnění se uvažuje o využití IFN $\gamma$  v kombinaci s dalšími léčivy, které indukují expresi kaspázy-8, a činí tak buňky senzitivnější k apoptóze. Tento protinádorový efekt může pomoci k regresi nádoru (Fulda & Debatin, 2002).

### 2.6.3 Interleukin 1

IL-1 je znám pro své pleiotropní účinky během zánětu, má vysoce komplexní a někdy i kontrastní úlohu v různých stádiích vývoje nádorového onemocnění. Přenos signálu IL-1 je velmi dobře řízen a regulován pomocí dvou hlavních agonistických ligandů, IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , a jednoho přirozeného antagonistického ligandu IL-1 receptor antagonist (IL-1RA). Hlavním receptorem, který zprostředkovává IL-1 signalizaci je IL-1R1, exprimovaný na mnoha buněčných typech (Zhang et al., 2020). IL-1RA reguluje prozánětlivou aktivitu IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  tím, že nasedne na vazebné místo na IL-1R receptoru. Obecně se má za to, že zánět zprostředkovaný IL-1 cytokinem přispívá k rozvoji a progresi nádoru. U kožního melanomu dochází k expresi receptoru IL-1R1 především v endotelových buňkách a fibroblastech asociovaných s nádorem, zatímco IL-1 $\beta$  je sekretován převážně makrofágy asociovanými s nádorem. Tato signální kaskáda vede k podpoře růstu melanomu, vzniku metastáz a angiogenezi (Voronov et al., 2003). IL-1 $\alpha$  je ve vyšších hladinách sekretován v primárním a metastazujícím kožním melanomu (Young et al., 2017). Z důvodu významného vlivu IL-1 na vývoj nádoru, se inhibice této signální dráhy může stát významným terapeutickým nástrojem v léčbě melanomu k potlačení jeho dalšího rozvoje.

Na druhou stranu existují i studie, které dokazují, že IL-1 může potlačovat proliferaci melanomových buněk *in vitro* (Arakawa et al., 2008; C. Wang et al., 2005). Protichůdné výsledky pouze poukazují na heterogenitu a klonální evoluci melanomu.

### 2.6.4 Interleukin 2

IL-2 je obecně považován za prozánětlivou regulační molekulu, někdy označovanou také jako růstový a proliferační faktor CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk. IL-2 má schopnost aktivovat T pomocné (Th) buňky k masivní proliferaci a diferenciaci, dále aktivuje cytotoxické T (Tc) lymfocyty, makrofágy a NK buňky (Paliard et al., 1988). CD4<sup>+</sup> T buňky jsou zároveň největšími producenty IL-2, dochází zde ke zpětné pozitivní regulaci vlastní exprese. IL-2 patří do skupiny  $\gamma_c$  cytokinů, kteří signalizují přes stejnou receptorovou podjednotku CD132 (Spolski et al., 2017).

IL-2 byl pro svou schopnost podporovat aktivaci a proliferaci T buněk velmi brzo použit v klinických testech při léčbě rakoviny ke stimulaci protinádorové imunitní odpovědi u pacientů s melanomem a dalšími nádorovými onemocněními (Rosenberg, 2014; Rosenberg et al., 1985). V imunoterapii byly podávány vysoké dávky IL-2, které indukovaly regresi nádoru. Nicméně monoterapie pomocí IL-2 aktivuje a udržuje jak T efektorovou, tak T regulační (Treg) buněčnou populaci (Arenas-Ramirez et al., 2015; Skrombolas & Frelinger, 2014). Tato dvojsečnost vede k vysoce toxicitě imunoterapie a způsobuje mnoho vedlejších nežádoucích účinků, jako je syndrom vaskulárního úniku a mnoho dalších projevů spojených s cytokinovou bouří (A. K. Abbas et al., 2018). Aby byli limitovány tyto nežádoucí vedlejší účinky, byly použity nižší dávky IL-2 v kombinaci s dalšími léky. Kombinace s IFN $\alpha$  snížila toxicitu IL-2 a zároveň zvýšila přežití pacientů (Negrier et al., 1998). Kombinace IL-2 společně s anti-CTLA protilátkou byla použita k posílení T efektorové buněčné imunitní odpovědi. Ovšem tato léčba nevedla k výraznému zvýšení úspěšnosti léčby u pacientů s kožním melanomem (Jiang et al., 2016; Maker et al., 2005). Výsledky použití kombinace IL-2 s anti-PD-1 nebo anti-PD1L protilátkami vyžadují ještě další zkoumání.

#### 2.6.5 Interleukin 4

IL-4 je pleiotropní glykoprotein sekretovaný převážně aktivovanými CD4<sup>+</sup> T lymfocyty reprezentující Th2 buněčnou odpověď, dále bazofily a žírnými buňkami (Nelms et al., 1999). IL-4 hraje kritickou roli v regulaci diferenciaci naivních T buněk po stimulaci antigenem do různých funkčních typů (Ho & Miaw, 2016). Diferenciaci je směřována ke vzniku dalších buněk sekretujících IL-4, tímto mechanismem vzniká zpětnovazebná smyčka (Seder et al., n.d.). Některé publikace udávají jako potenciálně významnou souvislost mezi vývojem alergie, u které hraje roli cytokin IL-4 (Gandhi et al., 2016), a nízkého rizika vzniku nádoru nebo potlačení dalšího rozvoje nádorového onemocnění (Turner et al., 2006; H. Wang & Diepgen, 2006). Alergická reakce způsobuje hyperreaktivní stav imunitního systému, který způsobuje vyšší množství NK buněk a aktivace převodníku signálu a aktivátoru transkripce 6 (STAT6) v nádorové tkáni, což má v důsledku vliv na vývoj onemocnění (Son et al., 2017).

#### 2.6.6 Interleukin 6

IL-6 má jak prozánětlivý, tak protizánětlivý účinek. Je to především prostředník u akutní fáze imunitní odpovědi a horečky, např. během infekce nebo traumatického poškození (např. u popálenin, chirurgického zákroku). IL-6 je produkován imunitními buňkami, dále fibroblasty a

endoteliálními buňkami. Ale mimo jiné je produkován i adipocyty v tukové tkáni, kde může podporovat chronický zánět a rezistenci na inzulin (Bahceci et al., 2007; Xu et al., 2017).

V nádorovém mikroprostředí hraje IL-6 důležitou roli a může být produkován jak nádorovými buňkami, tak nenádorovými buňkami – často fibroblasty a makrofágy (Jobe et al., 2016; Kolář et al., 2012). IL-6 může sloužit jako diagnostický marker. U některých typů rakovin mohou aktuální hladiny v séru korelovat se stádiem onemocnění, přítomností metastáz a prognózou (Lippitz & Harris, 2016). Bylo popsáno, že společně s IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$ , IL-6 iniciuje vznik kachexie spojené s rakovinou (Narsale & Carson, 2014). Vyšší koncentrace tohoto mediátoru v plasmě u pacientů v pokročilém stádiu zhoubného onemocnění souvisí nejenom s úbytkem na váze, ale také s anémií, anorexií a depresemi (Y. Guo et al., 2012).

Nedávno byl navržen nový směr terapie s využitím IL-6 blokace. Tato terapie má za cíl zabránit buněčné migraci do dalších tkání a předcházet tak vzniku nových metastáz, které bývají často příčinou úmrtí pacienta. Terapie je v experimentální studii, kde vykazuje velmi silný efekt na buňky, které ztrácí schopnost migrovat a zakládat tak nová nádorová ložiska. Léčivo je klasifikována jako tzv. migrastatika a jsou označovaná vedle cytostatik za novou kategorii v protinádorové léčbě (Gandalovičová et al., 2017; Lacina et al., 2019).

#### 2.6.7 Interleukin 8

IL-8 je chemoatraktant produkován mnoha buněčnými typy, často je sekretován makrofágy, epiteliálními a endoteliálními buňkami. IL-8 bývá označován také jako CXCL8. Je to prozánětlivý chemokin, který stimuluje CXCR1 a CXCR2 receptor (Ha et al., 2017). IL-8 přitahuje a aktivuje neutrofile a další granulocyty v oblastech zánětu (Peveri et al., 1988). Charakteristickou odpovědí neutrofilů na přítomnost IL-8 je migrace buněk.

IL-8 je v nádorovém mikroprostředí často vysoce exprimován různými nádorovými buňkami a makrofágy asociovanými s nádorem. Sekrece chemokinu je podpořena stresovými situacemi, kterým jsou buňky vystaveny, např. přítomností chemoterapeutických léčiv či hypoxie (Waugh & Wilson, 2008), v důsledku čehož dochází k autokrinní nebo parakrinní stimulaci nádorových buněk k proliferaci a migraci (Wu et al., 2012). Ukazuje se, že IL-8 hraje významnou roli v regulaci vývoje nádoru, ovlivňuje růst primárního nádoru, rozvoj angiogeneze, invazivitu a založení nových metastáz, podílí se na progresi tumoru (Gabellini et al., 2018; S Singh et al., 2009; Seema Singh et al., 2010). Exprese IL-8 koreluje se stupněm nádorového onemocnění u

maligního melanomu (Varney et al., 2006) a tento chemokin může být považován za sérový biomarker (Sanmamed et al., 2014).

#### 2.6.8 Interleukin 10

IL-10 reguluje zánětlivou odpověď – protizánětlivý cytokin. Hlavními producenty tohoto homodimeru jsou  $CD4^+$  T lymfocyty, Treg lymfocyty, monocyty, makrofágy, APCs a B buňky (Hedrich & Bream, 2010). Primárním úkolem IL-10 je inhibice buněčné imunitní odpovědi a podpora navození tolerantního stavu. IL-10 indukuje antigen-specifickou anergii u  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T lymfocytů (Steinbrink et al., 2002). Role IL-10 v nádorovém onemocnění je zatím nejasná. Na jedné straně má schopnost potlačit imunitní systém a umožnit tak růst nádoru, na straně druhé může potlačit angiogenezi a vznik metastáz a tím prodlužuje přežití pacienta. Ukazuje se, že záleží na nastavení mikroprostředí a produkci dalších cytokinů, které IL-10 ovlivňují, a na fázi, ve které je IL-10 sekretován (Mannino et al., 2015).

#### 2.6.9 Interleukin 12

IL-12 patří do rodiny IL-12 cytokinů, která je unikátní tím, že se skládá pouze z molekul, které tvoří heterodimery (dalšími členy rodiny jsou IL-23, IL-27 a IL-35) (Hunter, 2005). IL-12 je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek – alfa (p35) a beta (p40) (Jones & Vignali, 2011). IL-12 je řazen mezi prozánětlivé molekuly, které stimulují Th1 imunitní odpověď. Jeho produkce je zajištěna především dendritickými buňkami (DCs), makrofágy a B buňkami. Existuje pozitivní zpětnovazebná smyčce mezi IL-12 a  $IFN\gamma$ . IL-12 indukuje sekreci  $IFN\gamma$  u T lymfocytů, které následně stimulují APCs a tím i podporují produkci IL-12. Mimo to IL-12 ovlivňuje sekreci  $IFN\gamma$  i u NK buněk (Vignali & Kuchroo, 2012).

#### 2.6.10 Interleukin 18

IL-18 patří do nadrodiny IL-1 cytokinů. Produkován je primárně monocyty, makrofágy a keratinocyty. Tento mediátor je znám jako faktor indukující produkci  $IFN\gamma$  Th lymfocyty a NK buňkami (Yasuda et al., 2019). IL-18 je prozánětlivý cytokin, který společně s IL-12 zprostředkovává buněčnou imunitu. Tato synergní interakce může aktivovat Tc lymfocyty a NK buňky, které mají protinádorový účinek (Esmailbeig & Ghaderi, 2017). IL-18 je dalším kandidátem pro terapeutické využití k podpoře regrese melanomu. Suprese nádoru a inhibice jeho invazivity byla popsána v několika studiích v kombinaci s dalšími léčebnými látkami (Nishio et al., 2008; Terme et al., 2011). Novější studie naznačují, že IL-18 může mít prospěšnou roli v potlačení nádoru především díky schopnosti aktivovat lidské  $\gamma\delta$  T buňky (Z.



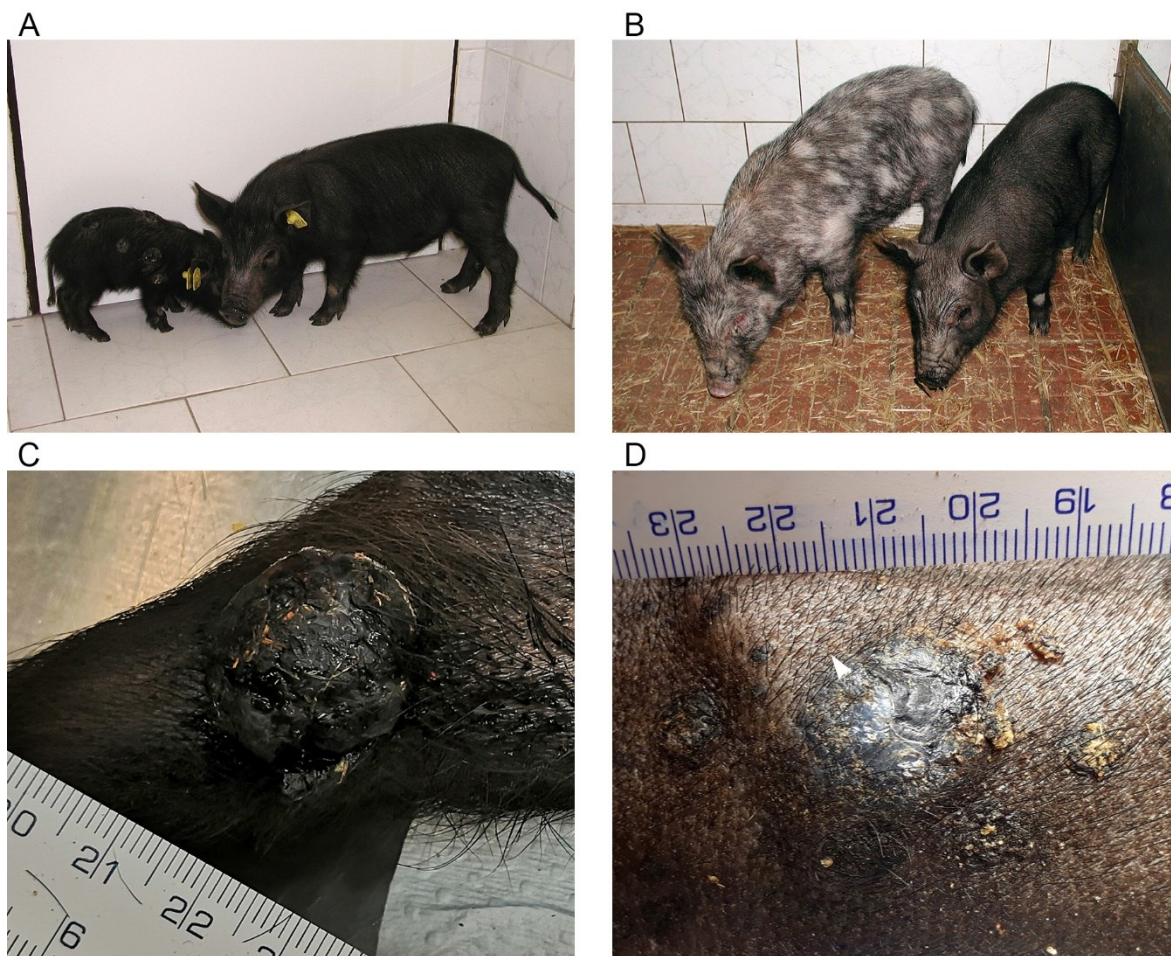
Ma et al., 2016; Sugie et al., 2013), které jsou známé pro svou protinádorovou aktivitu (Fisher & Anderson, 2018).

#### 2.6.11 GM-CSF

Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) je glykoprotein sekretovaný makrofágy, T lymfocyty, NK buňkami, fibroblasty a dalšími buňkami. U zánětlivé reakce ve tkáni slouží GM-CSF jako mediátor mezi T lymfocyty a myelodními buňkami a působí jako prozánětlivý faktor (Becher et al., 2016; Hamilton & Anderson, 2004). U kožního melanomu byla snaha vakcinovat ozářenými melanomovými buňkami sekretující GM-CSF, aby byla podpořena odpověď hostitele, ale tato metoda se ukázala jako málo účinná a v klinické praxi se proto nepoužívá (Dranoff, 2003; Lawson et al., 2015).

### **2.7 Melanoma-bearing Libechov Minipigs**

MeLiM je linie prasat, u které dochází ke spontánnímu vzniku kožního melanomu (obr. č. 6). Tento unikátní zvířecí model byl vyšlechtěn na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově. MeLiM model vznikl křížením několika plemen prasat a následnou selekcí melanomem postižených jedinců v chovu po několik generací. Od roku 1967 byla křížena převážně bílá prasata s černými skvrnami (Göttingen prasata, import z Německa), černá Hormel prasata (import z USA) a Vietnamská miniprasata (import z německé zoologické zahrady). MeLiM prasata jsou díky tomuto křížení menšího vzrůstu, aby byl usnadněn chov v laboratorních podmínkách. V dospělosti jedinci dosahují hmotnosti 35 kg až 45 kg. V chovném stádu se vyskytuje několik barevných variant – bílá prasata, bílá s černými skvrnami, bílá s rezavo-červenými skvrnami, až po celočerná nebo celorezavá prasata (Horák et al., 1999a). V posledních letech převažují celočerná prasata (Horák et al., 1999b). V minulém roce bylo publikováno obsáhlé review, které podrobně charakterizuje MeLiM model (Horak et al., 2019).



**Obr. č. 6: MeLiM model** *A)* dva MeLiM sourozenci ve věku 10 týdnů, u jednoho selete došlo k progresi kožního melanomu, těžké kachexii a ubýtku na váze (vlevo), naopak u druhého selete můžeme pozorovat spontánní regresí a zachování standardní váhy (vpravo); *B)* částečné vybělování a kožní depigmentace oproti zachování černého zbarvení u MeLiM sourozenců při spontánní regresí (stáří 5,5 měsíce); *C)* nodulární kožní melanom na zadní končetině selete ve věku 10 týdnů; *D)* zplošťování nádorového ložiska ve 12. týdnu u MeLiM selete se spontánní regresí (Horak et al., 2019).

Kožní melanom se u MeLiM prasat vyskytuje dědičně a objevuje se pouze u tmavě pigmentovaných prasat (bílá prasata nemají v kůži melanocyty). Výskyt onemocnění není vázán na pohlaví. První nádorová ložiska mohou být pozorována ihned po narození a nárůst jejich počtu je zaznamenán až do dvou měsíců stáří selat. Kožní melanomy jsou mnohočetné, nodulární, s lokalizací po celém těle jedinců. U MeLiM prasat dochází ke vzniku metastáz, kterými jsou nejčastěji zasaženy lymfatické uzliny, plíce, slezina a játra. Pokud je onemocnění rozsáhlejší mohou být postižena i střeva, ledviny, žaludek a mozek (obr. č. 7) (Borovansky et al., 2003; Fortýn et al., 1994a).

Přesná genetická příčina vzniku melanomu u MeLiM linie nebyla dosud objasněna. Z dosavadních studií se předpokládá polygenní dědičnost s vlivem minimálně 3 genů. S výskytem melanomu u MeLiM modelu segreguje mutace Leu102Pro v genu MC1R kódujícím receptor pro melanocyty-stimulující hormon a také lokus v blízkosti KIT genu, který kóduje receptorovou tyrozinkinázu, jejíž mutace byly pozorovány u lidských dědičných melanomů. Na druhou stranu s MeLiM melanomem neselegrují lokusy nesoucí geny CDKN2A, CDK4, B-Raf proteinu (BRAF), MITF, které jsou často mutovány u lidského familiárního melanomu (Bourneuf, 2017; Bourneuf et al., 2018).



**Obr.č. 7: Metastázy u MeLiM selat ve 12. týdnu života. A) játra s metastázami (modré šipky), B) plíce s mnohočetnými metastázami, C) střevo s metastázou (modrá šipka), D) slezina s mnohočetnými metastázami.**

Přibližně u tří čtvrtin jedinců MeLiM modelu se objevuje spontánní regrese nádorů. Bez jakéhokoliv zásahu dochází ke zplošťování původně nodulárních lézí a vybělování štetin v jejich těsném okolí. U MeLiM selat jsou první známky spontánní regrese pozorovány mezi druhým a třetím měsícem života selat. Většina ložisek podlehne regresi v průběhu prvního roku života zvířat, což je doprovázeno i celkovým blednutím barvy kůže (Vincent-Naulleau et al.,

2004). V histologickém obraze dochází v nádorových ložiscích ke změně distribuce a rozpadu melanocytů, přítomnosti lymfocytů a tvorbě vaziva (Blenman et al., 2019; Ribero et al., 2016). U jedné čtvrtiny selat dochází k progresi onemocnění, růstu nádorových ložisek, které mohou vést ke kachexii a úhynu zvířete (Cizkova et al., 2019).

Vývoj onemocnění u MeLiM modelu je doprovázen dalšími jevy. Hematologický profil se používá v klinické praxi a některé hematologické parametry jako je počet leukocytů a neutrofilů a jejich poměry (poměr leukocytů k neutrofilům nebo poměr krevních destiček k leukocytům) mohou určovat prognózu a další postup v léčbě nádorového onemocnění (Cananzi et al., 2014; So et al., 2014). Nedávné výsledky studií naší laboratoře ukazují, že všechna MeLiM prasata mají mikrocytární hypochromní anémii a deficienci železa (Čížková et al., 2019). U jedinců s progresí nádoru je pozorováno snížení počtu červených krvinek, hematokritu a koncentraci hemoglobinu oproti selatům se regredujícím průběhem. Opačně je tomu u počtu krevních destiček, kde je pozorován vyšší počet trombocytů u progredujícího fenotypu než u regredujícího (Čížková et al., 2019). Tato pozorování jsou shodná s výsledky studií u pacientů s melanomem.

TILs jsou obecně považovány za buňky odpovědné za protinádorovou imunitní reakci. Na druhé straně ale existují i buňky asociované s nádorem (např. makrofágy, neutrofilly), které podporují progresi onemocnění a zhoršují prognostické vyhlídky (Antohe et al., 2019). Pokud je melanom infiltrován lymfocyty, bývá prognóza lepší a dochází k delšímu přežití pacientů. Při infiltraci nádoru hrají důležitou roli  $CD8^+$  Tc lymfocyty a  $CD4^+$  Th lymfocyty (Rohaas et al., 2018). V krvi a v melanomové tkáni MeLiM prasat byly nalezeny dvojité pozitivní (DP), tj.  $CD4^+ CD8^+$  T lymfocyty, jejich počet narůstá během regrese. Tyto lymfocyty nesou monospecifický T-buněčný receptor (Cizkova et al., 2019).

Mikrobiom, tedy soubor mikroorganismů osídlujících určitou část těla, má vliv nejen na imunitní systém jedince, ale může ovlivňovat i nádorovou imunitní odpověď (Roy & Trinchieri, 2017). Studie kožního mikrobiomu MeLiM selat zaznamenala větší mikrobiální diverzitu na povrchu melanomu než na povrchu sousední zdravé kůže (Mrázek et al., 2019). Na povrchu melanomu se nacházeli např. *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus* a *Enterococcus faecalis* (Švejstl et al., 2018).

