

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni

Studijní program: Fyziologie a patologická fyziologie (P5113)

Úloha buněčného metabolismu v karcinogenezi
Molekulární patofyziologie chemorezistence karcinomu močového měchýře

The role of cellular metabolism in carcinogenesis
Molecular pathophysiology of bladder cancer chemoresistance

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. Jiří Hatina, CSc.

Plzeň, 2019

Ing. Michaela Kripnerová

Abstrakt

Terapeutická rezistence nádorů představuje závažný klinický problém. Z hlediska klinického průběhu vzniku rezistentního fenotypu rozlišujeme primární rezistenci, kdy nádor vůbec nereaguje na aplikovanou terapii, a rezistenci získanou neboli sekundární, kdy po počáteční klinické odpovědi terapie přestává působit a nádor se stává chemo-, radio- či imunorezistentní. Z hlediska mechanismu terapeutické rezistence můžeme rozlišit buněčně autonomní rezistentní fenotypy od případů rezistence založené na komplexních interakcích v rámci nádorového mikroprostředí. Experimentální modely terapeutické rezistence nádorů vychází často ze vstupního modelu senzitivních nádorových buněčných linií a selekce dceřiné chemo- či radiorezistentní buněčné linie po aplikaci příslušného cytostatika, popř. experimentální radioterapie. V rámci předkládané dizertační práce jsme odvodili dva unikátní modely terapeutické rezistence urotheliálního karcinomu.

První model vychází z námi odvozené buněčné linie BC44 a dceřiné buněčné linie BC44DoxoR, která byla odvozena prolongovanou expozicí mateřské buněčné linie BC44 doxorubicinu. Tato dceřiná chemorezistentní linie vykazuje buněčně autonomní fenotyp mnohočetné lékové rezistence, s rezistencí vůči čtyřem dalším cytostatikům (cisplatina, metotrexát, vinblastin a gemcitabin). BC44DoxoR vykazuje signifikantně nižší proliferativní aktivitu a nižší kapacitu mitochondriálního metabolismu. Ultrastrukturální analýza existenci mitochondriálně cílené autofagie, tzv. mitofagie. Naší hypotézou je, že právě tento mechanismus stojí za komplexním fenotypem BC44DoxoR buněk.

Komplexní procesy v nádorovém mikroprostředí zahrnují zejména interakce vlastních karcinomových buněk s nádorovým stromatem – fibroblasty či imunitními buňkami. Při odvození karcinomové buněčné linie BC44 se díky rozsáhlé infiltraci mezenchymálními buňkami podařilo současně ustanovit také buněčnou linii fibroblastů nazvanou BC44Fibr. Analýza odvozené buněčné linie fibroblastů ukázala diploidní karyotyp a potvrdila fenotyp aktivovaných nádorově asociovaných fibroblastů. Nezávislý buněčný model stromálních buněk byl etablován na základě buněčné linie vycházející z inflamatorního myofibroblastického tumoru močového měchýře. Kokultivace s nádorovými buněčnými liniemi senzitivními vůči určitému léčivu pak poskytla další model komplexní terapeutické rezistence. BC44 v kokultivaci s BC44Fibr tak například získávají specifickou rezistenci vůči cisplatině, která odráží interakci obou typů buněk. Stromální buňky přitom vystupují jako téměř univerzální původce terapeutické rezistence různých karcinomových buněk. Například etablovaná buněčná linie SW780, která je sama o sobě senzitivní k imunomodulační látce TRAIL, ztrácí svoji senzitivitu v kokultivaci s BC44Fibr. I v dalších analýzách vystupují BC44Fibr jako výrazná imunosupresivní nádorová populace. Současně s vývojem terapeutické rezistence dochází k aktivaci fenotypových charakteristik nádorových kmenových buněk, často považovaných za inherentně rezistentní buněčnou subpopulaci. Nádorové buňky, které jsou silně pozitivní na kmenové markery, jsou lokalizované v kontaktní zóně mezi nádorovými a stromálními buňkami. Je tedy evidentní, že stromální buňky výrazně přispívají k udržení kmenového a rezistentního fenotypu v heterogenní populaci nádorových buněk.

Klíčová slova: karcinom močového měchýře, kmenové buňky, mnohočetná léková rezistence, nádorově asociované fibroblasty, terapeutická rezistence

Abstract

Therapeutic resistance of tumours represents an important clinical issue. We can classify the therapeutic tumour resistance in two ways. According to the clinical course, tumours can behave either as primary resistant, i.e. from the very beginning not responsive, or they can display a secondary (also called acquired) resistance, whereby an initial clinical response is lost and the tumour develops into chemo-, radio- or immunoresistant disease. An alternative classification distinguishes cell autonomous resistance mechanisms from resistance that relies on complex interactions within the context of tumour microenvironment. From the research perspective, modelling therapeutic resistance frequently involves experimental treatment of sensitive cancer cells and selection of daughter resistant cell lines. The Ph.D. thesis includes derivation of two unique models of urothelial bladder carcinoma therapeutic resistance.