Na závěr charakteristiky MeLiM modelu bych ráda vyzdvihla velkou výhodu v podobnosti prasečí a lidské kůže (Vodicka et al., 2008), na rozdíl od např. myších modelů. Melanocyty se u prasat vyskytují v epidermis stejně jako u člověka. Imunohistochemické analýzy ukazují

shodu mezi nádorem vznikajícím u MeLiM modelu a lidským kožním melanomem (Vincent-Naulleau et al., 2004). Studium imunologické a molekulární podstaty spontánní regrese na MeLiM modelu má potenciál přinést nové poznatky s významem přesahujícím do humánní medicíny.

### 3 Cíle práce

Cílem práce je sledovat expresi cytokinů v průběhu regrese melanomu u prasečího MeLiM modelu a identifikovat potenciální prognosticky či terapeuticky zajímavé faktory.

Dílčí cíle zahrnují:

- zmapovat hladiny cytokinů v krevní plazmě a jejich případné změny v průběhu regrese u MeLiM selat
- sledovat expresi cytokinů na úrovni proteinů v průběhu regrese v nádorové tkáni
- zmapovat expresi cytokinů na úrovni mRNA v nádorové tkáni regredujících melanomů MeLiM modelu
- zhodnocení výsledků korelace mezi expresí cytokinů na úrovni kódující mRNA a proteinů

## 4 Materiál

### 4.1 Materiál

Zkumavky 0,5 ml a 1,5 ml: Eppendorf

Zkumavky Safe-Lock 0,5 ml a 1,5 ml: Eppendorf

Zkumavky 0,5 ml, 1,5 ml a 2 ml: Axygen

Odběrové zkumavky BD Vacutainer K3EDTA 4 ml: Becton, Dickinson and Company  
(kat.č. 368860)

PCR zkumavky 0,2 ml: Axygen

96-jamkové destičky: Bio-Rad (kat.č. HSP9641)

Krycí fólie (Heat Seal): Bio-Rad (kat.č. 1814030)

Podložní sklíčka: knittel glass 76x26 mm

Krycí sklíčka

### 4.2 Chemikálie a roztoky

TRI Reagent®: Sigma Life Science (kat.č. T9424)

Chloroform

Isopropanol

75 % Ethanol

99 % Ethanol

PBS

Isoflurin 1000 mg/g – tekutina k inhalaci parou, inhalační anestezie (reg.č. 96/054/16-C)

Tissue Freezing medium®: Jung (kat.č. 020108926)

Hematoxylin

Eosin

Glycerinová želatina

1,5 % agarózový gel

TAE pufr

StainIN™ RED Nucleic Acid Stain: highQu (kat.č. NAS0101)

GeneRuler™ 50bp DNA Ladder: Sigma Aldrich (kat.č. S7025-50UG)

3 M octan sodný

### 4.3 Molekulárně biologické soupravy a chemikálie pro qRT-PCR

- QuantiTect Reverse Transcription Kit (200): Qiagen (kat.č. 205313; Lot 163024664)
- 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix 20 ml: Solis Biodyne (kat.č. 08-24-00020; Lot 5xSMEG0010)
- QIAquick® PCR Purification Kit (50): Qiagen (kat.č. 28104; Lot 163026032)
- QIAquick® PCR Extraction Kit (50): Qiagen (kat.č. 28704; Lot 163021174)

### 4.4 Primery použité v metodě qRT-PCR

Veškeré použité oligonukleotidy byly dodány firmou Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové (<https://www.generi-biotech.com/>).

*Tab. I: Přehled primerů použitých v experimentu*

Cytokin/Chemokin	Označení primeru	Sekvence
TNF $\alpha$	1312C6	5' - ACTGCACTTCGAGGTTATCGG - 3'
	1312C7	5' - GGCGACGGGCTTATCTGA - 3'
Interleukin 1 $\beta$	1174T8	5' - GAGCATCCAGCTGCAAATCTC - 3'
	1174T9	5' - CATTGCACGTTTCAAGGATGAT - 3'
Interleukin 2	1312B8	5' - ATCTCTCCAGGATGCTCACATTTAA - 3'
	1312B9	5' - TCCAGAGCTTTGAGTTCTTCTACTAA - 3'
Interleukin 6	1312C2	5' - CTGGCAGAAAACAACCTGAACC - 3'
	1312C3	5' - TGATTCTCATCAAGCAGGTCTCC - 3'
Interleukin 8	1081E4	5' - TCACAAGTCTTCTTGCCTCAACT - 3'
	1081E5	5' - AAGGTAGGATGGGGGCTGAA - 3'
CUSB*	1356B9	5' - AATTATCCAGAGCGAGTA - 3'
	1356C0	5' - TCTCCAACCATATTTCT - 3'



GAPDH*	1356B5	5' - TCTGGCAAAGTGGACATT - 3'
	1356B6	5' - GGTGGAATCATACTGGAACA - 3'
HPRT 1*	1081G2	5' - TTCCTTGGTCAAGCAGCATAATCC - 3'
	1081G3	5' - AAGGGCATAGCCTACCACAAAC - 3'

\*housekeepingové geny

#### 4.5 Molekulárně biologické soupravy a chemikálie pro imuno-testování založené na Luminex xMAP

- Luminex® 100/200 Performance Verification Kit: Invitrogen (kat.č. LX2RPVERK25; Lot B73404)
- Luminex® 100/200 Calibration Kit: Invitrogen (kat.č. LX2RCALK25; Lot B73846)
- Luminex Sheath Fluid
- MILLIPLEX MAP Porcine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – Immunology Multiplex Assay: Merck Millipore (kat.č. PCYTMG-23K; Lot 3250018)

#### 4.6 Molekulárně biologické soupravy a chemikálie pro BCA testování

- Pierce™ BCA Protein Assay Kit: Thermo Scientific™ (kat.č. 23225, Lot SD247573)
- Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set, Thermo Scientific™ (kat.č. 23208; Lot TF267855)

#### 4.7 Přístroje a programy

- ADVIA® 120/2120/2120i Hematology Systems – hematologický analyzátor
- Leica CM1850 – kryostat
- Centrifuga Hettich Universal 32R
- Allegra™ X-22R Centrifuge: Beckman Coulter.
- CPA225D semimicro balance: Sartorius – analytické laboratorní váhy
- Thermal Cycler C1000 Touch: Bio-Rad
- PX1™ PCR Plate Sealer: Bio-Rad (kat.č. 181-4000)

- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad; Software: CFX Manager 3.1
- NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 – spektrofotometr; Software: ND-1000 V3.7.1
- Electrophoresis Power Supply EV231, Consort – zdroj elektrického napětí
- Kodak Gel Logic 200 Imaging System
- ThermoShaker PST-60 HL plus, Biosan – vyhřívaná třepačka
- Mikrocentrifuga MiniSpin, Eppendorf
- Vortex Genie 2, Scientific Industries
- Olympus VS-120FL – světelný mikroskop, Software: Olympus VS-ASW
- Luminex200™, Software: xPonent 3.1.871.0 (Luminex Corp)
- Magnetický separátor pro 96-jamkovou destičku
- Ultrazvukový čistič, 240 W: Shesto
- Multidetekční reader Synergy HTX: BioTek – detekce absorbance (kat.č. S1LFTA); Software: Gen5 2.09
- R program: DrLumi balíček
- Primer-BLAST: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>
- BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Ensembl: <https://www.ensembl.org/index.html>
- GraphPad Prism 8.4.2 (679)

#### 4.8 Zvířata

MeLiM prasata byla chována ve standardních podmínkách den/noc (22 °C) a byla krmena krmnou směsí odpovídající stáří zvířat. Vzorky byly odebírány od tří vrhů, které se narodily v rozmezí od září 2018 do června 2019. Do studie jsme zahrnuli celkem 15 selat, u kterých jsme prováděli od 6. do 12. týdne odběr vzorků ve dvoutýdenních intervalech. Ve 12. týdnu byla provedena pitva všech selat, která se tohoto odběru dožila, a byl zhodnocen rozsah zasažení jednotlivých orgánů metastázami.

Chov zvířat a práce se zvířaty byly prováděny na základě patřičných oprávnění (Oprávnění k chovu pokusných zvířat a dodávce pokusných zvířat č. 9322/2015-MZE-17214, Oprávnění k používání pokusných zvířat č. 71922/2016-MZE-17214, Projekty pokusů č. 82-17 a č. 96-15).

## 5 Metody

### 5.1 Odběr vzorků

Odběry byly prováděny v 6., 8., 10. a 12. týdnu života selat. Při každém odběru byla selata v celkové anestezii za použití inhalace par Isofluranu společně s oxidem dusným. Následně proběhlo vážení každého jedince a celkové zhodnocení fyzického stavu. Zdokumentovali jsme rozmístění a velikost nádorů. Odebrali jsme 2-4 ml žilní krve (dle velikosti selat) z *vena cava cranialis* do odběrové zkumavky obsahující protisrážlivou látku EDTA a asi dvacetkrát promíchali opatrným převrácením. Z plné nesrážlivé krve bylo použito 500 µl na analýzu krevního obrazu a diferenciálního počtu leukocytů, zbytek krve se použil k přípravě krevní plazmy. Parametry sledované v hematologickém profilu: hematokrit (HCT), počet erytrocytů (RBC), počet leukocytů (WBC), hemoglobin (HGB), počet trombocytů (PLT), počet neutrofilů (neut), procentuální zasoupení neutrofilů (net\_p), počet lymfocytů (lymph), procentuální zastoupení lymfocytů (lymph\_p), počet monocytů (mono), procentuální zastoupení monocytů (mono\_p), počet eosinofilů (eos), procentuální zasoupení eosinofilů (eos\_p), počet basofilů (baso), procentuální zasoupení basofilů (baso\_p). Kde procentuální zastoupení vyjadřuje procento dané subpopulace z celkového počtu leukocytů.

V každém časovém intervalu byl odebrán jeden melanom a část zdravé kůže (5 cm od ložiska melanomu), oba vzorky byly bezprostředně po odběru zpracovány. Melanom byl na ledu zbaven nekrotických částí a podkoží. Část nádorové tkáně a zdravé kůže byla zamražena v tekutém dusíku a uchována při -80 °C v Trizolu na analýzu mRNA. Další část nádorové tkáně byla zamražena v tekutém dusíku pro zpracování na histologii a detekci cytokinů pomocí Luminex xMAP analýzy.

### 5.2 Příprava krevní plazmy

Plná krev v odběrové zkumavce EDTA/K3 byla bezprostředně po odběru centrifugována (1500 g, 10 min, 4 °C). Poté byla odebrána vrchní vrstva – cca 1-2 ml plazmy a tato vrstva se přenesla do čisté falkony a znovu centrifugovala (1500 g, 10 min, 4 °C). Dále byla odebrána opět horní vrstva – cca 1,5 ml plazmy a tento objem byl dále rozaliquotován. Celý proces přípravy krevní plazmy byl proveden do 60 min od odběru a následně byly alikvoty zamraženy a uchovány při -80 °C pro další analýzy.

### **5.3 Příprava nádorové tkáně na měření cytokinů pomocí Luminexu**

Nádorová tkáň byla uchována při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  na korkových bločcích zalitých v zamrazovacím médiu a následně nařezána pomocí Leica CM1850 kryostatu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nejprve bylo odstraněno přebytečné médium, tak aby zůstala odkrytá pouze nádorová tkáň. První dva vhodné řezy o síle  $8\text{ }\mu\text{m}$  byly umístěny na podložní sklíčko. Tyto řezy byly dále obarveny pomocí hematoxylin-eosinového barvení a histologicky vyhodnoceny. Dále bylo provedeno čtyřicet řezů o síle  $40\text{ }\mu\text{m}$  a tyto řezy byly přeneseny do předem zvážené 1,5 ml zkumavky. Poslední dva řezy o síle  $8\text{ }\mu\text{m}$  byly přeneseny na podložní sklíčko k zhotovení histologických preparátů.

Zkumavky s nařezanou nádorovou tkání byly opět zváženy a odečteno množství tkáně. Poté bylo přidáno  $500\text{ }\mu\text{l}$  ledového PBS na  $100\text{ mg}$  tkáně. Vše bylo zvortexováno a následně centrifugováno k odstranění debris ( $16000\text{ g}$ ,  $10\text{ min}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Do nové zkumavky bylo odebráno cca  $400\text{ }\mu\text{l}$  supernatantu, ve kterém byla stanovena koncentrace cytokinů. Alikvot supernatantu byl též použit pro stanovení koncentrace proteinů testem kyseliny bicinchoninové (BCA metoda).

### **5.4 Stanovení koncentrace cytokinů v plazmě a supernatantu z nádorové tkáně pomocí Luminex analýzy**

Pro stanovení koncentrace cytokinů v plazmě a nádorové tkáni jsme použili v naší laboratoři zavedenou metodu Luminex xMAP multiplexní analýzu (Kupcova Skalnikova et al., 2020). Přístroj Luminex® 200™ byl nakalibrován podle návodu výrobce pomocí kalibrační a verifikační sady reagensů. Pro samotnou analýzu jsme použili komerčně dostupný kit určený k detekci prasečích cytokinů a chemokinů - MILLIPLEX MAP Porcine 13-plex Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – Immunology Multiplex Assay (Merck). Vzorky jsme napipetovali do 96-jamkové destičky podle instrukcí v návodu. Standard cytokinů je součástí kitu, my jsme tento standard naředili oproti návodu vícekrát, abychom získali lepší pokrytí kalibrační křivky, a tím i přesnější kvantifikace. Přehled analyzovaných cytokinů a koncentrace standardů kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce II. Vzorky byly oproti standardům ředěny 1:1. Background (blank), standardy a vzorky byly vždy pipetovány v duplikátech. Destička kvantitativně analyzována Luminex 200 přístrojem za pomoci software xPonent. Získaná data byla jako csv soubory exportována do R prostředí, kde byla pomocí drLumi balíčku odečtena naměřené koncentrace. Další analýzy byly provedeny pomocí vestavěných funkcí Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation). Statistické analýzy a grafické znázornění výsledků jsme provedli v programu GraphPad Prism (version 8.4.2.).

**Tab. II:** Ředění standardů kalibrační křivky. Sloupec D značí ředění standardů kalibrační křivky doporučené výrobcem, sloupec U udává námi upravená ředění standardů.

počet STD u super. z nádorové tkáně	počet STD u plazmy	IL-1 $\alpha$ (pg/ml)		IL-1 $\alpha$ (pg/ml)		IL-8 (pg/ml)		IL-8 (pg/ml)	
		D	ředění	U	ředění	D	ředění	U	ředění
STD 1		20000.00		20000.00		50000.00		50000.00	
STD 2	STD 1	5000.00	4x	6666.67	3x	12500.00	4x	16666.67	3x
STD 3	STD 2	1250.00	4x	2222.22	3x	3125.00	4x	5555.56	3x
STD 4	STD 3	312.50	4x	740.74	3x	781.25	4x	1851.85	3x
STD 5	STD 4	78.13	4x	246.91	3x	195.31	4x	617.28	3x
STD 6	STD 5	19.53	4x	82.30	3x	48.83	4x	205.76	3x
STD 7	STD 6	4.88	4x	27.43	3x	12.21	4x	68.59	3x
STD 8	STD 7			13.72	2x			34.29	2x
STD 9	STD 8			6.86	2x			17.15	2x
STD 10	STD 9			3.43	2x			8.57	2x
STD 11	STD 10			1.71	2x			4.29	2x
STD 12	STD 11			0.86	2x			2.14	2x
počet STD u super. z nádorové tkáně	počet STD u plazmy	GM-CSF, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF $\alpha$ (pg/ml)		GM-CSF, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF $\alpha$ (pg/ml)		IL-4 (pg/ml)		IL-4 (pg/ml)	
		D	ředění	U	ředění	D	ředění	U	ředění
STD 1		100000.00		100000.00		250000.00		500000.00	
STD 2	STD 1	25000.00	4x	33333.33	3x	62500.00	4x	83333.33	3x
STD 3	STD 2	6250.00	4x	11111.11	3x	15625.00	4x	27777.78	3x
STD 4	STD 3	1562.50	4x	3703.70	3x	3906.25	4x	9259.26	3x
STD 5	STD 4	390.63	4x	1234.57	3x	976.56	4x	3086.42	3x
STD 6	STD 5	97.66	4x	411.52	3x	244.14	4x	1028.81	3x
STD 7	STD 6	24.41	4x	137.17	3x	61.04	4x	342.94	3x
STD 8	STD 7			68.59	2x			171.47	2x
STD 9	STD 8			34.29	2x			85.73	2x
STD 10	STD 9			17.15	2x			42.87	2x
STD 11	STD 10			8.57	2x			21.43	2x
STD 12	STD 11			4.29	2x			10.72	2x
STD u super. z nádorové tkáně	počet STD u plazmy	IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ (pg/ml)		IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ (pg/ml)					
		D	ředění	U	ředění				
STD 1		500000.00		500000.00					
STD 2	STD 1	125000.00	4x	166666.67	3x				
STD 3	STD 2	31250.00	4x	55555.56	3x				
STD 4	STD 3	7812.50	4x	18518.52	3x				
STD 5	STD 4	1953.13	4x	6172.84	3x				
STD 6	STD 5	488.28	4x	2057.61	3x				
STD 7	STD 6	122.07	4x	685.87	3x				
STD 8	STD 7			342.94	2x				
STD 9	STD 8			171.47	2x				
STD 10	STD 9			85.73	2x				
STD 11	STD 10			42.87	2x				
STD 12	STD 11			21.43	2x				

### **5.5 Izolace celkové RNA z melanomu a zdravé kůže**

Nádorová tkáň i tkáň zdravé kůže byly zpracovány stejným způsobem. Oba dva typy vzorků jsme nejprve ve zkumavce zhomogenizovali v 0,5 ml TRIzolu pomocí jednorázového plastového tloučku. Potom jsme přidali 1 ml TRIzolu a vzorek centrifugovali (14000 ot., 5 min, 4 °C). Do čisté zkumavky jsme přenesli 1 ml vzorku, ke kterému jsme přidali 200 µl chloroformu (v poměru 5:1). Zkumavku jsme 15 s zlehka promíchávali pomalým převrácením a poté jsme ji inkubovali 3 min při pokojové teplotě. Takto připravený vzorek jsme centrifugovali (12000 ot., 15 min, 4 °C) a následně odebrali horní čirou vrstvu do nové zkumavky. K této odebrané suspenzi jsme přidali 300 µl isopropanolu a inkubovali jsme přes noc v -20 °C. Následující den jsme směs centrifugovali (12000 ot., 10min, 4 °C) a odebrali jsme supernatant, ke kterému jsme přidali 1 ml 75 % ethanolu a vše zvortexovali. Vše jsme opět zcentrifugovali (7500 ot., 5 min, 4 °C) a odpipetovali jsme supernatant. Ve zkumavce jsme nechali asi 50 µl a znovu krátce zcentrifugovali, abychom mohli odebrat všechny supernatant. Pelet ve zkumavce jsme nechali vysušit (cca 15-30 min) a potom jsme jej rozpustili ve 30 µl H<sub>2</sub>O a inkubovali 30 min při pokojové teplotě. Následně jsme stanovili koncentraci a čistotu získané celkové RNA pomocí spektrofometru NanoDrop.

### **5.6 Reverzní transkripce RNA z melanomové a zdravé tkáně**

Reverzní transkripci jsme provedli pomocí komerčního kitu – QuantiTect Reverse Transcription Kit, kde jsme postupovali podle přiloženého návodu, pouze jsme zdvojnásobili objem reakce. Výsledný objem reakce byl 40 µl. Tento kit mimo jiné obsahuje i krok, který odstraňuje případnou kontaminaci genomickou DNA. Přepsanou cDNA jsme nakonec naředili s vodou 1:1 a uchovali ji při -20 °C.

### **5.7 Kvantitativní real-time PCR cDNA z melanomové a zdravé tkáně**

Při využití metody kvantitativního real-time PCR (qRT-PCR) jsme u všech vzorků použili komerčně dostupný supermix (5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix). Nejprve jsme si připravili MasterMix (= 4 µl EvaGreen Supermix + 2 µl 100x ředěný forward primeru + 2 µl 100x ředěný reverse primeru + 10 µl H<sub>2</sub>O), který jsme dávkovali 18 µl/jamka. K tomuto objemu jsme následně přidali 2 µl vzorku (celkem 50 ng cDNA v reakci). Všechny vzorky byly pipetovány v triplicátech, abychom eliminovali chyby při pipetování. Jednotlivé cykly qRT-PCR jsou popsány v tab. III, po 40 cyklech byla stanovena křivka tání začínající na 72 °C a vzrůstající do 95 °C, v každém kroku stoupající o 1 °C.

Primery použité v experimentu byly v naší laboratoři již navrženy mými kolegy. Nejprve bylo nutno všechny primery otestovat, zda jsou funkční a poté byly použity u vzorků z MeLiM selat. Testování funkčnosti primerů bylo nejdříve provedeno pomocí vizualizace vzniklých produktů na 1,5 % agarózovém gelu s využitím horizontální elektroforézy. Dále bylo predikováno, které páry primeru by měly nasedat správně, a měl by vznikat námi požadovaný produkt o určité velikosti. Nicméně správná funkčnost primerů byla definitivně potvrzena, až standardním Sangerovým sekvenováním, které jsme zadali firmě SEQme s.r.o. v Dobříši.

**Tab. III:** Průběh amplifikace qRT-PCR:

<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet opakování cyklu</b>
95 °C	12 min	1
95 °C	15 s	40
57 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 s	1
95 °C		1

Jednotlivé cykly a jejich délky byly zvoleny podle doporučení výrobce.

Z termal cycleru byla data pomocí CFX Manager softwaru exportována jako xlsx soubory (Microsoft Excel Worksheet). Vyhodnocení získaných dat z qRT-PCR bylo provedeno pomocí vestavěných funkcí tabulkového editoru Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA). Z dat jsme vyřadili repliky, u kterých byl stanoven prahový cyklus ( $C_t$ ) > 40. Zároveň jsme vyřadili vzorky, u kterých byla stanovena pouze jedna  $C_t$  hodnota ze tří replik a tato hodnota byla vyšší než  $C_t = 38$  nebo výsledné křivky tání neodpovídaly standardům.  $C_t$  hodnota je počet PCR cyklů potřebných pro vznik dostatečného množství naamplifikovaného produktu, který je systém schopen detekovat pomocí fluorescenčního signálu EvaGreen značky. Hodnoty  $C_t$  jsou nepřímo úměrné množství NK. Tedy čím nižší je vstupní množství NK v reakci, tím

později dojde systémem k detekci signálu a Ct hodnota bude vyšší, a naopak. Ct hodnoty exprese cytokinů jsme normalizovali k expresi referenčních genů (tzv. housekeeping genů). Housekeeping geny jsou konstitutivně exprimované geny, které se exprimují s nízkým rozptylem za normálních i patologických podmínek. Použili jsme 3 referenční geny protein kationtového efluxního systému (CUSB), glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH), a hypoxantin fosforibosyltransferáza 1 (HPRT1) a spočítali průměrnou Ct hodnotu jejich exprese v jednotlivých vzorcích. Normalizovanou expresi cytokinů  $\Delta Ct$  jsme vypočetli jako  $\Delta Ct = (Ct \text{ housekeeping genů} - Ct \text{ vzorku})$ .

### 5.8 Příprava vzorků z qRT-PCR na sekvenování

Pro ověření správné amplifikace produktů při qPCR jsme jednotlivé produkty nechali osekvenovat u firmy SEQme s.r.o. v Dobříši (<https://www.seqme.eu/en/>).

Před odesláním vzorků na sekvenaci jsme vzorky podle velikosti buď purifikovali za použití komerčního kitu – QIAquick® PCR Purification Kit nebo extrahovali z agarózového gelu po elektroforéze pomocí komerčního kitu – QIAquick® PCR Extraction Kit. V obou případech jsme postupovali podle příložených návodů. Nakonec jsme přečištěný templát smíchali s primerem podle instrukcí firmy SEQme s.r.o.:

*Tab. IV: Složení vzorků pro sekvenační reakci*

Templát	Množství	Náš primer	Celkový objem
PCR produkt < 500bp	50 ng	25 pmol primeru	10 $\mu$ l

Získané sekvence PCR produktů jsme vyhledali pomocí BLAST algoritmu v databázi *Sus scrofa* a ověřili jsme, že se shodují s mRNA daných cytokinů.

### 5.9 Histologické barvení kryožezů a jejich vyhodnocení

Kryožezy s nádorovou tkání byly obarveny našimi laborantkami podle standardního postupu hematoxylin-eosinového barvení a následně překryty krycím sklíčkem za použití montovacího média – glycerinové želatiny. Takto připravené preparáty byly naskenovány pomocí Olympus VS120 světelného mikroskopu, při zvětšení 20x a délce expozice 3 ms. Získané mikroskopické obrazy histologických řezů melanomů jsme kategorizovali do čtyř skupin:



1. Progrese – nádorová tkáň je tvořena především melanomovými (melanin-nesoucími) buňkami různé velikosti a s různou koncentrací melaninu (takže je možné rozlišit větší hnědo-černé buňky a menší slabě nahnědlé buňky), struktura tkáně je kompaktní nebo lokálně mírně rozvolněná; destrukce melanomových buněk je jen slabá (lokální, menší oblasti) a stejně tak lymfocytární infiltrace je slabá a lokální; vazivová tkáň (vzniklá přestavbou destruované melanomové tkáně) není přítomná.
2. Časná spontánní regrese – nádorová tkáň je tvořena především většími hnědo-černými melanomovými (menších slabě nahnědlých buněk je méně), struktura tkáně je rozvolněná; destrukce melanomových buněk a lymfocytární infiltrace je zřetelná (patrná obvykle ve větší části řezu); vazivová tkáň není přítomná, a nebo jen minimálně (v malé oblasti řezu).
3. Probíhající spontánní regrese – nádorová tkáň je tvořena především většími hnědo-černými melanomovými (menších slabě nahnědlých buněk je méně), struktura tkáně je více rozvolněná; destrukce melanomových buněk a lymfocytární infiltrace je velmi výrazná (patrná obvykle v celém řezu); vazivová tkáň jen přítomná ve větší oblasti řezu.
4. Pokročilá spontánní regrese – nádorová tkáň je tvořena především většími hnědo-černými melanomovými buňkami, které tvoří drobnější shluky, pruhy anebo jsou jednotlivě rozptýlené, což vede k výrazně rozvolněné struktuře tkáně; destrukce melanomových buněk a lymfocytární infiltrace je velmi výrazná (patrná obvykle v celém řezu); vazivová tkáň jen přítomná ve značně velkých oblastech řezu.

### **5.10 Stanovení koncentrace proteinů v supernatantu z nádorové tkáně**

Stanovení proteinů jsme provedli v izolovaném supernatantu z nádorové tkáně. Získaný extrakt jsme 5x ředili pomocí PBS (5  $\mu$ l supernatantu + 20  $\mu$ l PBS). K detekci proteinů ve vzorku jsme použili Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit společně s komerčními standardy Pre-Diluted Protein Assay Standards. Vše jsem napipetovali do 96-jamkové destičky dle instrukcí v návodu komerčního kitu, standardy i vzorky jsme pipetovali v triplicátech. Destičku s BCA činidlem jsme inkubovali 30 min při 37 °C na třepačce. Následně jsme provedli měření absorbance při vlnové délce 562 nm pomocí multidetekčního readeru Synergy BioTek. Získaná data byla dále zpracována pomocí vestavěných funkcí tabulového editoru Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA), kde byly na základě absorbance vzorků porovnáním s kalibrační křivkou odečteny koncentrace proteinů ve vzorcích.

## 6 Výsledky

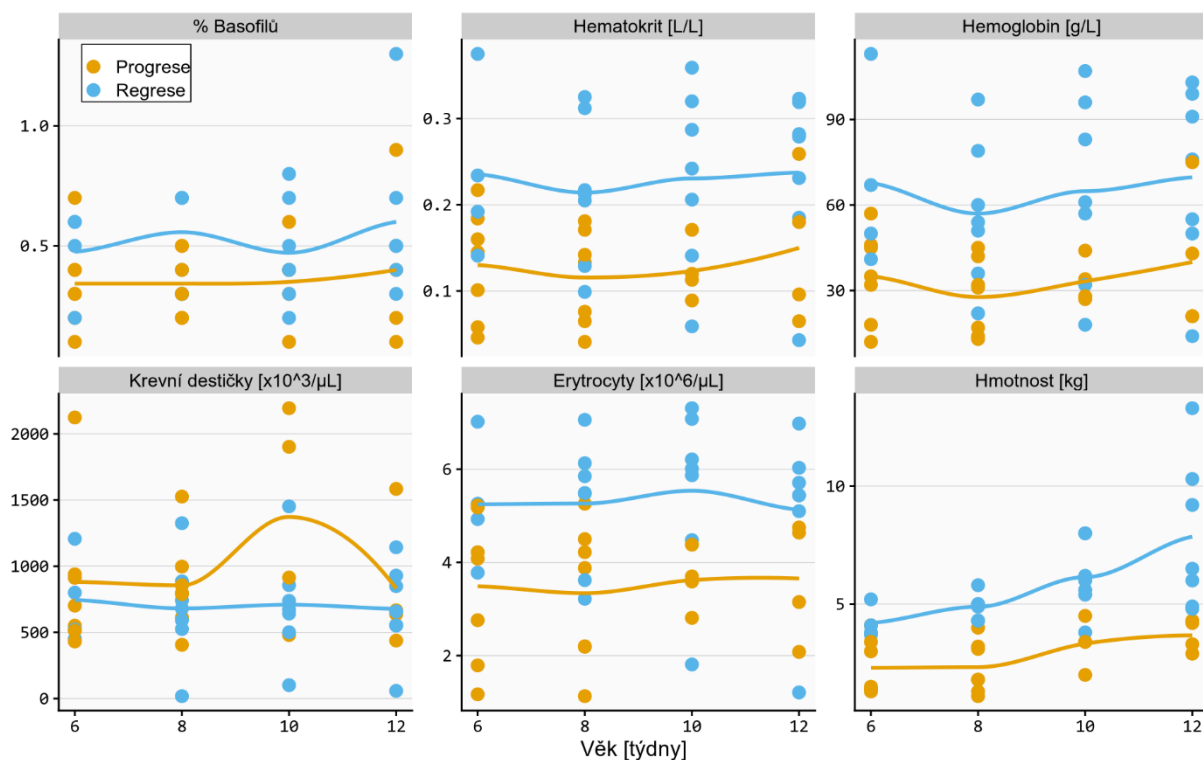
### 6.1 Makroskopické a hematologické sledování MeLiM selat

Podařilo se nám získat analyzovaný materiál od několika skupin MeLiM selat, celkem jsme hodnotili 15 jedinců. Experimentální skupina zvířat byla tvořena 4 vrhy, a to konkrétně 8 sourozenci narozenými 19.09.2018 (selata označená M36 – M43), 3 sourozenci narozenými 11.11.2018 (označené M51 – M53), 3 sourozenci narozenými 22.06.2019 (označené L656/044 – L656/046) a seletem M55 (nar. 15.11.2018), které bylo z daného vrhu jediné zahrnuto do experimentu, protože jeho sourozenci neměli dostatečný počet a velikost odebratelných nádorů či nádory byly lokalizovány v neoperovatelných místech (obličej, distální části končetin apod.). Data jsme sbírali nezávisle na pohlaví, rozložení celkového datového souboru je 9 kanců : 6 sviní.

Na základě celkové fyzické kondice, změn hmotnosti zvířete v čase, hematologického profilu, pitevního nálezu na konci experimentu (příp. době případného úhynu zvířat) jsme selata rozdělili do dvou skupin. První skupina jsou progredující selata, která jeví známky progresu nádoru. Docházelo u nich k opoždění tělesného růstu, minimálnímu příbytku (případně stagnaci či úbytku) tělesné hmotnosti ve sledovaných 2-týdenních intervalech a kachexii, chudokrevnosti. Progredující zvířata byla postižena zejména nodulárními nádory bez výrazného zplošťování a blednutí a pitevní nález ukazoval silně zvětšené regionální uzliny, na průřezu černě zbarvené, mnohočetné metastázy v plicích a slezině, ale i dalších orgánech (játra, střeva, žaludek). Do druhé skupiny byla zařazena selata s regredujícím průběhem melanomu. Tato selata vykazovala výrazný váhový přírůstek mezi sledovanými 2-týdenními intervaly, dobrou fyzickou kondici bez známek kachexie, docházelo k zplošťování melanomů. Postižení vnitřních orgánů metastázami bylo mírné (plíce, slezina) a mírně zvětšené regionální lymfatické uzliny, na průřezu černě zbarvené.

Rozlišení progredujících a regredujících selat na základě vybraných parametrů je demonstrováno na obr č. 8. Regredující jedinci jsou zobrazeni modrou barvou, oproti progredujícím zvířatům vyobrazeným žlutou barvou. Na ukázce těchto několika parametrů můžeme vidět, že je zde rozdíl v průměrných hodnotách skupin (plné čáry), i když jednotliví jedinci nemusí mezi sebou vykazovat takové rozdíly. Při hematologické analýze má regredující skupina vyšší průměrné procentuální zastoupení basofilů, oproti regredující skupině. Stejně tak regredující jedinci vykazují vyšší průměrnou hodnotu hematokritu a hemoglobinu i erytrocytů,

což může naznačovat, že nejsou tak anemičtí jako progredující selata a nemají další komplikace spojené s nedostatkem železa. Stejný trend vyšší průměrné hodnoty můžeme pozorovat i u hmotnosti regredující skupiny, kde hmotnost v čase roste, oproti tomu progredující selata ve váhovém příbytku stagnují nebo na váze přibývají velmi pomalu.



**Obr. č. 8: Rozdíly ve sledovaných parametrech u progredujících a regredujících selat.** Bodové znázornění progredujících (žluté) a regredujících (modré) selat. Jednotlivé grafy jsou proloženy křivkou znázorňující průměrné hodnoty obou skupin. U průměrných hodnot jednotlivých skupin můžeme sledovat rozdíl u analyzovaných parametrů - % bazofilů, hematokrit, hemoglobin, počet krevních destiček, počet erytrocytů a váhy. Tyto zjištěné rozdíly nám lépe definují regredující a progredující skupinu selat.

Na celém souboru získaných dat z hematologického profilu, hmotnosti zvířat a počtu nádorů jsme provedli analýzu hlavních komponent (PCA). Pomocí lineární transformace původních znaků na nové, nazvané hlavní komponenty – PC1 a PC2 – jsme dosáhli 2D zobrazení na obr.č. 9. Každá hlavní komponenta představuje lineární kombinaci původních znaků. Pomocí PCA jsme zobrazili rozlišení progredujících a regredujících selat. V našem případě PC1 (osa x) objasňuje 37.0 % variability původních dat a PC2 (osa y) vysvětluje dalších 28.6 % variability původních dat nezahrnuté v PC1. Původní znaky mající největší vliv na PC1 jsou počet neutrofilů, počet bílých krvinek a počet monocytů, tyto vektory mají společný směr. V opačném směru ovlivňuje PC1 procentuální zastoupení eozinofilů a lymfocytů. PC2 je nejvíce ovlivněna



zasoupení basofilů (*baso\_p*). Procentuální zastoupení vyjadřuje procento dané subpopulace z celkového počtu leukocytů.

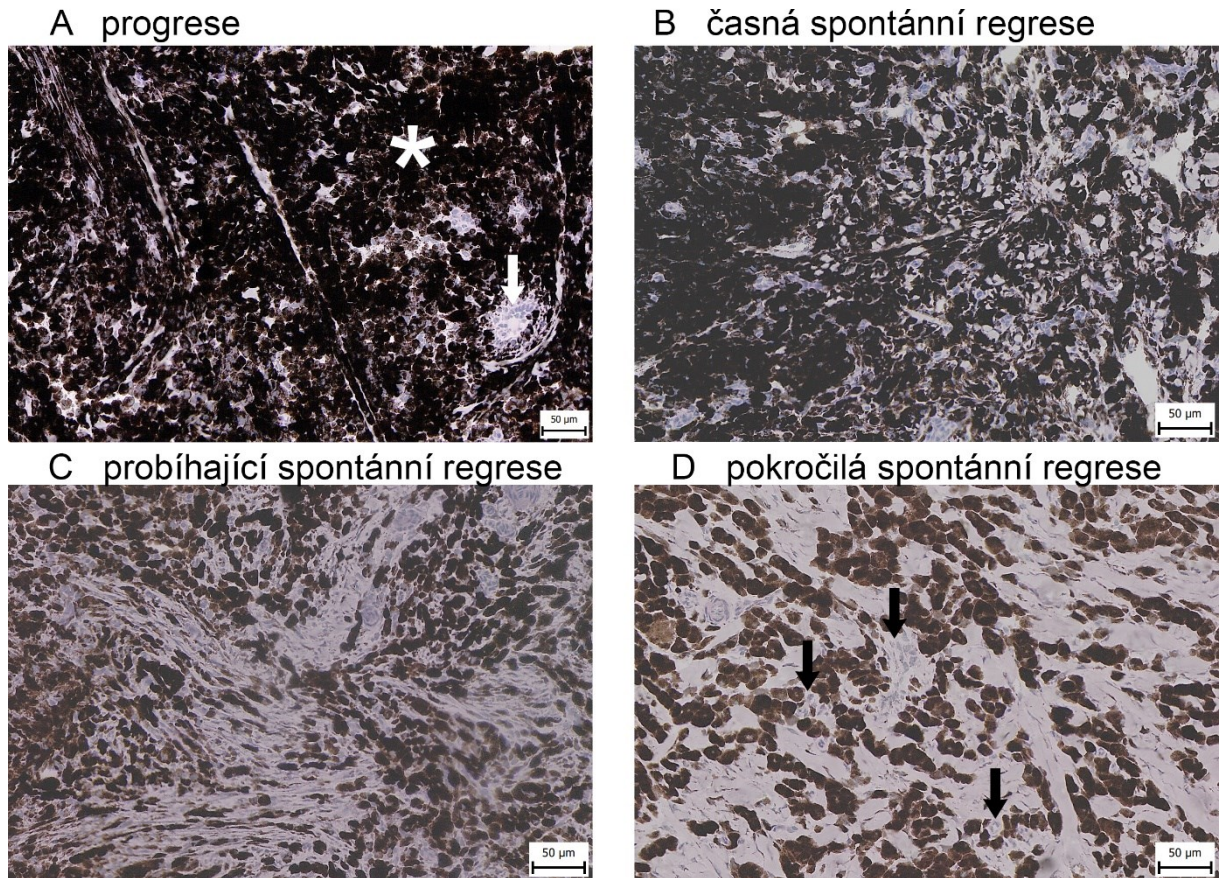
Konečné rozdělení selat do skupin je znázorněno v tab. V. Skupina progredujících selat zahrnuje 8 selat a regredující skupina 7 selat.

**Tab. V:** Rozdělení selat podle progrese a regrese (*M* = male; *F* = female)

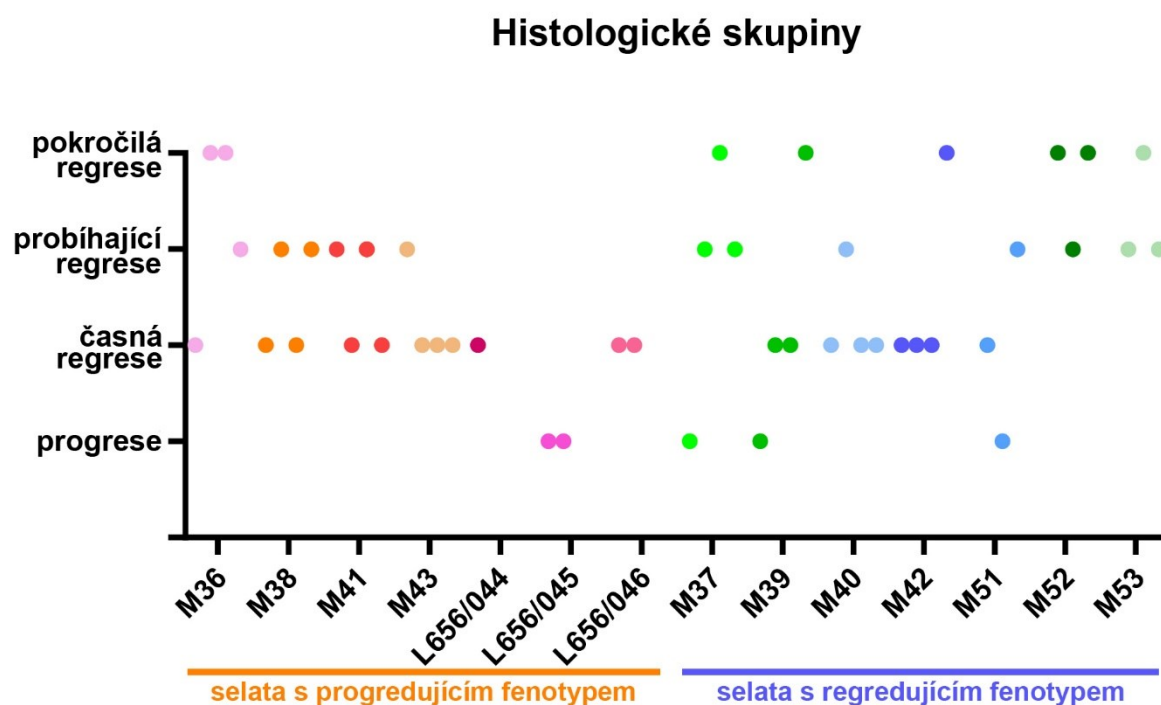
progredující			regredující		
označení zvířete	datum narození	pohlaví	označení zvířete	datum narození	pohlaví
M36	19.09.2018	M	M37	19.09.2018	M
M38	19.09.2018	M	M39	19.09.2018	M
M41	19.09.2018	F	M40	19.09.2018	F
M43	19.09.2018	F	M42	19.09.2018	F
M55	15.11.2018	F	M51	11.11.2018	M
L656/044	22.06.2019	M	M52	11.11.2018	M
L656/045	22.06.2019	M	M53	11.11.2018	F
L656/046	22.06.2019	M			

## 6.2 Histologická analýza kožního melanomu MeLiM selat

Histologické řezy z nádorové kůže obarvené barvením hematoxylin-eosin byly naskenovány světelným mikroskopem Olympus VS120. Na základě histologického obrazu byly nádory rozděleny do 4 kategorií – 1. progrese, 2. časná spontánní regrese, 3. probíhající spontánní regrese, 4. pokročilá spontánní regrese. Charakteristické znaky nádorů v jednotlivých kategoriích jsou podrobně popsány v Metodách, kapitola 5.9 Histologické barvení kryořezů a jejich vyhodnocení. Na obr. č. 10 jsou ukázány reprezentativní řezy z jednotlivých kategorií. Podle tohoto klíče byly hodnoceny všechny kryořezy z kožních melanomů MeLiM selat (obr.č. 11). Hodnocení probíhalo nezávisle na skupině, do které sele spadá (progredující versus regredující) a z něhož byl nádor hodnocen.



**Obr. č. 10: Histologický obraz progredujících a regredujících nádorů.** *A) Melanom ve fázi růstu (progrese). Tkáň je převážně tvořena melanin-obsahujícími buňkami (hvězdička) s velmi slabou lymfocytární infiltrací a minimem vaziva. Je možno rozlišit větší hnědočerné buňky a menší nahnědlé buňky. Bílá šipka ukazuje krevní kapiláru. B) V časně regresi dochází k rozvolňování tkáně s mírnou lymfocytární infiltrací a minimálním obsahem vaziva. C) Při dalším průběhu spontánní regrese ubývá menších nahnědlých buněk, je znatelná infiltrace imunitními buňkami a tvorba vaziva. D) Při pokročilé regresi je nádorová tkáň tvořena především většími hnědočernými buňkami, které jsou v drobných shlucích, pruzích či jednotlivě rozptýlené, mezi buňkami přibývá vazivo (bílé oblasti). Infiltrace imunitními buňkami je výrazná (černé šipky). Měřítko 50  $\mu\text{m}$ .*



**Obr. č. 11:** *Histologický obraz nádorů u jednotlivých zvířat ve věku 6-12 týdnů. Body vyznačené stejnou barvou reprezentují histologické kategorie nádorů odebraných od daného MeLiM selate ve věku (zleva doprava) 6, 8, 10 a 12 týdnů. Pokročilá regrese s výrazným úbytkem pigment-nesoucích buněk a nárůstem vazivové tkáně byla pozorována zejména u nádorů odebraných ze selat s regredujícím fenotypem v pozdějších časových intervalech.*

### 6.3 Kvantifikace cytokinů v krevní plazmě MeLiM selat

Cytokiny krevní plazmy byly analyzovány s cílem zmapovat případnou systémovou odpověď organismu na melanom a případně nalézt znaky, které by byly detekovatelné ze snadno dostupného vzorku, jakým je krev. Kvantifikovali jsme 13 cytokinů v plazmě všech našich sledovaných MeLiM selat. Byly analyzovány cytokiny:  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-1RA$ ,  $IL-2$ ,  $IL-4$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-10$ ,  $IL-12$ ,  $IL-18$  a GM-CSF multiplexní Luminex metodou.

Vzorky krevní plazmy byly analyzovány v duplikátech. Analýza mediánu intenzity fluorescence, získaného z Luminexu, umožnila vyhodnocením v R s pomocí balíčku drLumi připravit kalibrační křivky ze standardů o známé koncentraci a odhadnout koncentrace v neznámých vzorcích. Z odečtených koncentrací jsme vypočetli aritmetický průměr. Vzorky, ve kterých byl daný cytokin pod detekčním limitem, jsme nikterak nenahrazovali a dále s nimi bylo pracováno, jako s nezměřenými (jako chybějící hodnota).

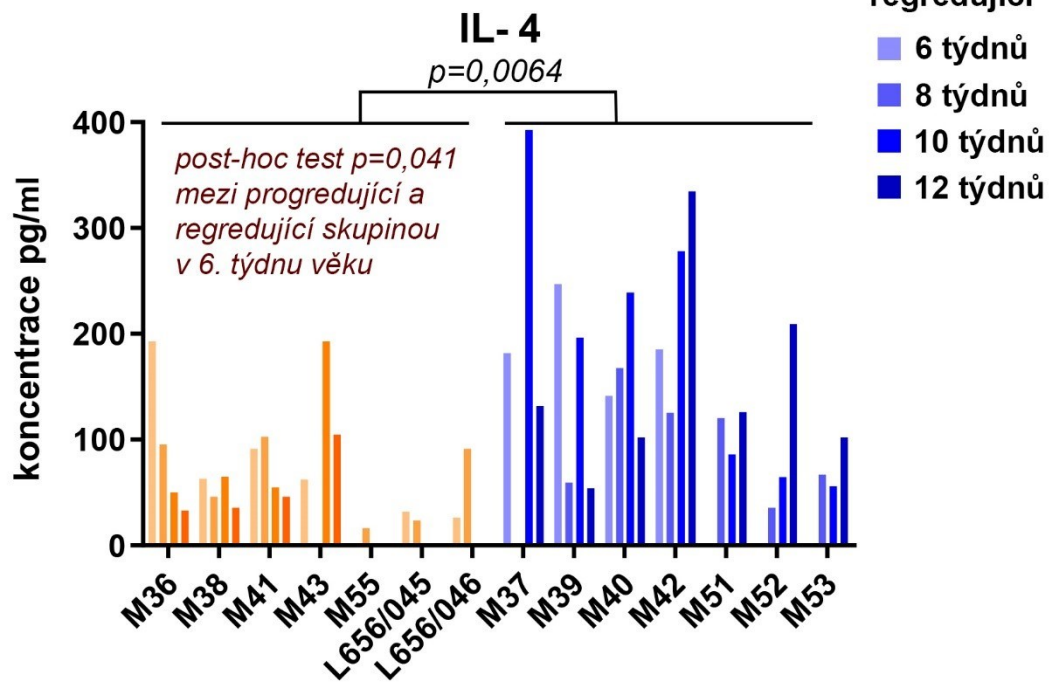
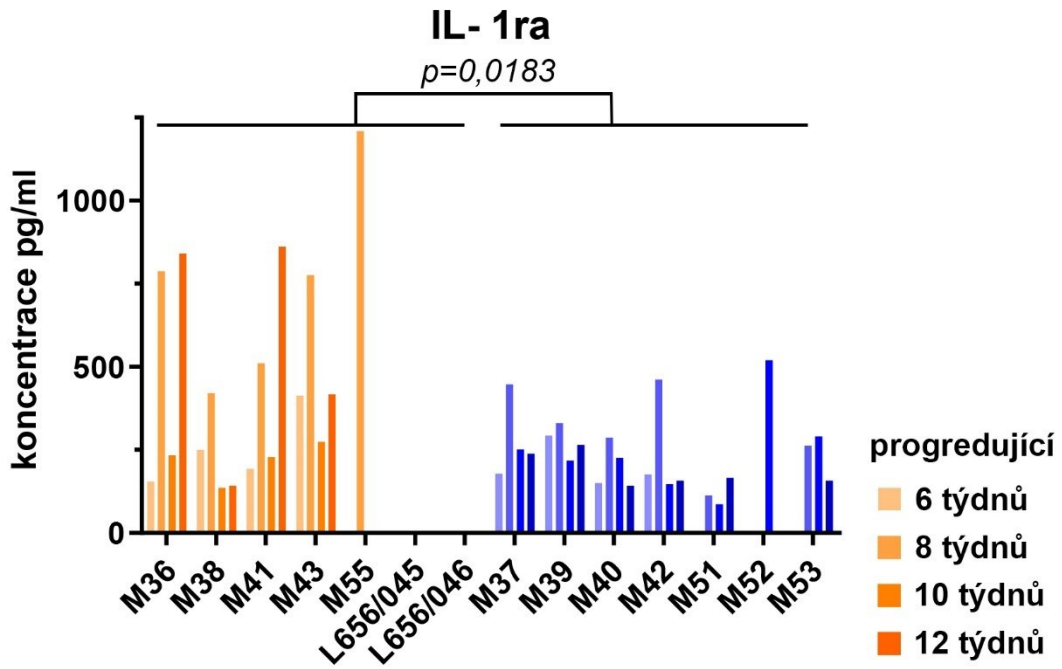
Ze získaného datového souboru koncentrací cytokinů jsme před další porovnávací analýzou a grafickým znázorněním vyřadili odlehlé hodnoty. Abychom dosáhli vyřazení odlehlých hodnot,

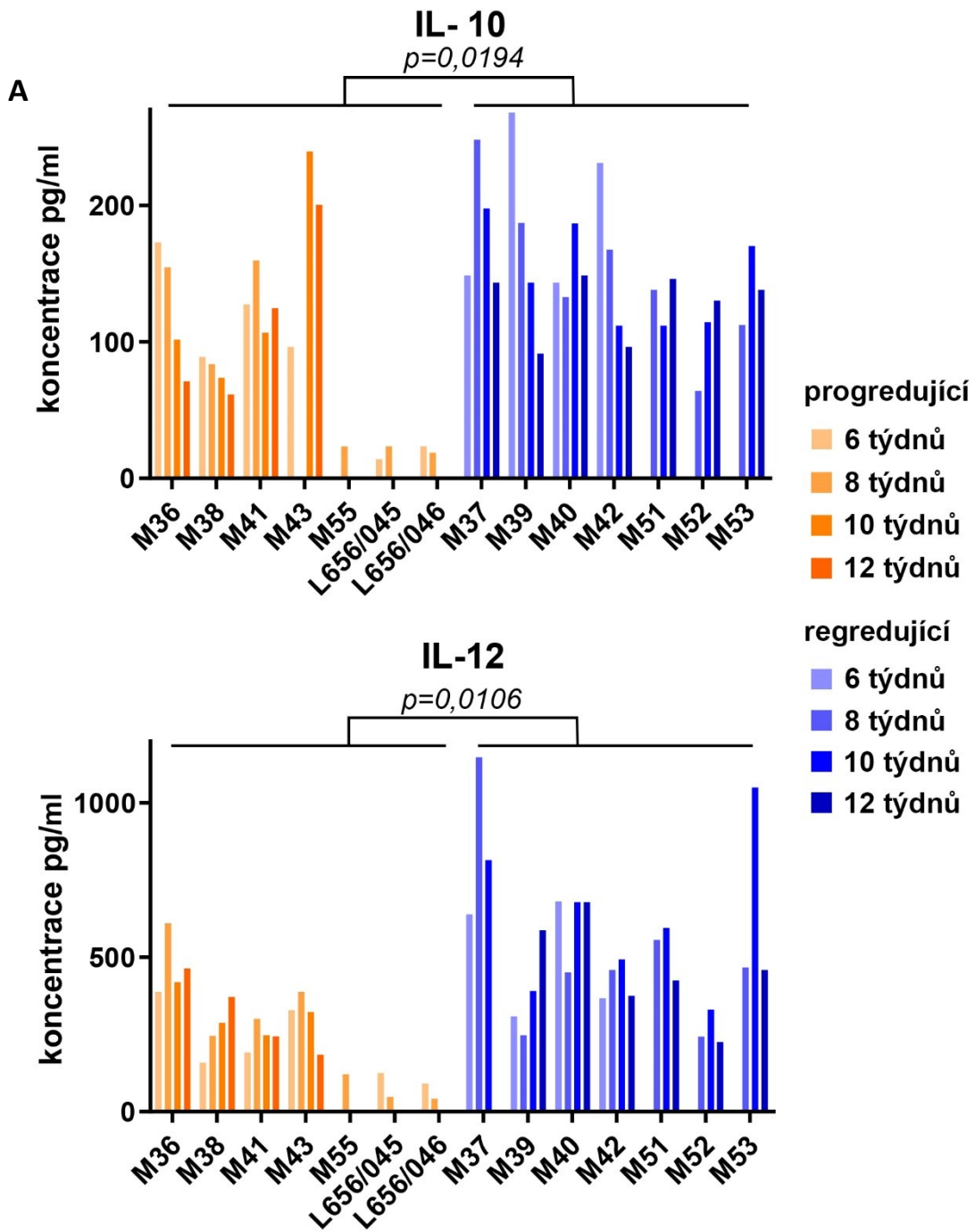
použili jsme v R programu střední hodnotu absolutní odchylky (MAD). MAD byla spočítána pro každý cytokin zvlášť a zároveň zvlášť pro skupinu progredujících a regredujících prasat, abychom zachovali možné rozdíly mezi skupinami. Jako cut off jsme zvolili  $MAD > 4$ , tj. pokud koncentrace cytokinu byla minimálně čtyřnásobně vyšší, než medián naší analyzované skupiny, došlo k vyřazení dané hodnoty. Celkem jsme pomocí MAD vyřadili 35 hodnot z celkového počtu 611 výstupů. Kromě jednotlivých hodnot jsme vyřadili z dalších analýz koncentrací cytokinů v plazmě i sele L656/044 které u 11 cytokinů (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, GM-CSF) z celkového počtu 13 sledovaných cytokinů dosahovalo vyšší hodnoty, než byl stanovený cut off. U tohoto selete došlo k neobvykle velmi rychlému progredujícímu vývoji a uhynulo v 6. týdnu věku, a pro tyto abnormality bylo z analýz cytokinů v krevní plazmě vyřazeno.

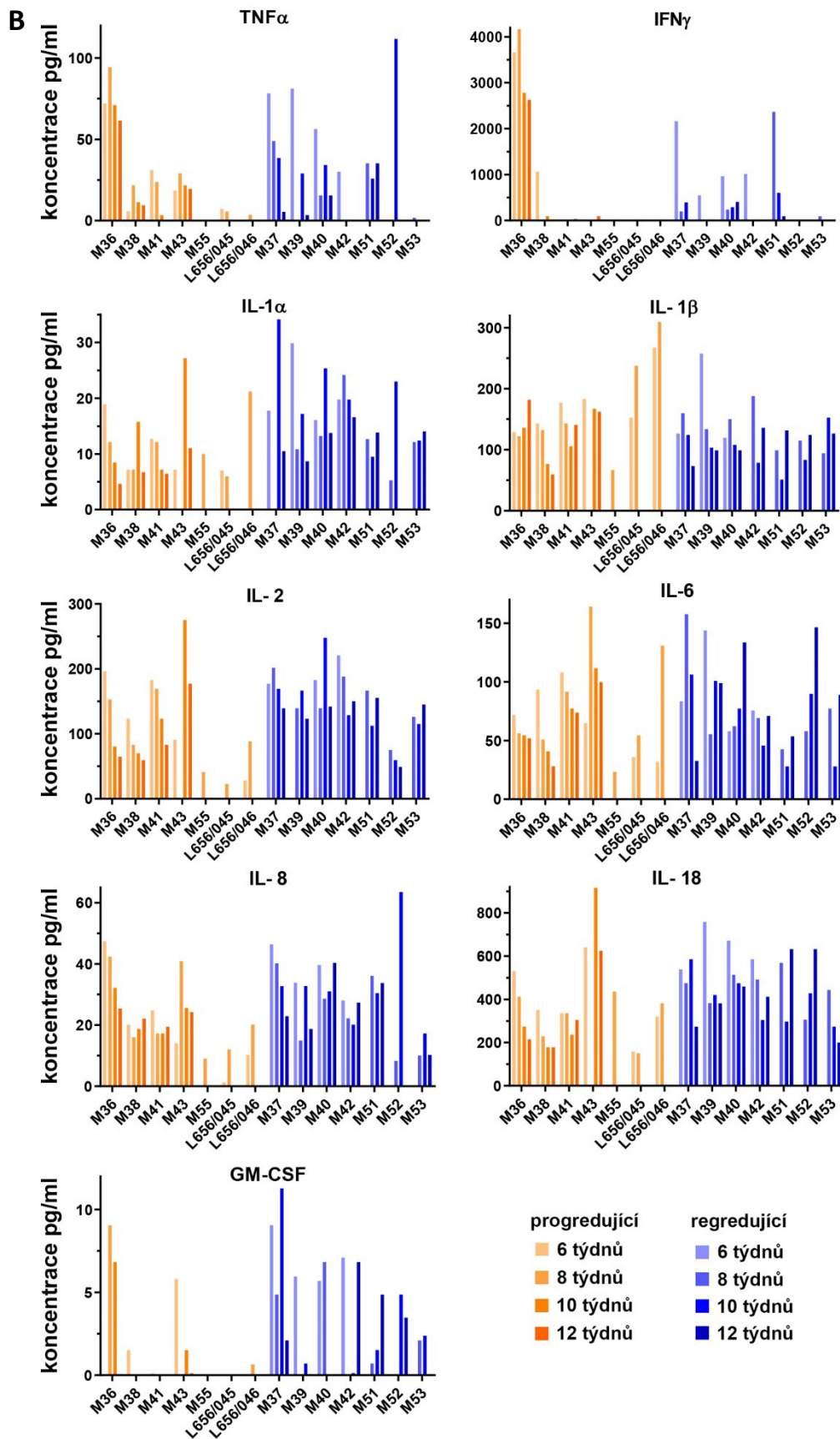
Dále jsme použili statistickou vícefaktorovou analýzu rozptylu (two-way ANOVA), abychom mohli posoudit variaci v koncentracích cytokinů mezi progredujícím a regredujícím vývojem nemoci a v souvislosti s věkem zvířat. Pro úpravu nedostatku sféricity u vícefaktorové ANOVA analýzy byla použita Greenhouse-Geisser korekce.

Pomocí ANOVA testu byl pozorován statisticky významný vliv progresu či regrese na koncentraci cytokinů v krevní plazmě MeLiM selat u IL-1RA, IL-4, IL-10 a IL-12. U ostatních cytokinů – TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-18 a GM-CSF – nebyl vliv regredující a progredující skupiny nalezen. Stejně tak nebyl nalezen významný vliv věku selat. Následně byl použit post-hoc test (Bonferroniho metoda mnohonásobného porovnávání) pro zjištění, mezi kterými konkrétními skupinami je rozdíl. Statisticky významný rozdíl byl potvrzen pouze u IL-4 ve věku selat 6 týdnů, kde byla pozorována vyšší hladina IL-4 u regredující skupiny selat oproti progredující skupině. Všechny grafy koncentrací cytokinů v plazmě jsou zobrazeny na obr. č. 12.









**Obr.č. 12: Hladiny cytokinů v plazmě MeLiM selat. (A) u cytokinů IL-1RA, IL-4, IL-10 a IL-12 byl pozorován statisticky významný vliv skupiny progrese/regrese na koncentraci cytokinů v plazmě (ANOVA, černě uvedené p hodnoty). Následný post-hoc test potvrdil rozdíl v hladině**

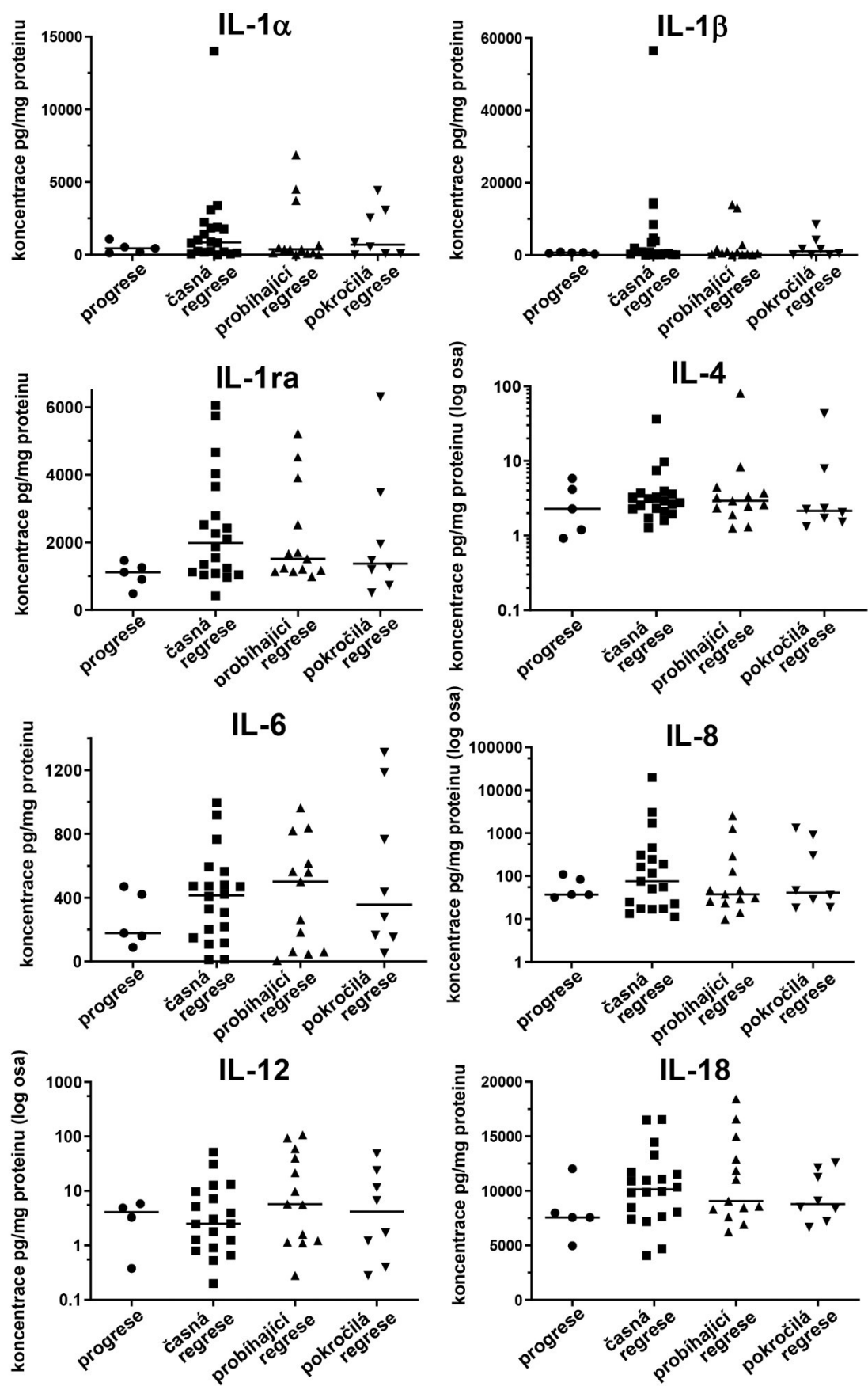
*IL-4 v 6. týdnu věku selat. (B) koncentrace cytokinů v plazmě, u kterých nebyly nalezeny rozdíly mezi progredující a regredující skupinou selat.*

#### **6.4 Kvantifikace cytokinů na úrovni proteinů v nádorové tkáni**

Vzhledem k tomu, že plazma protéká celým organismem a může obsahovat cytokiny produkované různými buňkami a tkáněmi, zaměřili jsme se i na analýzu koncentrace cytokinů v nádorové tkáni, která by měla specifitěji odrážet imunologické změny doprovázející regresi či progresi onemocnění. Stejně jako v plazmě, tak i v supernatantu homogenátu nádoru jsme sledovali všech 13 cytokinů a k odečtení koncentrace cytokinů jsme použili R program s drLumi balíčkem. Následně jsme koncentraci cytokinů normalizovali na množství tkáně (mg tkáně), ze kterého byl supernatant pro měření cytokinů získán, nebo na celkové množství proteinů, které byly v homogenátu tkání přítomny (stanoveno BCA metodou).

Oproti plazmě jsme v supernatantu nebyli schopni kvantifikovat všechny cytokiny. TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10 a GM-CSF buď nebyly kvantifikovány vůbec, nebo pouze ve velmi malém počtu vzorků. Proto jsme je z dalších analýz vyřadili, abychom se vyvarovali zavádějícím výsledkům získaným z malého počtu dat.

Protože jednotlivé nádory se můžou vyvíjet s určitou variabilitou u daného jedince či v daném věku, bylo množství cytokinů v nádorové tkáni sledováno v souvislosti s histologickým obrazem konkrétního nádoru. Použili jsme čtyři skupiny definované podle histologie melanomu: progrese, časná regrese, probíhající regrese a pokročilá regrese. Cílem bylo zmapovat, zda hladiny cytokinů odráží případnou imunitní reakci vedoucí k regresi nádoru. Výsledky jsou zobrazeny na obr. č. 13, kde jsou koncentrace cytokinů vztaženy na množství proteinu v homogenátu tkáně. Při normalizaci koncentrace cytokinů na miligram vstupního množství nádorové tkáně (obrázek S1 v příloze) jsme získali podobné výsledky jako při normalizaci na miligram proteinu homogenátu. Trendy v obou případech vynesných koncentracích jsou stejné a i další analýzy potvrdily, že není rozhodující, zda je koncentrace cytokinů vztažena na množství tkáně nebo proteinů.



Obr.č. 13: Hladiny cytokinů detekované v supernatantu homogenátu z nádorové tkáně u MeLiM selat. Mezi výběrovými skupinami námi definovaných kategorií nebyl prokázán rozdíl

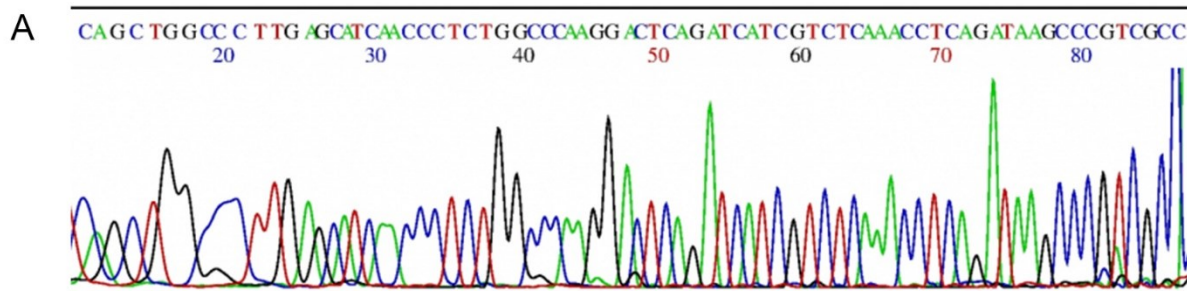
*v rozptylech (ANOVA pro data s normálním rozložením, Kruskal-Wallis test pro ostatní cytokiny). U jednotlivých cytokinů jsou znázorněny mediány (černá příčka).*

V další části jsme použili analýzu rozptylu (one-way ANOVA), abychom porovnali rozptyly výběrových souborů, tedy naše histologické skupiny nádorů. Tuto metodu lze použít pouze za splnění podmínek nezávislého měření, normality dat a shody rozptylu. K ověření normality dat jsme využili GraphPad Prism 8, při posouzení jsme použili Anderson-Darling test, D'Agostino&Pearson test, Shapiro-Wilk test a zobrazení pomocí QQ grafu. Normalita byla prokázána pouze u dvou cytokinů, kde jsme prokázali i shodu rozptylu pomocí F-testu, a to u IL-6 a IL-18. V obou případech jsme použili klasickou ANOVA, která ale mezi proměnnými neprokázala rozdíl středních hodnot. Proto už jsme nemuseli použít post-hoc testy, abychom otestovali, které konkrétní skupiny se odlišují od ostatních. U IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-8, IL-12 nebylo prokázáno normální rozložení, a proto jsme použili neparametrické testování. Jako neparametrický test jsme zvolili Kruskal-Wallis test. Ale ani ve zbylých cytokinech se nám nepodařilo prokázat statisticky významný rozdíl středních hodnot v histologických skupinách melanomů.

## **6.5 Analýza exprese cytokinů na úrovni mRNA v nádorové tkáni a okolní kůži**

### **6.5.1 Ověření specifické amplifikace při qRT-PCR**

Primery pro qRT-PCR byly již dříve navrženy v naší laboratoři. Bylo nutné ale ověřit jejich funkčnost. Otestovala jsem teplotu nasedání primerů na cDNA nejprve počítačovou predikcí (Primer-BLAST) a poté jsem experimentálně ověřila správné nasedání a amplifikaci produktu žádané délky pomocí horizontální elektroforézy PCR produktů v agarózovém gelu. Konečné potvrzení správné funkčnosti primerů jsme nechali ověřit pomocí klasického Sangerova sekvenování. Všechny naše navržené primery pro cytokiny (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8), i referenční geny (CUSB, GAPDH, HPRT1) amplifikovaly správný produkt. Na obr. č. 14 je znázorněna ukázka výsledku ze sekvenování na příkladu TNF $\alpha$ .



**B** **Sus scrofa TNF-alpha mRNA, complete cds**  
 Sequence ID: [JF831365.1](#) Length: 771 Number of Matches: 1

Range 1: 201 to 277 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
135 bits(73)	5e-31	76/77(99%)	1/77(1%)	Plus/Plus

```

Query 12  CAGCTGG-CCCTTGAGCATCAACCCTCTGGCCCAAGGACTCAGATCATCGT
          |||
Sbjct 201  CAGCTGGCCCTTGAGCATCAACCCTCTGGCCCAAGGACTCAGATCATCGT

Query 71  CAGATAAGCCCGTCGCC 87
          |||
Sbjct 261  CAGATAAGCCCGTCGCC 277
  
```

**Obr. č. 14: Sekvenace TNF $\alpha$ .** **A)** chromatogram ze Sangerova sekvenování zobrazující sekvenci kódující TNF $\alpha$ ; **B)** ověření osekvenovaného řetězce pomocí BLASTu – vyhledání odpovídající mRNA v transkriptomu *Sus scrofa*.

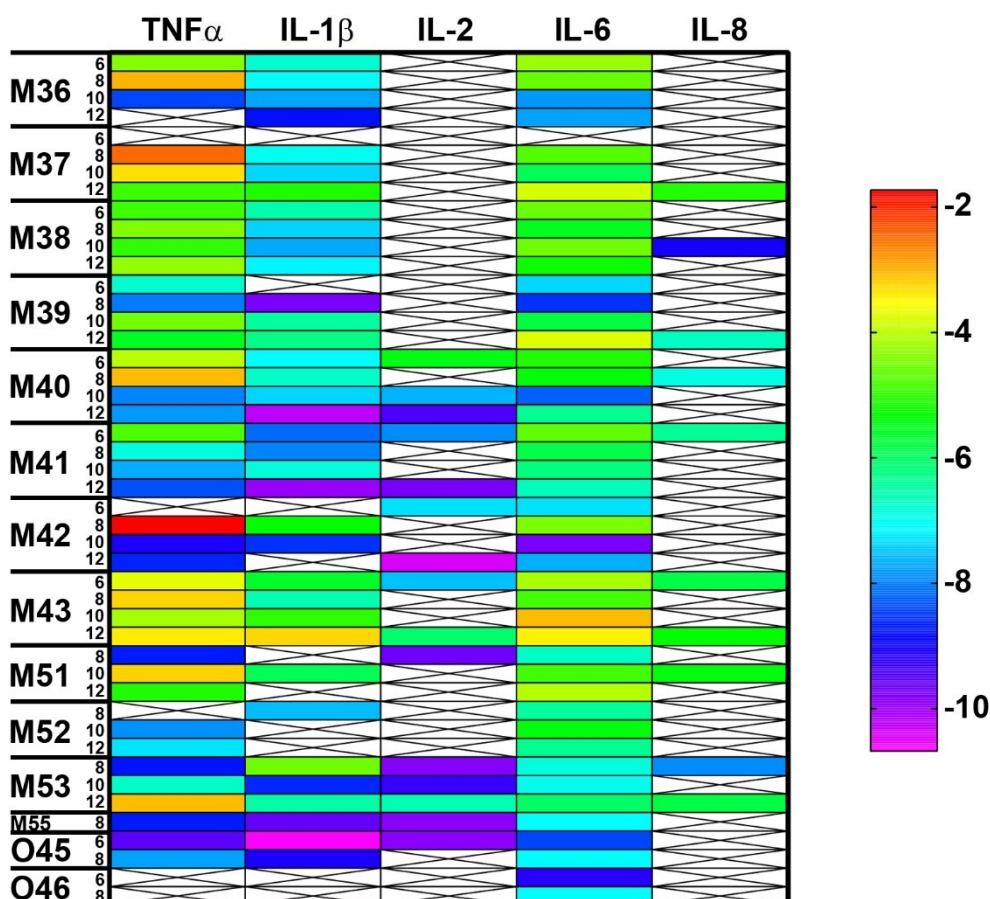
### 6.5.2 Relativní kvantifikace mRNA kódujících cytokiny pomocí qRT-PCR

Pomocí qRT-PCR jsme detekovali přítomnost mRNA kódující cytokiny TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 a IL-8, přímo v nádorové tkáni a v kůži. Tuto detekci jsme provedli u všech našich zvířat ve čtyřech časových intervalech (6., 8., 10. a 12. týden stáří zvířete).

Z triplikátů Ct hodnot byl nejprve vypočten aritmetický průměr. Vzorky pro něž nebyla naměřena Ct hodnota byly z dalších analýz vyřazeny. Pokud byla ve třech replikách změřena pouze jedna hodnota a ta byla Ct>38, tak jsme tento vzorek také vyřadili jako nespecifickou amplifikaci ve vysokém cyklu PCR. Získané průměrné hodnoty Ct byly pro každý vzorek normalizovány na expresi housekeeping genů. Nejprve jsme z triplikátů každého housekeeping genu – CUSB, GAPDH, HPRT1 – vypočítali aritmetický průměr Ct a následně jsme tyto průměry ještě zprůměrovali. Od takto získané průměrné hodnoty Ct tří housekeeping genů jsme odečetli Ct hodnotu našich vzorků a tím jsme získali  $\Delta$ Ct.

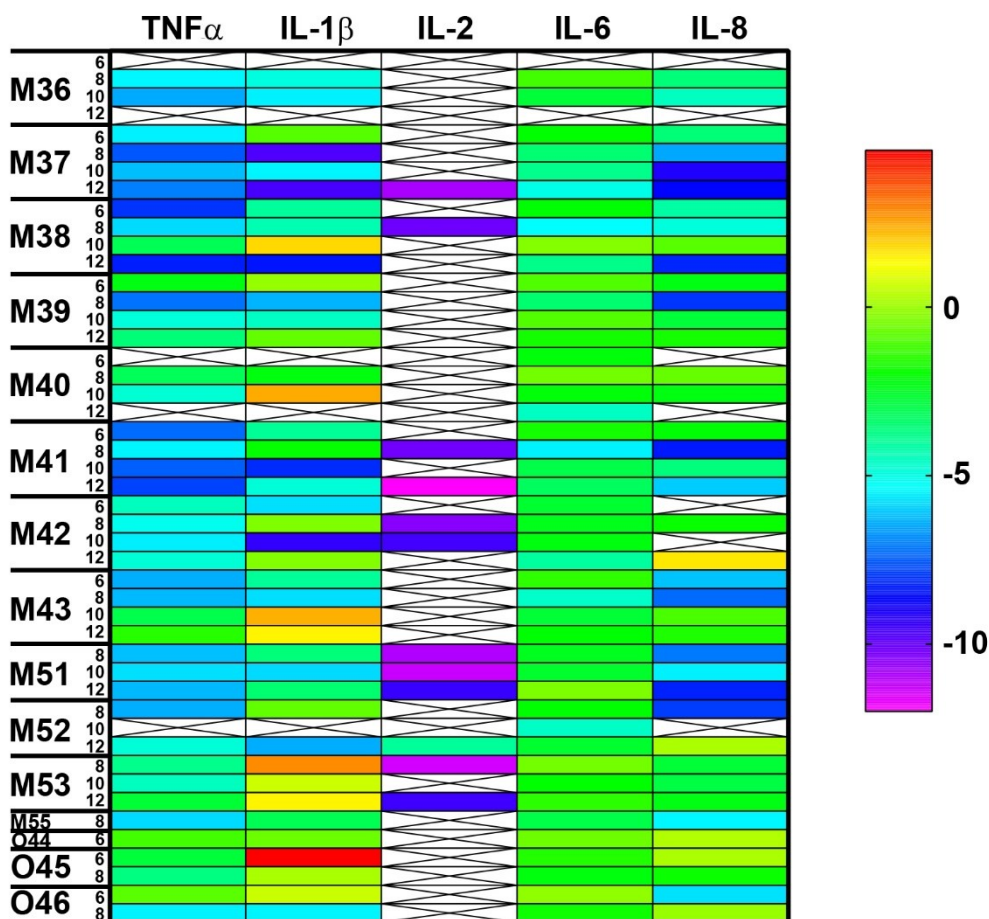
Heat mapy (obr.č. 15 a 16) zobrazují expresi všech pěti cytokinů u celého souboru našich zvířat. V tomto zobrazení nejsou selata rozřazena podle skupin, do kterých spadají (regredující a progredující), ale pouze podle svého identifikačního čísla (číslo ušní známky). Účelem tohoto

zobrazení je ukázat rozdíly v  $\Delta C_t$  jednotlivých cytokinů, a především jejich detekovatelnosti. Některé cytokiny můžeme detekovat téměř ve všech vzorcích (př. IL-6), oproti jiným, které detekujeme pouze ve zlomku případů (př. IL-2). Pomocí heat mapy můžeme zobrazit i výsledky pod detekčním limitem (bílá pole s překřížením). Tedy situace, kdy ve vzorku bylo přítomno velmi malé nebo žádné množství kódující mRNA a my nejsme schopni pomocí našeho systému toto množství detekovat, přestože bylo měření na tomto vzorku provedeno.



**Obr. č. 15:** Heat mapa exprese cytokinů u MeLiM prasat ve zdravé kůži. Grafické znázornění  $\Delta C_t$  hodnot exprese cytokinů a nedetekovatelných hodnot u měřených vzorků. Cytokiny jsou exprimovány ve 4 až 1000x ( $2^2$  až  $2^{10}$ ) menším množství než referenční geny. Nejvíce exprimované cytokiny jsou zobrazeny červeně. U cytokinu IL-2 a IL-8 hranici detekce překonal pouze zlomek vzorků.

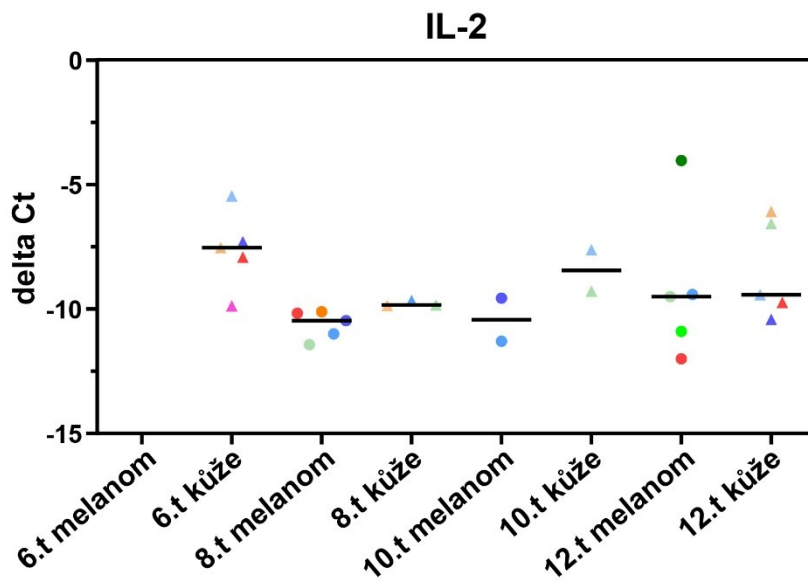
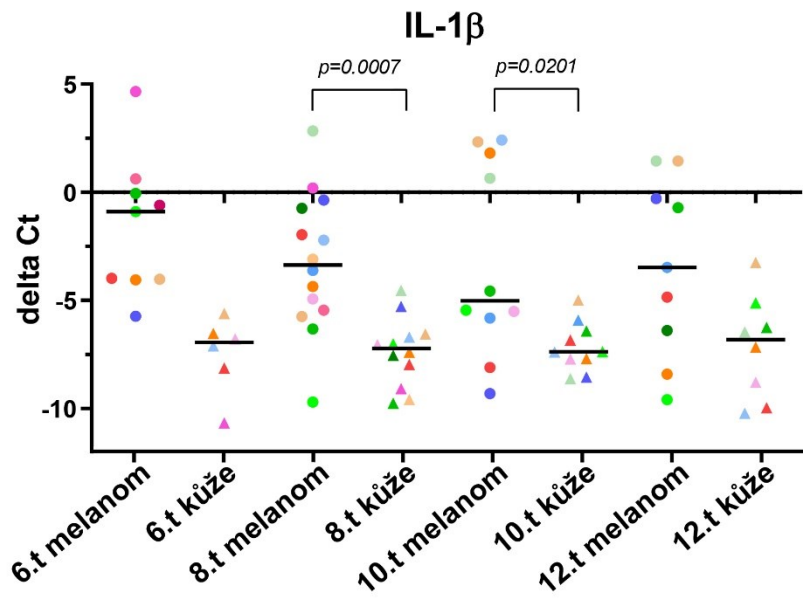
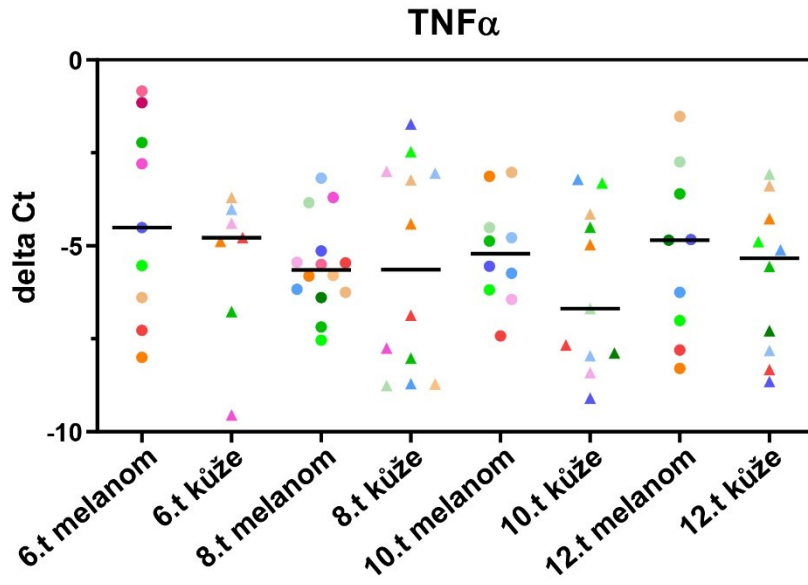


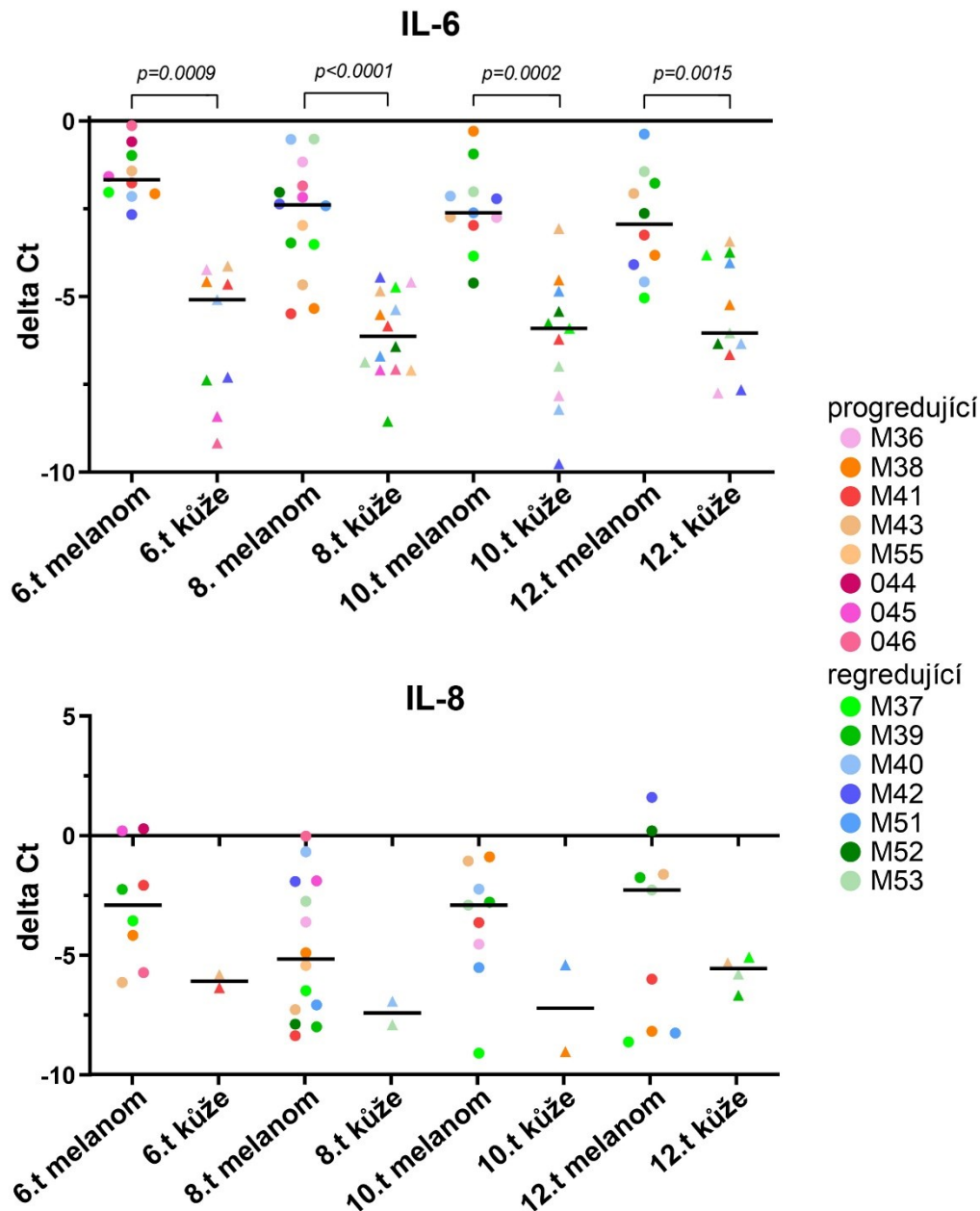


Obr. č. 16: *Heat mapa exprese cytokinů u MeLiM prasat v nádorové tkáni. Grafické znázornění  $\Delta Ct$  hodnot exprese cytokinů a nedetekovatelných hodnot u měřených vzorků. Zeleno-žlutá barva odpovídá expresi cytokinů na úrovni referenčních genů ( $\Delta Ct$  přibližně rovna nule). Nejvíce exprimované cytokiny jsou zobrazeny červenou barvou.*

Získané  $\Delta Ct$  hodnoty z nádorové tkáně a ze zdravé kůže jsme následně navzájem porovnávali s otázkou, zda existuje rozdíl v expresi cytokinů v melanomu oproti okolní kůži. K analýze dat jsme využili GraphPad Prism 8, který nám umožňuje data zároveň analyzovat i graficky zobrazovat. Většina odečtených  $\Delta Ct$  hodnot dosahovala záporných čísel, jak už bylo znázorněno na předchozích heat mapách (obr. č.15 a 16). Tato skutečnost znamená, že exprese mRNA kódující cytokiny je nižší, než mRNA kódující referenční geny. Tento trend je pozorován u obou tkání, tj. zdravé kůže i melanomu.

V naší sadě dat jsme chtěli zjistit, zda se liší exprese (výše hladin mRNA) v melanomu oproti kůži. K tomu jsme využili párový t-test (two-tail). Párový t-test jsme mohli použít, protože melanomová tkáň a tkáň z přiléhající zdravé kůže byli odebrány ze stejného zvířete ve stejném časovém intervalu a vytvořily nám tak dvojici hodnot. Srovnali jsme střední hodnotu mezi vzorky ve všech čtyřech časových intervalech pro každý cytokin (obr. č. 17).





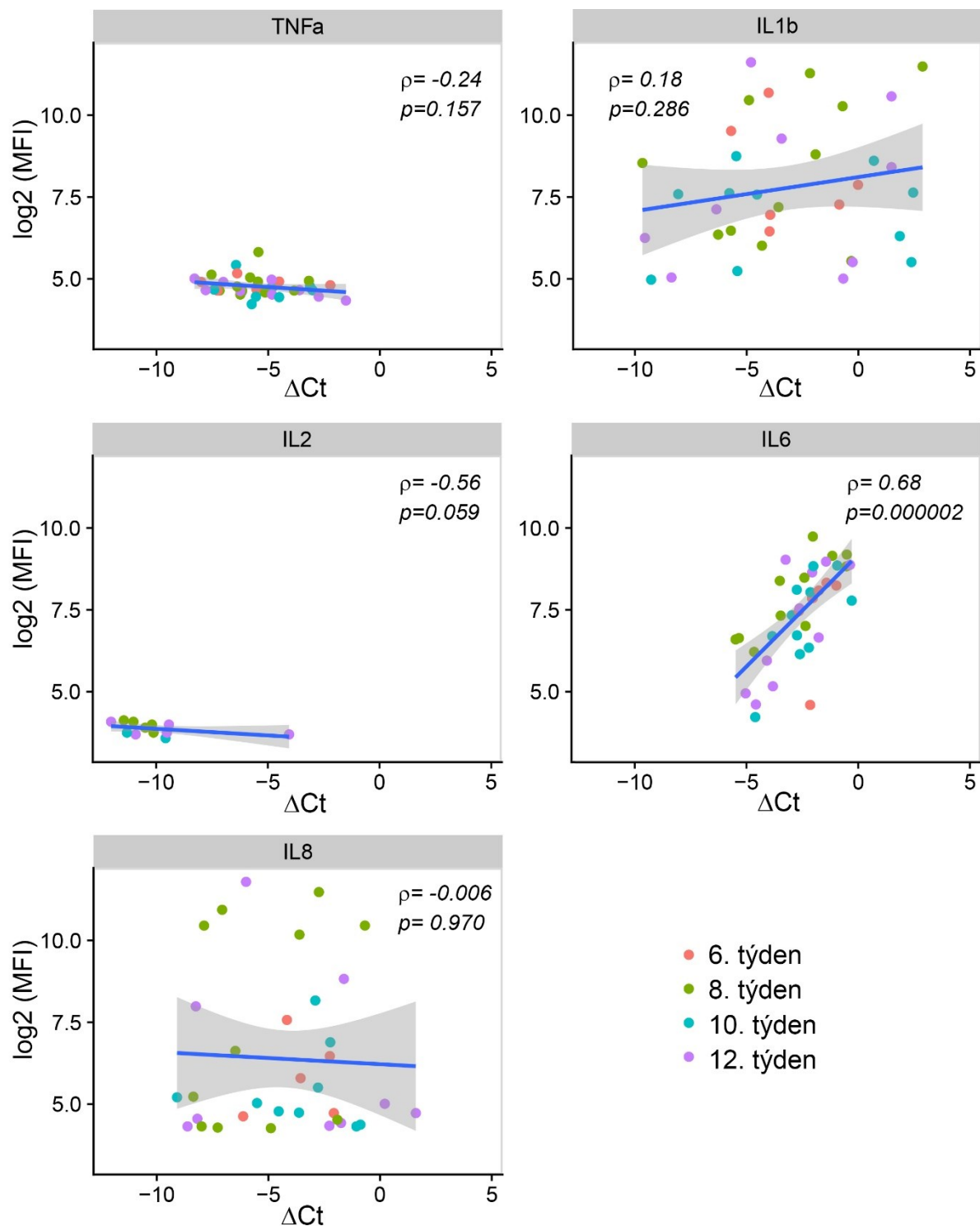
**Obr. č. 17:  $\Delta$ Ct hodnoty exprese cytokinů v melanomu a kůži.** Bodové znázornění  $\Delta$ Ct hodnot u sledovaných cytokinů ( $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$ ,  $IL-6$  a  $IL-8$ ) v melanomové tkáni a sousední zdravé kůži v 6., 8., 10. a 12. týdnu selat. Medián sledované skupiny je označen černou přímkou. Jednotlivá selata jsou znázorněna body s příslušnou barvou. Červená škála barev reprezentuje progredující skupinu selat a modro-zelená škála barev reprezentuje selata s regredujícím fenotypem. P hodnoty z párového t-testu.

U cytokinů  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  a  $IL-8$  byla pozorována zvýšená exprese v melanomu oproti okolní zdravé kůži. U  $IL-6$  byly tyto rozdíly statisticky významné (pomocí párového t-testu) v 6., 8.,

10. i 12. týdnu stáří selat, u IL-1 $\beta$  v 8. a 10. týdnu. U TNF $\alpha$  nebyly pozorovány rozdíly v expresi mezi melanomem a kůží. Toto pozorování odpovídá tomu, že nádorové mikroprostředí, je vysoce imunitně aktivní a je zde nutná syntéza cytokinů, které zajišťují komunikaci s okolím, oproti kůži, kde neprobíhají zánětlivé reakce a je udržovaná homeostáze cytokinů. Na grafu můžeme také vidět, že IL-2 byl detekován jen u malého množství zvířat, a to nezávisle na analyzované tkáni. V hladinách mRNA kódujících sledované cytokiny nebyl pozorován trend mezi progredující a regredující skupinou zvířat.

## 6.6 Korelace exprese mRNA a proteinů v melanomu

V další části mé diplomové práce jsem se snažila zjistit, zda existuje v melanomové tkáni korelace mezi expresí vybraných cytokinů na úrovni mRNA a proteinů. Pro toto porovnání byla vynesena hodnota Ct (odpovídající log<sub>2</sub> koncentraci mRNA kódující cytokin) oproti log<sub>2</sub> hodnotě mediánu intenzity fluorescence (MFI) z Luminex xMAP analýzy (odpovídající množství cytokinu na úrovni proteinu), viz obr. č. 18. Původní data intenzity fluorescence z Luminex analýzy byla použita pro minimalizaci chyb či variability vnesené do analýzy při přepočtu MFI na koncentraci proteinů. Nicméně, vnesení Ct hodnot oproti koncentracím cytokinů v pg/ml poskytuje podobné výsledky (obrázek S2 v příloze). Neparаметrický Spearmanův koeficient pořadové korelace rho spočítaný v programu R vychází vysoce významně pro IL-6, kde byla prokázána vysoká korelace mezi hladinou IL-6 kódující mRNA a proteinu. U IL-1 $\beta$ , IL-8 a TNF $\alpha$  hladina mRNA a proteinu nekorelovala, což naznačuje přítomnost dalších faktorů (např. účinnost translace, stabilita mRNA, regulace sekrece, degradace proteinu apod.) regulujících hladiny těchto proteinů. Toto zjištění je v souladu s mnoha tzv. -omickými (tedy genomickými a proteomickými) studiemi, kde je často nacházen nesoulad mezi intenzitou genové exprese a hladinou proteinu.



**Obr. č. 18: Vztah mezi hladinou mRNA a proteinu u jednotlivých cytokinů v nádorové tkáni.** Expresе cytokinů na úrovni mRNA vyjádřená jako delta Ct hodnoty (tj. Ct normalizační mRNA - Ct studovaná mRNA) detekovaná pomocí qRT-PCR byla porovnána s množstvím cytokinu jako proteinu vyjádřeného jako Log2 mediánu intenzity fluorescence (tj.  $\log_2[\text{MFI}]$ ) detekované pomocí Luminex metody. Míra závislosti mezi hladinou mRNA a proteinu byla studována pomocí Spearmanova korelačního koeficientu rho. U IL-6 byla pozorována silná a statisticky významná pozitivní závislost mezi hladinou mRNA a proteinu. U ostatních sledovaných cytokinů závislost nebyla pozorována.

## 7 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem se zabývala analýzou cytokinů u progredujícího a regredujícího melanomu na modelu MeLiM selat. Stanovovala jsem koncentrace cytokinů v plazmě, vzhledem ke snadné dostupnosti analytu a následně i v nádorové tkáni, abych mohla zhodnotit nádorové mikroprostředí a imunologické procesy, které se zde odehrávají. Mým cílem bylo sledovat hladiny vybraných cytokinů během vývoje onemocnění a identifikovat rozdíly mezi regredujícími a progredujícími skupinami selat, které mohou představovat potenciální prognosticky či terapeuticky zajímavé faktory využitelné v dalším výzkumu.

Jako modelový organismus jsem zvolila MeLiM model a to hlavně proto, že melanom u této linie prasat má podobnou histologii, biochemii a molekulární biologii s lidským nádorem (Vincent-Naulleau et al., 2004). Prase je anatomicky a fyziologicky podobné člověku, nejenom ve velikosti těla a tělesných orgánů, ale také například funkčností imunitního systému (Swindle et al., 2012). Další analogii můžeme pozorovat u lidské a prasečí kůže, je zde strukturální obdoba rozložení kůže a podobnost poměrů mezi tloušťkou epidermis a dermis (Eaglstein & Mertz, 1978). Melanocyty se u prasete vyskytují v epidermis, stejně jako je tomu u člověka. Naproti tomu myši, které jsou často využívány k biomedicínským studiím, vykazují velký rozdíl v tloušťce vrstev kůže a navíc se u těchto zvířat melanocyty nevyskytují v epidermis, ale v dermis (Zomer & Trentin, 2018). Oproti jiným modelovým organismům, MeLiM model vznikl spontánně bez vnějších zásahů, pouze křížením vhodných prasat a následným šlechtěním. Je to další shoda s lidským melanomem, na rozdíl od organismů (např. myši, ryby), kde se používají mutageny nebo transgeneze. Mezi praktické výhody prasat jako modelového organismu lze řadit i jeho velikost a velikost vzniklých nádorů. Kožní melanomy vzniklé u MeLiM selat jsou větší než lidské a myšičí melanomy, díky tomu můžeme odebrat více materiálu, který lze analyzovat, a proto jsme byli schopni využít v naší práci více analýz z nádorové tkáně (histologie, Luminex xMAP a qRT-PCR). Zároveň jsou nádory mnohočetné a je možné uskutečnit pozorování v čase, kdy v každém intervalu lze odebrat jeden kožní melanom. U prasete je možno odebrat i více žilní krve, než je tomu u myši.

MeLiM model má ještě jednu nespornou výhodu, a to je výskyt spontánní regrese melanomu. Jak ukazují dříve publikované studie, ke spontánní regresi melanomu může docházet i u člověka a to především díky vysoké imunogenicitě kožního melanomu (Bodurtha et al., 1976; Cole & Everson, 1956; Kalialis et al., 2008). Částečná regrese se objevuje až u 50 % lidských nádorů, ale úplné vymizení nádorového ložiska bylo zdokumentováno jen u několika desítek nádorů

(Horak et al., 2019). U člověka není možné vznik či průběh regrese sledovat z etických důvodů, protože je melanom při dosažení pozdějších stádií vysoce zhoubný a špatně léčitelný, a proto je ihned po stanovení diagnózy zahájena léčba pacienta (nejčastěji operativní odstranění kožního melanomu). U MeLiM selat dochází k regresi až v 70 % případů bez vnějšího zásahu (Horak et al., 2019).

MeLiM selata jsem sledovala od 6. týdne staří věku do 12. týdne, vždy ve dvou týdenních intervalech. Toto sledovací období jsem zvolila na základě předchozích studií v naší laboratoři, kdy okolo 10. týdne života selat dochází k zahájení spontánní regrese melanomu (Čížková et al., 2019; Geffrotin et al., 2000). Mým cílem bylo tento začátek regrese zachytit a demonstrovat cytokiny, které se v tomto období exprimují na úrovni proteinů i mRNA a pomoci zmapovat imunitní reakci související s destrukcí a reorganizací nádorové tkáně. Dvoutýdenní interval byl zvolen z důvodu rekonvalescence MeLiM selat po chirurgickém zákroku spojeném s odebráním melanomu a vyhnutí se možného vlivu probíhajícího hojení jizev na imunitní stav zvířete, včetně hladin cytokinů.

V mé studii jsem MeLiM selata neposuzovala na základě pohlaví (poměr samců k samicím byl 9:6). Možný vliv pohlaví na vývoj nádorů byl zanedbán vzhledem k předchozím studiím, kde bylo prokázáno, že výskyt novotvarů u zvířat a i pozdější nástup spontánní regrese není závislý na pohlaví (Borovanský, 1978; Fortýn et al., 1994b).

Zaměřila jsem se proto na rozdělení prasat na základě vývoje nádorového onemocnění, zda dochází k progresi melanomu nebo jeho regresi. Do kategorie progredujících selat byla jednoznačně zařazena selata, která podlehla progresi nádoru (4 z 15 selat; 26.7 %) a dále pak selata, která stagnovala ve váhovém přírůstku a měla projevy mikrocytární hypochromní anémie s kachexií. Oproti tomu do skupiny regredujících selat byli zařazeni jedinci s váhovým přírůstkem a dobrou fyzickou kondicí, u kterých nebyly pozorovány anemické projevy v krevním obraze.

Stejně jako v klinické praxi jsme i já použila k zhodnocení stavu MeLiM selat analýzu hematologického profilu. V krevním obraze byl sledován hematokrit, hemoglobin a počet červených krvinek, kde tyto parametry byly u progredující skupiny nižší, oproti MeLiM selatům s regresi nádorů. Tyto nízké hodnoty indikují mikrocytární hypochromní anémii progredujících selat, jak to bylo popsáno už v předchozích studiích naší laboratoře (Čížková et al., 2019). Hlavní roli v těchto dysregulacích představuje železo a jeho metabolismus. Železo je esenciální prvek podporující proliferaci buněk. U nádorových onemocnění byl zaznamenán

jeho vliv na přežití nádorových buněk a reprogramaci nádorového mikroprostředí. Metabolismus a homeostáza železa může být často ovlivňována stresory právě z nádorového prostředí. Vliv byl popsán u IL-6, který indukuje sekreci hepcidinu (regulační hormon železa), jehož úkolem je blokáce uvolňování železa ven z buněk. Dochází tak k zadržování železe uvnitř buněk (např. ve tkáňových makrofázích) a dochází k jeho deficitu na systémové úrovni. Další cytokiny ovlivňující homeostázu železa jsou TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  a IL-10 (Jung et al., 2019; Y. Wang et al., 2018).

Dále u progredujících selat bylo zaznamenáno menší procentuální zastoupení bazofilů. Naopak tomu bylo u počtu krevních destiček, kterých bylo u progredujících selat více. Ovšem počet krevních destiček může být v našem případě zkreslený z důvodu odběru žilní krve do antikoagulačního činidla EDTA, kde může docházet k tvorbě shluků krevních destiček a následně dochází k artefaktům v analýze. K této tvorbě shluků jsou miniprasata náchylná, proto je lepší pro analýzu krevních destiček použít jako antikoagulační činidlo citrát, který trombocyty tolik neshlukuje (Erkens et al., 2017; Lippi & Plebani, 2012). Vzhledem k tomu, že ostatní hematologické parametry, které sledujeme, je lepší analyzovat v EDTA, použila jsem toto antikoagulační činidlo. Velikost selat a jejich zdravotní stav mi nedovolil odebrat dva vzorky žilní krve (2-4 ml s EDTA, 2-4 ml s citrátem), abych krevní destičky mohla analyzovat zvlášť v antikoagulačním činidlu citrát. Odběr většího množství krve by selata i vzhledem k mikrocytární hypochromní anémii ohrožoval na životě.

Jak již bylo dříve zmíněno, pro začlenění selete do progredující kategorie byl rozhodující jeho zhoršující se stav (stagnace růstu, kachexie, zvětšování nádorů) a následný úhyn. Dále byl brán zřetel na hematologický profil společně s pitevním nálezem. Pro další sledování vývoje melanomu by bylo rozumné prodloužit sledovací období o další časové intervaly (14. týden života selat a více), kdy by se rozdíl mezi progredující a regredující skupinou selat mohly ještě dále prohlubovat. Úbytek MeLiM selat s progredujícím vývojem nemoci způsobený úhynem by mi toto srovnání ale znemožnil z důvodu nízkého počtu sledovaných jedinců. Proto jsem se rozhodla ukončit sledování ve 12. týdnu života MeLiM selat, kdy je rozdělení selat dle vývoje onemocnění na progredující a regredující vysoce spolehlivé.

V dalším kroku jsem se rozhodla kvantifikovat koncentrace cytokinů v krevní plazmě a nádorovém homogenátu MeLiM selat. Cytokiny mají u melanomu hned několik velmi významných rolí. Jsou to zprostředkovatelé mezibuněčné komunikace v nádorovém mikroprostředí, kde mohou ovlivňovat proliferaci a migraci buněk (např. IL-6 a IL-8



uvolňované fibroblasty nádorového stromatu podporují migraci a invazivitu melanomových buněk (Jobe et al., 2016)). V klinické praxi mohou mít hladiny cytokinů v krevní plazmě pacientů s melanomem diagnostický či prognostický význam (Alegre et al., 2015; Filitis et al., 2015; Kučera et al., 2019; Matsumoto et al., 2017). Cytokiny IL-2 a IFN- $\alpha$ 2 jsou využívány jako adjuvantní léčba melanomu v klinické medicíně. V neposlední řadě, pozitivní korelace TILs s lepší prognózou onemocnění a úspěchy moderních imunoterapií dokumentují u maligního melanomu, na rozdíl od jiných nádorových onemocnění, velký význam imunitní odpovědi (a cytokinů jako jejich regulátorů) v kontrole vývoje onemocnění.

Prognostika onemocnění je založena zejména na histopatologických kritériích, jako je Breslowova stupnice tloušťky nádorového ložiska, mitotická aktivita buněk a ulcerace nádoru. Zároveň narůstá snaha identifikovat a přenést do klinické praxe molekulární biomarkery, které určí vysoce rizikový melanom již v rané fázi (O. Abbas et al., 2014). U pacientů s kožním melanomem byl jako cirkulující biomarker navržen IL-8, který mimo jiné podle studie Sanmamed a kol. reflektuje stádium kožního melanomu (Sanmamed et al., 2014). Zvýšené hladiny hepatocytárního růstového faktoru (HGF) v krvi mohou predikovat vznik metastáz a rezistenci k terapii (Filitis et al., 2015). V své studii jsem sledovala 13 cytokinů (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 a GM-CSF), kteří mají jak prozánětlivý, tak protizánětlivý charakter s potenciálem ovlivňovat vývoj nádorového onemocnění.

Na systémové úrovni se mi podařilo kvantifikovat všech 13 cytokinů. Významný vliv regrese a progresu na hladinu cytokinů byl pozorován u IL-1RA, IL-4, IL-10 a IL12. Následným post-hoc testem byl potvrzen rozdíl mezi progredující a regredující skupinou pouze u IL-4 ve věku setat 6 týdnů. IL-4 je hlavní cytokin regulující diferenciaci naivních T buněk a jejich polaritu do Th2 buněčné odpovědi, IL-4 by mohl pomocí hyperreakivity imunitního systému bráti dalšímu rozvoji melanomu u regredujících MeLiM setat (Son et al., 2017). Podobné důsledky by mohla mít i zvýšená exprese IL-10, kde IL-10 potlačuje angiogenezi a vznik nových metastáz (Mannino et al., 2015). Nepotvrdilo se naše očekávání zvýšené exprese IL-8, popřípadě IL-6, které byly dříve pozorovány u pacientů. Oba tyto cytokiny jsou označovány za klíčové při invazivitě kožního melanomu a jejich hladiny v krevní plazmě slouží jako prognostický ukazatel (Kolář et al., 2012).

Další dílčí část mé diplomové práce byla zaměřena na kvantifikaci cytokinů v supernatantu z nádorové tkáně, abych získala detailnější přehled o expresi cytokinů přímo ve tkáni. Nejprve

jsem posoudila jednotlivá nádorová ložiska nezávisle na skupině, do které MeLiM sele spadalo (progredující nebo regredující kategorie). Tento přístup jsem zvolila z důvodu rozličnosti melanomů, kde se u jednoho selete mohou vyskytovat různorodé melanomy, např. zároveň nodulární i částečně zploštělé nádory. Ale i u tohoto dělení narážím na heterogenitu samotných tumorů. Stejně tak jako u ostatních typů nádorových onemocnění i melanom se skládá z mnoha buněčných skupin a obsahuje i nenádorové buňky (podpůrné buňky, endoteliální buňky, buňky imunitního systému atd.) (Shannan et al., 2016). Diverzita mezi částmi nádoru proto může být velmi pestrá. Proto ani mé histologické kategorie nemohly být striktně oddělené, vzhledem k tomu, že v mikroskopickém skenu mohou být oblasti spadající do jiné kategorie a sousední kategorie se mohou částečně překrývat. Jasně oddělitelná je kategorie progresu a pokročilá spontánní regrese. Při rozdělení do kategorií byl brán v úvahu obraz v převažující části řezu.

Narozdíl od krevní plazmy jsem v supernatantu nebyla schopna kvantifikovat všech 13 cytokinů. Nekvantifikované cytokiny nebo ty, které jsem kvantifikovala pouze v malém počtu vzorků, jsem vyřadila z dalších analýz, aby nedošlo ke zkreslení výsledků v souvislosti s malým počtem kvantifikovaných hodnot. Mezi vyřazené cytokiny patří TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10 a GM-CSF. U tří z pěti nekvantifikovaných cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-2 a GM-CSF) je nebo v minulosti byla snaha o terapeutické využití v klinické praxi, obecně s cílem podpořit těmito cytokiny imunogenicitu melanomu a aktivovat imunitní systém pacienta. Nepřítomnost nebo sekrece nízkých hladin těchto cytokinů může naznačovat nedostatečnou odpověď imunitního systému na melanom. TNF $\alpha$  je spojován u pacientů s nádorovým onemocněním a kachexií. Ovšem ke zvýšené sekreci dochází spíše na systémové úrovni, kde jsem byla schopna TNF $\alpha$  kvantifikovat, ale ne přímo v nádorové tkáni.

U osmi kvantifikovaných cytokinů (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18) jsem porovnávala rozptylové hodnoty histologických skupin nádorů. Ale mezi jednotlivými histologickými kategoriemi nebyl ani u jednoho cytokinu zaznamenán statisticky významný rozdíl středních hodnot.

Cytokiny jsou malé proteiny zajišťující komunikaci mezi buňkami a ovlivňují nádorové mikroprostředí, působí v nízkých hladinách, lokálně a dochází k jejich rychlé degradaci (Stenzen & Poschenrieder, 2015). Hladiny cytokinů mohou kolísat v závislosti na stresu zvířete i v průběhu samotného dne, dále pak v závislosti na kvalitě a rychlosti zpracování vzorku a délce jeho uchování. Během celé své studie jsem se snažila se vzorky pracovat co nejšetrněji a všechny vzorky odebírat a zpracovávat stejným způsobem po stejnou dobu, abych neovlivnila

kvantifikaci cytokinů. Přesto si musíme uvědomit, že pracujeme s velmi citlivým systémem a propojenou sítí mechanismů, který je velmi senzitivní k jakékoliv dysregulaci a přestože jsem se snažila zachytit co nejreálnější odraz skutečné sekrece jednotlivých cytokinů, nemusela se mi tato skutečnost podařit. Ať už z důvodu degradace sekretovaných cytokinů nebo nezachycení intervalu, kdy k sekreci daného cytokinu dochází, protože nejsou exprimovány kontinuálně ve stejných hladinách.

V další části diplomové práce jsem detekovala cytokiny v nádoru na úrovni kódující mRNA. Celkem jsem takto kvantifikovala 5 cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 a IL-8) a porovnávala jsem jejich expresi v nádorové tkáni s expresí v okolní zdravé kůži. Podle očekávání docházelo ke zvýšené expresi cytokinů v melanomu, oproti zdravé kůži. Konkrétně bylo zvýšení pozorováno u tří cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-8), z toho u IL-6 a IL-1 $\beta$  byl rozdíl v expresi v melanomu oproti kůži statisticky významný. Tento trend odpovídá předpokladu, že v nádorové tkáni je potřeba zajistit komunikaci mezi buňkami a okolním prostředím vzhledem ke zvýšené proliferaci, angiogenezi a imunitní aktivitě, oproti tomu ve zdravé kůži není tato potřeba tak vysoká. U cytokinu TNF $\alpha$  nebyl zaznamenán rozdíl v expresi u jednotlivých tkání a cytokin IL-2 byl detekován pouze v malém počtu vzorků, jak v melanomu, tak ve zdravé kůži. Zvýšená exprese IL-6 v melanomu je v souladu se studií Kolář et al., kde je zdokumentována zvýšená exprese genů kódujících IL-6 a zároveň genů kódujících IL-8 v ko-kultuře fibroblastů s maligními epiteliálními buňkami. V mém pozorování sice nebyl prokázán signifikantní rozdíl u exprese IL-8, ale na grafu (obr. č. 17) můžeme zaznamenat vyšší mediánové hodnoty v melanomu, než ve zdravé kůži. IL-6 a IL-8 byly zhodnoceny jako klíčové cytokiny podporující migraci a invazivitu melanomových buněk, které můžou vést k tvorbě nových metastáz (Jobe et al., 2016; Lacina et al., 2019). Tato pozorování nejsou zatím u MeLiM selat potvrzena, ale tato prvotní studie naznačuje, že by tento trend mohl platit i zde. Pro potvrzení této hypotézy jsou ale potřeba další studie na větším počtu sledovaných MeLiM jedinců. Stejnou odezvu ve formě podpory progresu nádoru a přispění ke vzniku metastáz vyvolává i IL-1 $\beta$ , jehož zvýšená genová exprese byla pozorována v ko-kultuře fibroblastů a maligními melanocyty (Li et al., 2009; Voronov et al., 2003).

Následně jsem se blíže zaměřila na melanomovou tkáň a korelaci mezi expresí cytokinů na úrovni kódující mRNA a proteinů. Vzhledem k časové náročnosti metody qRT-PCR a obecným poznatkům z proteomických studií (Maier et al., 2009) jsem nesrovnávala všech 13 cytokinů kvantifikovaných na úrovni proteinů, ale pouze pět vybraných cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 a IL-8). Prokázala jsem silnou závislost mezi úrovní IL-6 kódující mRNA a proteinu.

Následně jsem podle svých předpokladů neprokázala korelaci u dalších čtyř sledovaných cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 a IL-8), což naznačuje, že syntéza proteinu není ovlivněna pouze množstvím transkribované mRNA, ale mnoha faktory ovlivňujícími translaci proteinů, posttranslační modifikace, degradaci proteinů a další molekulárně-biologické pochody (Griseri, 2014; Rodnina & Wintermeyer, 2016; White et al., 2013).

Původním cílem mé diplomové práce bylo zmapovat expresi cytokinů v průběhu regrese melanomu u MeLiM selat. Tento cíl byl obohacen i o sledování rozdílů v expresi cytokinů mezi progresí a regresí nádoru, protože se během vypracování diplomové práce narodil dostatečný počet MeLiM selat s progredujícím vývojem nemoci, která byla zahrnuta do studie. MeLiM selata s progredujícím kožním melanomem jsou jinak poměrně vzácná (zastoupení v MeLiM linii je pouze 5 – 30 %) (Horak et al., 2019).

## 8 Závěr

V předložené diplomové práci jsem sledovala expresi vybraných cytokinů v krevní plazmě a nádorové tkáni u MeLiM prasečího modelu maligního melanomu a porovnála jsem expresi cytokinů u progredujícího a regredujícího vývoje onemocnění. Došla jsem k těmto závěrům:

- 1) V krevní plazmě jsem prokázala vyšší hladiny IL-4 u regredující skupiny MeLiM selat ve věku 6 týdnů.
- 2) V melanomové tkáni se koncentrace sledovaných cytokinů na úrovni proteinů významně nelišila mezi progredující a regredující tkání.
- 3) V melanomové tkáni MeLiM modelu jsem prokázala zvýšené hladiny mRNA kódující IL-1 $\beta$  a IL-6 oproti okolní zdravé kůži.
- 4) U IL-6 jsem prokázala silnou závislost mezi úrovní mRNA a proteinu. U ostatních sledovaných cytokinů jsem tuto korelaci nezaznamenala.

Nalezené změny v hladinách cytokinů mohou odrážet změny v nádorovém mikroprostředí ovlivňující vývoj a průběh nádorového onemocnění. Vyšší exprese mRNA kódující IL-6 může demonstrovat vysokou migraci a invazivitu nádorových buněk u MeLiM selat. Budoucí studie by se měly více zaměřit na tento biomarker hrající nejspíše jednu z hlavních rolí při rozvoji onemocnění u MeLiM selat. Objasnění molekulárních procesů doprovázejících spontánní regresi melanomu u MeLiM modelu může pomoci odhalit nové klinicky využitelné terapeutické cíle.

## 9 Seznam použité literatury

Abbas, A. K., Trotta, E., Simeonov, D. R., Marson, A., & Bluestone, J. A. (2018). Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Science Immunology*, 3(25).

<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat1482>

Abbas, O., Miller, D. D., & Bhawan, J. (2014). Cutaneous Malignant Melanoma: Update on Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *The American Journal of Dermatopathology*, 36(5), 363–379.

<https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31828a2ec5>

Alegre, E., Sammamed, M., Fernandez-Landazuri, S., Zubiri, L., & Gonzalez, A. (2015). Circulating biomarkers in malignant melanoma. *Advances in Clinical Chemistry*, 69, 47–89.

<https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.12.002>

Antohe, M., Nedelcu, R. I., Nichita, L., Popp, C. G., Cioplea, M., Brinzea, A., Hodoroagea, A., Calinescu, A., Balaban, M., Ion, D. A., Diaconu, C., Bleotu, C., Pirici, D., Zurac, S. A., & Turcu, G. (2019).

Tumor infiltrating lymphocytes: The regulator of melanoma evolution. *Oncology Letters*, 17(5), 4155–4161. <https://doi.org/10/gf6x9t>

Arakawa, T., Yamamura, T., Hattori, T., Hayashi, H., Mori, A., Yoshida, A., Uchida, C., Kitagawa, M., & Onozaki, K. (2008). Contribution of extracellular signal-regulated kinases to the IL-1-induced growth inhibition of human melanoma cells A375. *International Immunopharmacology*, 8(1),

80–89. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.10.013>

Arenas-Ramirez, N., Woytschak, J., & Boyman, O. (2015). Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends in Immunology*, 36(12), 763–777.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.10.003>

Bahceci, M., Gokalp, D., Bahceci, S., Tuzcu, A., Atmaca, S., & Arikan, S. (2007). The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *Journal of Endocrinological Investigation*, 30(3), 210–214.

<https://doi.org/10.1007/bf03347427>

- Balkwill, F. (2006). TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 409. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9005-3>
- Becher, B., Tugues, S., & Greter, M. (2016). GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*, 45(5), 963–973. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>
- Blenman, K. R. M., Wang, J., Cowper, S., & Bosenberg, M. (2019). Pathology of spontaneous and immunotherapy-induced tumor regression in a murine model of melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 32(3), 448–457. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12769>
- Blessing, K., McLAREN, K. M., McLEAN, A., & Davidson, P. (1990). Thin malignant melanomas (< 1.5 mm) with metastasis: a histological study and survival analysis. *Histopathology*, 17(5), 389–395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1990.tb00757.x>
- Bodurtha, A. J., Berkelhammer, J., Kim, Y. H., Laucius, J. F., & Mastrangelo, M. J. (1976). A clinical histologic, and immunologic study of a case of metastatic malignant melanoma undergoing spontaneous remission. *Cancer*, 37(2), 735–742. <https://doi.org/10/cnnkbb>
- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2, Supplement 2), S460–S475. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.108>
- Borovanský, J. (1978). Quantitative parameters of melanomas differentiation. *Neoplasma*, 25(3), 349–352.
- Borovansky, J., Horak, V., Elleder, M., Fortyn, K., Smit, N. P., & Kolb, A. M. (2003). Biochemical characterization of a new melanoma model - the minipig MeLiM strain: *Melanoma Research*, 13(6), 543–548. <https://doi.org/10.1097/00008390-200312000-00001>
- Bourneuf, E. (2017). The MeLiM Minipig: An Original Spontaneous Model to Explore Cutaneous Melanoma Genetic Basis. *Frontiers in Genetics*, 8, 146. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00146>
- Bourneuf, E., Estellé, J., Blin, A., Créchet, F., Schneider, M. del P., Gilbert, H., Brossard, M., Vaysse, A., Lathrop, M., Vincent-Naulleau, S., & Demenais, F. (2018). New susceptibility loci for

- cutaneous melanoma risk and progression revealed using a porcine model. *Oncotarget*, 9(45), 27682–27697. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25455>
- Burke, J. D., & Young, H. A. (2019). IFN- $\gamma$ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Seminars in Immunology*, 43, 101280. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.05.002>
- Cananzi, F. C. M., Dagleish, A., & Mudan, S. (2014). Surgical management of intraabdominal metastases from melanoma: role of the neutrophil to lymphocyte ratio as a potential prognostic factor. *World Journal of Surgery*, 38(6), 1542–1550. <https://doi.org/10/f53std>
- CDKN2A Gene - GeneCards | ARF Protein | ARF Antibody. (n.d.). Retrieved May 7, 2020, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN2A>
- Chin, Y. E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R. A., & Fu, X. Y. (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5328–5337.
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., & Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 30(1), 30–41. <https://doi.org/10/gf6cg7>
- Čížková, J., Erbanová, M., Sochor, J., Jindrová, A., Strnadová, K., & Horák, V. (2019). Relationship between haematological profile and progression or spontaneous regression of melanoma in the Melanoma-bearing Libečov Minipigs. *Veterinary Journal*, 249, 1–9. <https://doi.org/10/gf5khp>
- Cizkova, J., Sinkorova, Z., Strnadova, K., Cervinkova, M., Horak, V., Sinkora, J., Stepanova, K., & Sinkora, M. (2019). The role of  $\alpha\beta$  T-cells in spontaneous regression of melanoma tumors in swine. *Developmental and Comparative Immunology*, 92, 60–68. <https://doi.org/10/gftrbk>
- Cole, W. H., & Everson, T. C. (1956). Spontaneous regression of cancer: preliminary report. *Annals of Surgery*, 144(3), 366–383.
- Crompton, J. G., Gilbert, E., & Brady, M. S. (2019). Clinical implications of the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging. *Journal of Surgical Oncology*, 119(2), 168–174. <https://doi.org/10/gf5kh5>



- Dranoff, G. (2003). GM-CSF-secreting melanoma vaccines. *Oncogene*, 22(20), 3188–3192.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206459>
- Dynek, J. N., Chan, S. M., Liu, J., Zha, J., Fairbrother, W. J., & Vucic, D. (2008). Microphthalmia-associated transcription factor is a critical transcriptional regulator of melanoma inhibitor of apoptosis in melanomas. *Cancer Research*, 68(9), 3124–3132. <https://doi.org/10/df8jk4>
- Eaglstein, W. H., & Mertz, P. M. (1978). New Method for Assessing Epidermal Wound Healing: The Effects of Triamcinolone Acetonide and Polyethelene Film Occlusion. *Journal of Investigative Dermatology*, 71(6), 382–384. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12556814>
- Eggermont, A. M. M., van Geel, A. N., de Wilt, J. H. W., & ten Hagen, T. L. M. (2003). The role of isolated limb perfusion for melanoma confined to the extremities. *Surgical Clinics of North America*, 83(2), 371–384. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(02\)00095-6](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(02)00095-6)
- El-Tahan, R. R., Ghoneim, A. M., & El-Mashad, N. (2016). TNF- $\alpha$  gene polymorphisms and expression. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3197-y>
- Erickson, C., & Driscoll, M. S. (2010). Melanoma epidemic: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 28(3), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.06.021>
- Erkens, T., Sande, L. V. den, Witters, J., Verbraeken, F., Looszova, A., & Feyen, B. (2017). Effect of time and temperature on anticoagulant-dependent pseudothrombocytopenia in Göttingen minipigs. *Veterinary Clinical Pathology*, 46(3), 416–421. <https://doi.org/10.1111/vcp.12509>
- Esmailbeig, M., & Ghaderi, A. (2017). Interleukin-18: a regulator of cancer and autoimmune diseases. *European Cytokine Network*, 28(4), 127–140. <https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0401>
- Everson, T. C. (1964). Spontaneous Regression of Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 114(2), 721–735. <https://doi.org/10/b3mc77>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

- Filitis, D. C., Rauh, J., & Mahalingam, M. (2015). The HGF-cMET signaling pathway in conferring stromal-induced BRAF-inhibitor resistance in melanoma. *Melanoma Research*, *25*(6), 470–478. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000194>
- Fisher, J., & Anderson, J. (2018). Engineering Approaches in Human Gamma Delta T Cells for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01409>
- Florell, S. R., Boucher, K. M., Garibotti, G., Astle, J., Kerber, R., Mineau, G., Wiggins, C., Noyes, R. D., Tsodikov, A., Cannon-Albright, L. A., Zone, J. J., Samlowski, W. E., & Leachman, S. A. (2005). Population-Based Analysis of Prognostic Factors and Survival in Familial Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(28), 7168–7177. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.11.999>
- Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V., Hradecký, J., & Tichý, J. (1994a). [Melanoblastoma in laboratory minipigs: a model for studying human malignant melanoma]. *Veterinarni Medicina*, *39*(10), 597–604.
- Fortýn, K., Hruban, V., Horák, V., Hradecký, J., & Tichý, J. (1994b). [Melanoblastoma in laboratory minipigs: a model for studying human malignant melanoma]. *Veterinarni Medicina*, *39*(10), 597–604.
- Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2002). IFN $\gamma$  sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene*, *21*(15), 2295–2308. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205255>
- Gabellini, C., Gómez-Abenza, E., Ibáñez-Molero, S., Tupone, M. G., Pérez-Oliva, A. B., Oliveira, S. de, Bufalo, D. D., & Mulero, V. (2018). Interleukin 8 mediates bcl-xL-induced enhancement of human melanoma cell dissemination and angiogenesis in a zebrafish xenograft model. *International Journal of Cancer*, *142*(3), 584–596. <https://doi.org/10.1002/ijc.31075>
- Gandalovičová, A., Rosel, D., Fernandes, M., Veselý, P., Heneberg, P., Čermák, V., Petruželka, L., Kumar, S., Sanz-Moreno, V., & Brábek, J. (2017). Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends in Cancer*, *3*(6), 391–406. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.008>

- Gandhi, N. A., Bennett, B. L., Graham, N. M. H., Pirozzi, G., Stahl, N., & Yancopoulos, G. D. (2016). Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(1), 35–50. <https://doi.org/10.1038/nrd4624>
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M. S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., Boyle, P., & Melchi, C. F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European Journal of Cancer*, 41(14), 2040–2059. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.03.034>
- Garbe, C., & Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*, 27(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.09.001>
- Geffrotin, C., Horak, V., Crechet, F., Tricaud, Y., Lethias, C., Vincent-Naulleau, S., & Vielh, P. (2000). Opposite regulation of tenascin-C and tenascin-X in MeLiM swine heritable cutaneous malignant melanoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1524(2), 196–202.
- Goldstein, A. M., Chan, M., Harland, M., Gillanders, E. M., Hayward, N. K., Avril, M.-F., Azizi, E., Bianchi-Scarra, G., Bishop, D. T., Paillerets, B. B., Bruno, W., Calista, D., Albright, L. A. C., Demenais, F., Elder, D. E., Ghiorzo, P., Gruis, N. A., Hansson, J., Hogg, D., ... Consortium (GenoMEL)26, the M. G. (2006). High-risk Melanoma Susceptibility Genes and Pancreatic Cancer, Neural System Tumors, and Uveal Melanoma across GenoMEL. *Cancer Research*, 66(20), 9818–9828. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0494>
- Griseri, P. (2014). Regulation of the mRNA half-life in breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 323. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.323>
- Guo, B., Fu, S., Zhang, J., Liu, B., & Li, Z. (2016). Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep36107>
- Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., & Zhang, Z. (2012). Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38(7), 904–910. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.04.007>

- Ha, H., Debnath, B., & Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*, 7(6), 1543–1588. <https://doi.org/10.7150/thno.15625>
- Haass, N. K., Smalley, K. S. M., Li, L., & Herlyn, M. (2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research*, 18(3), 150–159. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00235.x>
- Hamilton, J. A., & Anderson, G. P. (2004). Mini Review GM-CSF Biology. *Growth Factors*, 22(4), 225–231. <https://doi.org/10.1080/08977190412331279881>
- Hartman, R. I., & Lin, J. Y. (2019). Cutaneous Melanoma-A Review in Detection, Staging, and Management. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 33(1), 25–38. <https://doi.org/10/gf5kh4>
- Hedrich, C. M., & Bream, J. H. (2010). Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunologic Research*, 47(1–3), 185–206. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8150-5>
- Ho, I.-C., & Miaw, S.-C. (2016). Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. In X. Ma (Ed.), *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases* (pp. 31–77). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_3)
- Horák, V., Fortýn, K., Hruban, V., & Klaudy, J. (1999a). Hereditary melanoblastoma in miniature pigs and its successful therapy by devitalization technique. *Cellular and Molecular Biology*, 45(7), 1119–1129.
- Horák, V., Fortýn, K., Hruban, V., & Klaudy, J. (1999b). Hereditary melanoblastoma in miniature pigs and its successful therapy by devitalization technique. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 45(7), 1119–1129.
- Horak, V., Palanova, A., Cizkova, J., Miltrova, V., Vodicka, P., & Kupcova Skalnikova, H. (2019). Melanoma-Bearing Libechov Minipig (MeLiM): The Unique Swine Model of Hereditary Metastatic Melanoma. *Genes*, 10(11), 915. <https://doi.org/10.3390/genes10110915>

- <http://cancerstatisticscenter.cancer.org/>. (2018a, November 8). *American Cancer Society | Cancer Facts & Statistics* [<Http://cancerstatisticscenter.cancer.org/>]. American Cancer Society | Cancer Facts & Statistics. <http://cancerstatisticscenter.cancer.org/>
- <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>. (2018b, November 8). *Melanoma of the Skin - Cancer Stat Facts* [<Https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>].  
<Https://Seer.Cancer.Gov/Statfacts/Html/Melan.Html>.  
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
- Hunter, C. A. (2005). New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature Reviews Immunology*, *5*(7), 521–531. <https://doi.org/10.1038/nri1648>
- Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, *50*(3), 184–195.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H)
- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *13*(2), 95–109.  
[https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(01\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(01)00038-7)
- Ismail, I. H., Davidson, R., Gagné, J.-P., Xu, Z. Z., Poirier, G. G., & Hendzel, M. J. (2014). Germline mutations in BAP1 impair its function in DNA double-strand break repair. *Cancer Research*, *74*(16), 4282–4294. <https://doi.org/10/f6frmb>
- Jiang, T., Zhou, C., & Ren, S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, *5*(6), e1163462. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1163462>
- Jobe, N. P., Rösel, D., Dvořánková, B., Kodet, O., Lacina, L., Mateu, R., Smetana, K., & Brábek, J. (2016). Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochemistry and Cell Biology*, *146*(2), 205–217.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-016-1433-8>
- Jones, L. L., & Vignali, D. A. A. (2011). Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunologic Research*, *51*(1), 5–14. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8209-y>

- Jr, G. P. G., Thomas, C. C., Thompson, T., Watson, M., Massetti, G. M., & Richardson, L. C. (2015). *Vital Signs: Melanoma Incidence and Mortality Trends and Projections — United States, 1982–2030*. *64*(21), 6.
- Jung, M., Mertens, C., Tomat, E., & Brüne, B. (2019). Iron as a Central Player and Promising Target in Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(2), 273. <https://doi.org/10.3390/ijms20020273>
- Kalialis, L. V., Drzewiecki, K. T., Mohammadi, M., Mehlsen, A.-B., & Klyver, H. (2008). Spontaneous regression of metastases from malignant melanoma: a case report. *Melanoma Research*, *18*(4), 279–283. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e328307ee4c>
- Kasahara, T., Hooks, J. J., Dougherty, S. F., & Oppenheim, J. J. (1983). Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *The Journal of Immunology*, *130*(4), 1784–1789.
- Kolář, M., Szabo, P., Dvořánková, B., Lacina, L., Gabius, H.-J., Strnad, H., Sáčková, J., Vlček, C., Plzák, J., Chovanec, M., Cada, Z., Betka, J., Fík, Z., Pačes, J., Kovářová, H., Motlík, J., Jarkovská, K., & Smetana, K. (2012). Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biology of the Cell*, *104*(12), 738–751. <https://doi.org/10.1111/boc.201200018>
- Kučera, J., Strnadová, K., Dvořánková, B., Lacina, L., Krajsová, I., Štork, J., Kovářová, H., Skalníková, H. K., Vodička, P., Motlík, J., Dundr, P., Smetana, K., & Kodet, O. (2019). Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7319>
- Kupcova Skalnikova, H., Vodickova Kepkova, K., & Vodicka, P. (2020). Luminex xMAP Assay to Quantify Cytokines in Cancer Patient Serum. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2108*, 65–88. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0247-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0247-8_6)
- Kwon, B. (2018). IFN- $\gamma$  in tissue-immune homeostasis and antitumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *15*(5), 531–532. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.95>

- Lacina, L., Brabek, J., Kral, V., Kodet, O., & Smetana, K. (2019). Interleukin-6: a molecule with complex biological impact in cancer. *Histology and Histopathology*, *34*(2), 125–136.  
<https://doi.org/10.14670/HH-18-033>
- Lawson, D. H., Lee, S., Zhao, F., Tahrini, A. A., Margolin, K. A., Ernstoff, M. S., Atkins, M. B., Cohen, G. I., Whiteside, T. L., Butterfield, L. H., & Kirkwood, J. M. (2015). Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Yeast-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Versus Peptide Vaccination Versus GM-CSF Plus Peptide Vaccination Versus Placebo in Patients With No Evidence of Disease After Complete Surgical Resection of Locally Advanced and/or Stage IV Melanoma: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group–American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group (E4697). *Journal of Clinical Oncology*, *33*(34), 4066–4076. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.0500>
- Lejeune, F. J. (2002). Clinical use of TNF revisited: improving penetration of anti-cancer agents by increasing vascular permeability. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(4), 433–435.  
<https://doi.org/10.1172/JCI200216493>
- Li, L., Dragulev, B., Zigrino, P., Mauch, C., & Fox, J. W. (2009). The invasive potential of human melanoma cell lines correlates with their ability to alter fibroblast gene expression in vitro and the stromal microenvironment in vivo. *International Journal of Cancer*, *125*(8), 1796–1804. <https://doi.org/10.1002/ijc.24463>
- Lippi, G., & Plebani, M. (2012). EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *50*(8), 1281–1285. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0081>
- Lippitz, B. E., & Harris, R. A. (2016). Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Onc Immunology*, *5*(5), e1093722.  
<https://doi.org/10/f3vhbk>
- Ma, Z., Li, W., Yoshiya, S., Xu, Y., Hata, M., El-Darawish, Y., Markova, T., Yamanishi, K., Yamanishi, H., Tahara, H., Tanaka, Y., & Okamura, H. (2016). Augmentation of Immune Checkpoint Cancer

- Immunotherapy with IL18. *Clinical Cancer Research*, 22(12), 2969–2980.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1655>
- Maier, T., Güell, M., & Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*, 583(24), 3966–3973. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036>
- Maio, M. (2012). Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23 Suppl 8, viii10-14.  
<https://doi.org/10/gbbksq>
- Maker, A. V., Phan, G. Q., Attia, P., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., Haworth, L. R., Levy, C., Kleiner, D., Mavroukakis, S. A., Yellin, M., & Rosenberg, S. A. (2005). Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Annals of Surgical Oncology*, 12(12), 1005–1016. <https://doi.org/10.1245/ASO.2005.03.536>
- Mannino, M. H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R., & Fang, Y. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Letters*, 367(2), 103–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.009>
- Matsumoto, K., Umitsu, M., De Silva, D. M., Roy, A., & Bottaro, D. P. (2017). Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery. *Cancer Science*, 108(3), 296–307.  
<https://doi.org/10.1111/cas.13156>
- Melanoma of the Skin - Cancer Stat Facts*. (n.d.). SEER. Retrieved May 7, 2020, from  
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
- Melanoma Skin Cancer | Understanding Melanoma*. (n.d.). Retrieved May 7, 2020, from  
<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer.html>
- Mrázek, J., Mekadim, C., Kučerová, P., Švejstil, R., Salmonová, H., Vlasáková, J., Tarasová, R., Čížková, J., & Červinková, M. (2019). Melanoma-related changes in skin microbiome. *Folia Microbiologica*, 64(3), 435–442. <https://doi.org/10/gf6x9w>



- Narsale, A. A., & Carson, J. A. (2014). Role of interleukin-6 in cachexia: therapeutic implications. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 8(4), 321–327.  
<https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000091>
- Negrier, S., Escudier, B., Lasset, C., Douillard, J. Y., Savary, J., Chevreau, C., Ravaud, A., Mercatello, A., Peny, J., Mousseau, M., Philip, T., & Tursz, T. (1998). Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Français d'Immunothérapie. *The New England Journal of Medicine*, 338(18), 1272–1278.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199804303381805>
- Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., & Paul, W. E. (1999). THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 701–738.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.701>
- Nishio, S., Yamada, N., Ohyama, H., Yamanegi, K., Nakasho, K., Hata, M., Nakamura, Y., Fukunaga, S., Futani, H., Yoshiya, S., Ueda, H., Taniguchi, M., Okamura, H., & Terada, N. (2008). Enhanced suppression of pulmonary metastasis of malignant melanoma cells by combined administration of  $\alpha$ -galactosylceramide and interleukin-18. *Cancer Science*, 99(1), 113–120.  
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00636.x>
- Osella-Abate, S., Conti, L., Annaratone, L., Senetta, R., Bertero, L., Licciardello, M., Caliendo, V., Picciotto, F., Quaglino, P., Cassoni, P., & Ribero, S. (2019). Phenotypic characterisation of immune cells associated with histological regression in cutaneous melanoma. *Pathology*, 51(5), 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.04.001>
- Paliard, X., Malefijt, R. de W., Yssel, H., Blanchard, D., Chrétien, I., Abrams, J., Vries, J. de, & Spits, H. (1988). Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *The Journal of Immunology*, 141(3), 849–855.
- Patel, H. J., & Patel, B. M. (2017). TNF- $\alpha$  and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications. *Life Sciences*, 170, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.11.033>

- Peveri, P., Walz, A., Dewald, B., & Baggiolini, M. (1988). A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *167*(5), 1547–1559. <https://doi.org/10.1084/jem.167.5.1547>
- Planska, D., Kovalska, J., Cizkova, J., & Horak, V. (2018). Tissue Rebuilding During Spontaneous Regression of Melanoma in the Melanoma-bearing Libechov Minipig. *Anticancer Research*, *38*(8), 4629–4636. <https://doi.org/10/gfp4np>
- Psaty, E. L., Scope, A., Halpern, A. C., & Marghoob, A. A. (2010). Defining the patient at high risk for melanoma. *International Journal of Dermatology*, *49*(4), 362–376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04381.x>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R., & Alaibac, M. (2014). Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, *28*(6), 1005–1011.
- Ribero, S., Moscarella, E., Ferrara, G., Piana, S., Argenziano, G., & Longo, C. (2016). Regression in cutaneous melanoma: a comprehensive review from diagnosis to prognosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, *30*(12), 2030–2037. <https://doi.org/10/f9cz8z>
- Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W. (2016). Protein Elongation, Co-translational Folding and Targeting. *Journal of Molecular Biology*, *428*(10, Part B), 2165–2185. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.022>
- Rohaan, M. W., van den Berg, J. H., Kvistborg, P., & Haanen, J. B. A. G. (2018). Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *6*(1), 102. <https://doi.org/10/gf6x9m>
- Rosenberg, S. A. (2014). IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *The Journal of Immunology*, *192*(12), 5451–5458. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490019>
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C., & Reichert, C. M. (1985). Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer

- Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, 313(23), 1485–1492. <https://doi.org/10.1056/NEJM198512053132327>
- Rossi, M., Pellegrini, C., Cardelli, L., Ciciarelli, V., Di Nardo, L., & Fagnoli, M. C. (2019). Familial Melanoma: Diagnostic and Management Implications. *Dermatology Practical & Conceptual*, 9(1), 10–16. <https://doi.org/10.5826/dpc.0901a03>
- Roy, S., & Trinchieri, G. (2017). Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 17(5), 271–285. <https://doi.org/10/f9tr6q>
- Sanmamed, M. F., Carranza-Rua, O., Alfaro, C., Oñate, C., Martín-Algarra, S., Perez, G., Landazuri, S. F., Gonzalez, A., Gross, S., Rodriguez, I., Muñoz-Calleja, C., Rodríguez-Ruiz, M., Sangro, B., López-Picazo, J. M., Rizzo, M., Mazzolini, G., Pascual, J. I., Andueza, M. P., Perez-Gracia, J. L., & Melero, I. (2014). Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(22), 5697–5707. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3203>
- Satheesha, T. Y., Satyanarayana, D., Prasad, M. N. G., & Dhruve, K. D. (2017). Melanoma Is Skin Deep: A 3D Reconstruction Technique for Computerized Dermoscopic Skin Lesion Classification. *IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine*, 5, 1–17. <https://doi.org/10.1109/JTEHM.2017.2648797>
- Schadendorf, D., Fisher, D. E., Garbe, C., Gershenwald, J. E., Grob, J.-J., Halpern, A., Herlyn, M., Marchetti, M. A., McArthur, G., Ribas, A., Roesch, A., & Hauschild, A. (2015). Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>
- Seder, R. A., Paul, W. E., & Davis, M. M. (n.d.). *The Presence of Interleukin 4 during In Vitro Priming Determines the Lymphokine-producing Potential of CD4 + T Cells from T Cell Receptor Transgenic Mice*. 8.

- Seliger, B., Ruiz-Cabello, F., & Garrido, F. (2008). Chapter 7 IFN Inducibility of Major Histocompatibility Antigens in Tumors. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 101, pp. 249–276). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00407-7](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00407-7)
- Shannan, B., Perego, M., Somasundaram, R., & Herlyn, M. (2016). Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treatment and Research*, *167*, 1–15. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5_1)
- Singh, S, Nannuru, K. C., Sadanandam, A., Varney, M. L., & Singh, R. K. (2009). CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumourigenesis, growth and invasion. *British Journal of Cancer*, *100*(10), 1638–1646. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605055>
- Singh, Seema, Singh, A. P., Sharma, B., Owen, L. B., & Singh, R. K. (2010). CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis. *Future Oncology (London, England)*, *6*(1), 111–116. <https://doi.org/10.2217/fon.09.128>
- Skrombolas, D., & Frelinger, J. G. (2014). Challenges and developing solutions for increasing the benefits of IL-2 treatment in tumor therapy. *Expert Review of Clinical Immunology*, *10*(2), 207–217. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.875856>
- So, K. A., Hong, J. H., Jin, H. M., Kim, J. W., Song, J. Y., Lee, J. K., & Lee, N. W. (2014). The prognostic significance of preoperative leukocytosis in epithelial ovarian carcinoma: A retrospective cohort study. *Gynecologic Oncology*, *132*(3), 551–555. <https://doi.org/10/f2qkkw>
- Soengas, M. S., & Lowe, S. W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, *22*(20), 3138–3151. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206454>
- Son, D. J., Jung, Y. Y., Park, M. H., Lee, H. L., Song, M. J., Yoo, H.-S., Hwang, D. Y., Han, S. B., & Hong, J. T. (2017). Activated Natural Killer Cells Mediate the Suppressive Effect of Interleukin-4 on Tumor Development via STAT6 Activation in an Atopic Condition Melanoma Model. *Neoplasia*, *19*(7), 537–548. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.014>
- Soura, E., Eliades, P. J., Shannon, K., Stratigos, A. J., & Tsao, H. (2016). Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Emerging melanoma cancer complexes and genetic

- counseling. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(3), 411–420; quiz 421–422.  
<https://doi.org/10/f8bc8d>
- Spolski, R., Gromer, D., & Leonard, W. J. (2017). The  $\gamma$ c family of cytokines: fine-tuning signals from IL-2 and IL-21 in the regulation of the immune response. *F1000Research*, 6, 1872.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.12202.1>
- Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., & Enk, A. H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*, 99(7), 2468–2476. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.7.2468>
- Stenzen, J. A., & Poschenrieder, A. J. (2015). Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. *Analytica Chimica Acta*, 853, 95–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.009>
- Sugie, T., Murata-Hirai, K., Iwasaki, M., Morita, C. T., Li, W., Okamura, H., Minato, N., Toi, M., & Tanaka, Y. (2013). Zoledronic acid-induced expansion of  $\gamma\delta$  T cells from early-stage breast cancer patients: effect of IL-18 on helper NK cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(4), 677–687. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1368-4>
- Švejstl, R., Salmonová, H., & Čížková, J. (2018). Analysis of Cutaneous Microbiota of Piglets with Hereditary Melanoma. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 49(4), 285–290.  
<https://doi.org/10/gf6x9x>
- SVOD Report. (n.d.). Retrieved May 27, 2020, from <https://svod.cz/report.php?diag=C43>
- Swindle, M. M., Makin, A., Herron, A. J., Clubb, F. J., & Frazier, K. S. (2012). Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Veterinary Pathology*, 49(2), 344–356.  
<https://doi.org/10.1177/0300985811402846>
- Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., Prévost-Blondel, A., Kato, M., Schultze, J. L., Tartour, E., Kroemer, G., Chaput, N., & Zitvogel, L. (2011). IL-18 Induces PD-1–Dependent Immunosuppression in Cancer. *Cancer Research*, 71(16), 5393–5399. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0993>

- Turner, M. C., Chen, Y., Krewski, D., & Ghadirian, P. (2006). An overview of the association between allergy and cancer. *International Journal of Cancer*, *118*(12), 3124–3132.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.21752>
- Valekova, I., Skalnikova, H. K., Jarkovska, K., Motlik, J., & Kovarova, H. (2015). Multiplex immunoassays for quantification of cytokines, growth factors, and other proteins in stem cell communication. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1212*, 39–63.  
[https://doi.org/10.1007/7651\\_2014\\_94](https://doi.org/10.1007/7651_2014_94)
- Vanamee, É. S., & Faustman, D. L. (2018). Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Science Signaling*, *11*(511). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao4910>
- Varney, M. L., Johansson, S. L., & Singh, R. K. (2006). Distinct Expression of CXCL8 and Its Receptors CXCR1 and CXCR2 and Their Association With Vessel Density and Aggressiveness in Malignant Melanoma. *American Journal of Clinical Pathology*, *125*(2), 209–216.  
<https://doi.org/10.1309/VPL5R3JR7F1D6V03>
- Vignali, D. A. A., & Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, *13*(8), 722–728. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>
- Vincent-Naulleau, S., Le Chalony, C., Leplat, J.-J., Bouet, S., Bailly, C., Spatz, A., Vielh, P., Avril, M.-F., Tricaud, Y., Gruand, J., & others. (2004). Clinical and histopathological characterization of cutaneous melanomas in the melanoblastoma-bearing Libechev minipig model. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *17*(1), 24–35. <https://doi.org/10/bwstz5>
- Vodicka, P., Hlucilova, J., Klima, J., Prochazka, R., Ourednik, J., Ourednik, V., & Motlik, J. (2008). The Minipig as an Animal Model in Biomedical Stem Cell Research. In P. M. Conn (Ed.), *Sourcebook of Models for Biomedical Research* (pp. 241–248). Humana Press.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59745-285-4\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-285-4_27)
- Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2645–2650.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0437939100>
- Vuletić, A., Jovanić, I., Jurišić, V., Milovanović, Z., Nikolić, S., Spurnić, I., & Konjević, G. (2015). Decreased Interferon  $\gamma$  Production in CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>-CD56<sup>+</sup> Lymphocyte Subsets in Metastatic Regional Lymph Nodes of Melanoma Patients. *Pathology & Oncology Research*, 21(4), 1109–1114. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9938-3>
- Wang, C., Wang, M., Tashiro, S., Onodera, S., & Ikejima, T. (2005). IL-1beta acts in synergy with endogenous IL-1beta in A375-S2 human melanoma cell apoptosis through mitochondrial pathway. *Journal of Korean Medical Science*, 20(4), 555–561.  
<https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.4.555>
- Wang, H., & Diepgen, T. L. (2006). Atopic dermatitis and cancer risk. *British Journal of Dermatology*, 154(2), 205–210. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.07077.x>
- Wang, Y., Yu, L., Ding, J., & Chen, Y. (2018). Iron Metabolism in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 95. <https://doi.org/10.3390/ijms20010095>
- Waugh, D. J. J., & Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6735–6741. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>
- Wenzel, J., Bekisch, B., Uerlich, M., Haller, O., Bieber, T., & Tüting, T. (2005). Type I Interferon–Associated Recruitment of Cytotoxic Lymphocytes A Common Mechanism in Regressive Melanocytic Lesions. *American Journal of Clinical Pathology*, 124(1), 37–48.  
<https://doi.org/10/c3vtmn>
- White, E. J. F., Brewer, G., & Wilson, G. M. (2013). Post-transcriptional control of gene expression by AUF1: Mechanisms, physiological targets, and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6–7), 680–688.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.12.002>
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K. H., & Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant

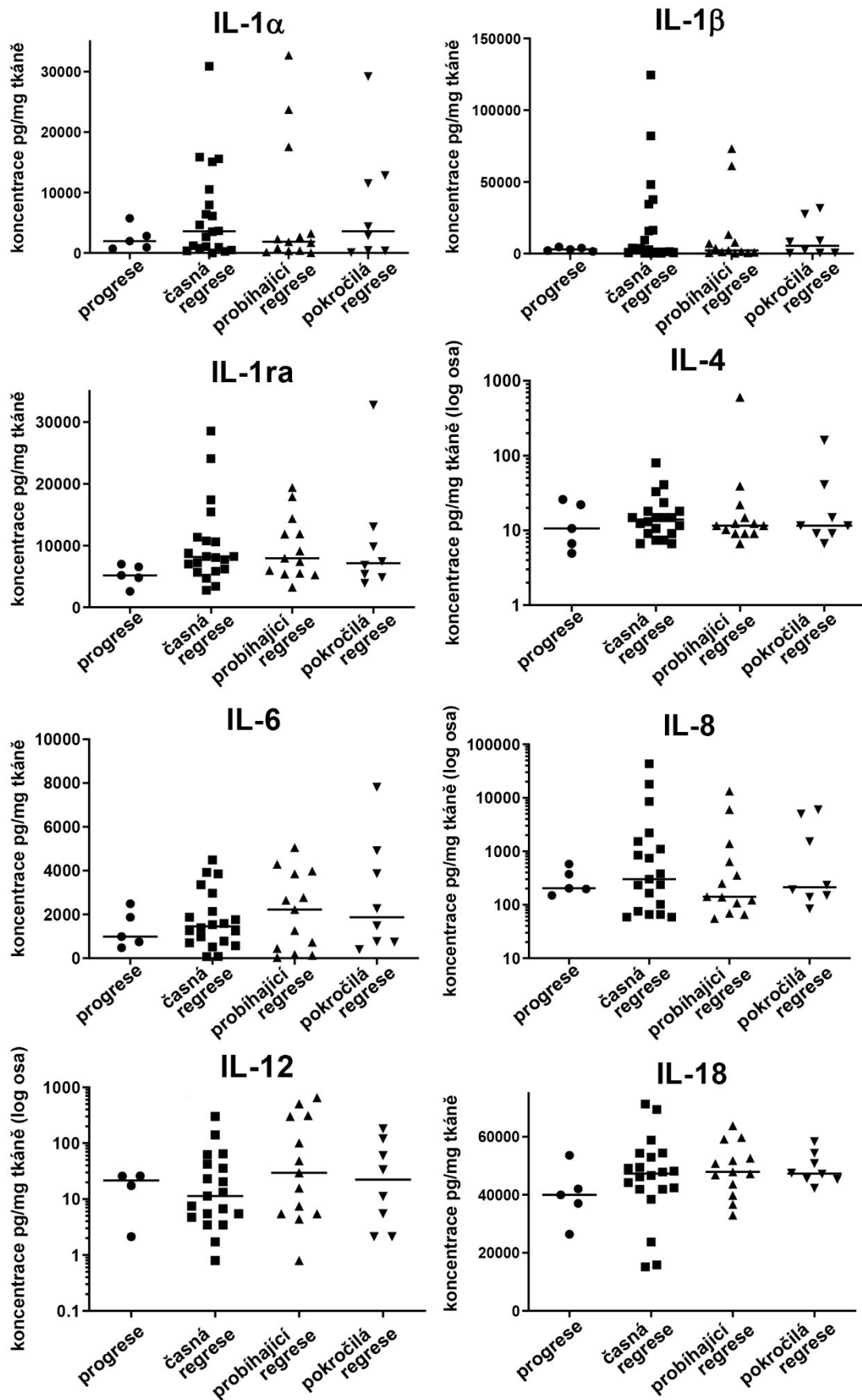
- targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5228), 1281–1284. <https://doi.org/10/df7v6v>
- Wu, S., Singh, S., Varney, M. L., Kindle, S., & Singh, R. K. (2012). Modulation of CXCL-8 expression in human melanoma cells regulates tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *Cancer Medicine*, 1(3), 306–317. <https://doi.org/10.1002/cam4.28>
- Xu, E., Pereira, M. M. A., Karakasilioti, I., Theurich, S., Al-Maarri, M., Rappl, G., Waisman, A., Wunderlich, F. T., & Brünig, J. C. (2017). Temporal and tissue-specific requirements for T-lymphocyte IL-6 signalling in obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms14803>
- Yasuda, K., Nakanishi, K., & Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 649. <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>
- Young, H. L., Rowling, E. J., Bugatti, M., Giurisato, E., Luheshi, N., Arozarena, I., Acosta, J.-C., Kamarashev, J., Frederick, D. T., Cooper, Z. A., Reuben, A., Gil, J., Flaherty, K. T., Wargo, J. A., Vermi, W., Smith, M. P., Wellbrock, C., & Hurlstone, A. (2017). An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *Journal of Experimental Medicine*, 214(6), 1691–1710. <https://doi.org/10.1084/jem.20160855>
- Zhang, W., Borcherdig, N., & Kolb, R. (2020). IL-1 Signaling in Tumor Microenvironment. In A. Birbrair (Ed.), *Tumor Microenvironment: The Role of Interleukins – Part A* (pp. 1–23). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2_1)
- Zomer, H. D., & Trentin, A. G. (2018). Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of Dermatological Science*, 90(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.009>



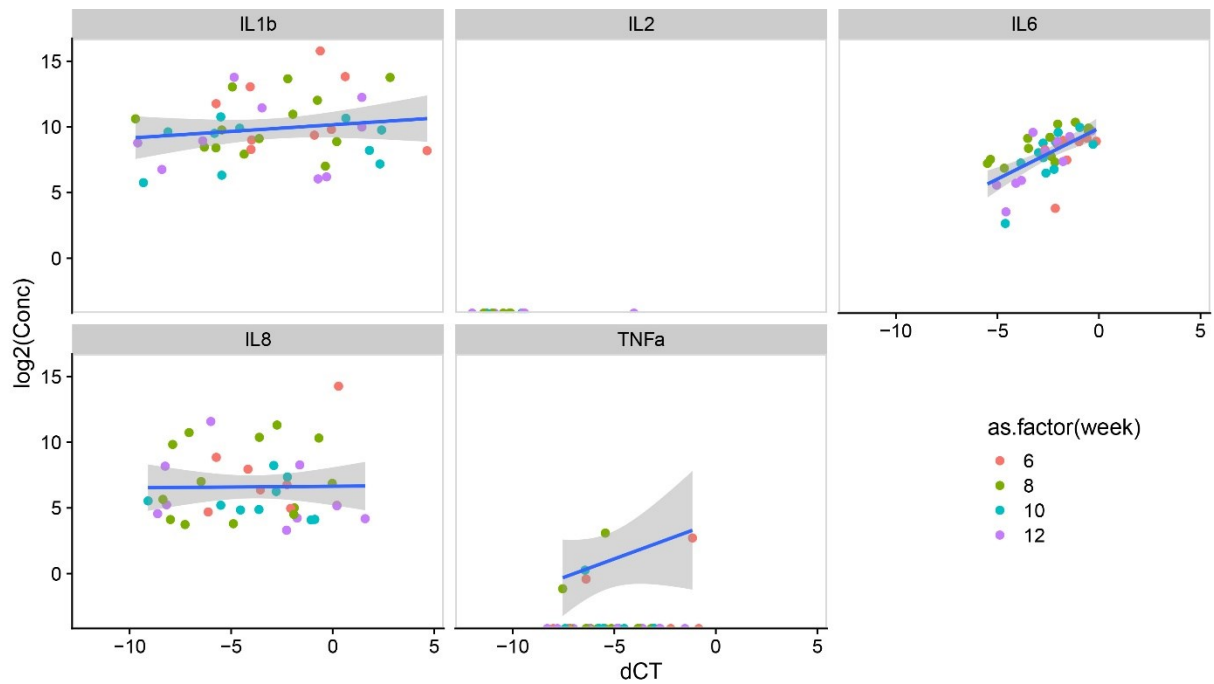
## 10 Přílohy

Seznam příloh:

- 1) Obr. S1: Hladiny cytokinů detekované v supernatantu z nádorové tkáně u MeLiM selat, vztažené na mg tkáně
- 2) Obr. S2: Korelace hladiny mRNA a koncentrace proteinu u jednotlivých cytokinů v nádorové tkáni.
- 3) Seznam publikací autorky



Obr. S1: Hladiny cytokinů detekované v supernatantu z nádorové tkáně u MeLiM selat, vztažené na mg tkáně. Černá přímka zobrazuje medián.



Cytokin	Spearmanův koeficient $\rho$	p
IL-1b	0.14	0.40
IL-2	NA	NA
IL-6	0.67	0.0000008
IL-8	-0.05	0.77
TNFa	-0.10	0.52

**Obr. S2: Korelace hladiny mRNA a koncentrace proteinu u jednotlivých cytokinů v nádorové tkáni.** Na ose x jsou vyneseny delta Ct hodnoty (tj. Ct normalizační mRNA - Ct studovaná mRNA) detekovaná pomocí qRT-PCR, které odpovídají log2 množství mRNA. Na ose y je množství cytokinu na úrovni proteinu vyjádřené jako Log2 koncentrace cytokinu detekované pomocí Luminex metody. Míra závislosti mezi hladinou mRNA a proteinu byla studována pomocí neparametrického Spearmanova korelačního koeficientu rho. U IL-6 byla prokázána silná a statisticky významná pozitivní závislost mezi hladinou mRNA a proteinu. U ostatních sledovaných cytokinů nebyla závislost mezi množstvím RNA a proteinu pozorována. Měřítko a popisky os jsou stejná pro všechny cytokiny.

## Seznam publikací

**Bc. Veronika Miltrová**

Horak, V., Palanova, A., Cizkova, J., Miltrova, V., Vodicka, P., and Kupcova Skalnikova, H. **Melanoma Bearing Libechov Minipig (MeLiM): The Unique Swine Model of Hereditary Metastatic Melanoma.** Genes 2019 Nov 9;10(11). pii: E915. doi: 10.3390/genes10110915

Miltrova, V., and Kupcova Skalnikova, H. **Cytokines in malignant melanoma.** Kapitola v knize, Translational Research in Serious Human Diseases, v tisku. Nakladatelství Academia, Praha.

Miltrova, V. Terciární lymfoidní orgány v zánětlivé reakci. Praha, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.