The first model involves newly established urothelial carcinoma cell lines BC44 and BC44DoxoR, which resulted from a prolonged doxorubicin exposure of the mother cell line. The daughter chemoresistant cell line exhibits multidrug resistant phenotype, which extends beyond the selecting drug - doxorubicin - to four additional chemotherapeutic drugs (cisplatin, methotrexate, vinblastine, and gemcitabine). This cell autonomous multidrug resistant phenotype is associated with a significantly decreased proliferative activity and significantly lower mitochondrial metabolic capacity. Ultrastructurally, the BC44DoxoR cells show structures reminiscent of a special mitochondrial directed autophagic process, mitophagy, and we hypothesize that this could be related to the observed phenotypic changes.

Complex microenvironmental tumour processes involve in particular interactions between the very carcinoma cells and tumour stromal cells, like tumour fibroblasts or immune cells. During the establishment of the BC44 cell line, an extensive infiltration with mesenchymal cells has been noticed, which made us possible to establish, from the very same tumour, at the same time a fibroblastic stromal cell line as well - BC44Fibr. The BC44Fibr cells carry the normal diploid karyotype and they show an activated phenotype compatible with carcinoma-associated fibroblasts. An independent stromal cell model could be established based on bladder inflammatory myofibroblastic tumour cell line. Coculturing with carcinoma cell lines sensitive to certain treatment options yielded models of complex therapeutic resistance. BC44 in coculture with BC44Fibr showed a specific cisplatin resistance in a way that directly reflects interaction of both cell types. Stromal cells behave as quasi universal provider of therapeutic resistance to various sensitive urothelial carcinoma cell lines. As an example, the urothelial carcinoma cell line SW780, which is on its own sensitive to the immunomodulatory drug TRAIL, loses this sensitivity in coculture with BC44Fibr, and the immunosuppressive effects of the latter became evident in various additional analyses. At the same time, stromal cells activated a stem-like phenotype in cocultured carcinoma cells; cancer stem cells are viewed as an inherently resistant tumour cell subpopulation. Importantly, carcinoma cells exhibiting a strong positivity to various cancer stem cell markers localized to an immediate contact zone with stromal cells. Stromal cells are thus able to crucially contribute to preservation of stem-like resistant cells within the heterogeneous cancer cell population.

Keywords: Bladder Cancer, Stem Cells, Multidrug Resistance, Cancer Associated Fibroblast, Therapeutic Resistance

Afiliace:

Tato práce byla podpořena projekty:

- Specifický studijní výzkumný projekt č. 266804/2013, 260050/2014, 260173/2015, 260283/2016 260393/2018-2019 Univerzity Karlovy v Praze
- GAČR (17-17636S)
- Výzkumný fond Univerzity Karlovy (Progres Q-39)
- Národní program udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytované MŠMT ČR
- Projekt č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 "Fighting Infectious Diseases", udělený MŠMT ČR, financovaný z EFRR

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům paní doc. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. a panu doc. Ing. Jiřímu Hatinovi, CSc. za odborné vedení, podporu a příležitost pracovat na zajímavých projektech. Velké poděkování také patří mým spolupracovníkům z Ústavů biologie, fyziologie a fyziky Lékařské fakulty v Plzni, pracovníkům Biomedicínského centra v Plzni a Ing. Martinovi Lebovi z Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni. Závěrem děkuji své rodině, manželovi a přátelům za podporu a trpělivost.

Prohlášení:

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

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

V Plzni,

Jméno Příjmení: Ing. Michaela Kripnerová

Podpis:

Obsah

1	Úvod.....	23
2	Cíle práce	25
3	Popis současného stavu poznání	27
3.1	Histologická a imunochemická charakterizace normálního urotelu.....	27
3.2	Incidence karcinomu močového měchýře	29
3.3	Etiologie vzniku karcinomu močového měchýře	29
3.4	Klinická klasifikace TNM	30
3.5	Léčba karcinomu močového měchýře	31
3.5.1	Systémová chemoterapie u karcinomu močového měchýře.....	32
3.6	Rezistence nádorů	33
3.6.1	Modelování terapeutické rezistence uroteliálního karcinomu v buněčných kulturách.....	34
3.7	Modely buněčných kultur a jejich postavení v biologické analýze uroteliálního karcinomu	35
3.8	Molekulární biologie uroteliální tumorigeneze	37
3.8.1	Molekulární genetiky papilárních tumorů močového měchýře.....	40
3.8.2	Molekulární genetiky invazivních typů tumorů močového měchýře	42
3.9	Mikroprostředí nádoru	44
3.9.1	Základní charakteristiky extracelulárního prostředí nádorů.....	44
3.9.2	Základní charakteristiky buněk nádorového stromatu.....	45
3.9.3	Nádorově asociované fibroblasty	46
3.9.4	Nádorové kmenové buňky.....	49
3.9.5	Komplexní mechanismy chemorezistence ovlivněné mikroprostředím	52
3.9.6	Nádorové kmenové buňky a chemorezistence nádorů	52
3.10	Metabolismus nádorových buněk	53
3.10.1	Metabolismus glukózy, glutaminu a laktátu.....	53
3.10.2	MCT transportéry	55
3.10.3	MCT transportéry v nádorových buňkách.....	56
3.11	Ostatní nádory močového měchýře	58
3.11.1	Inflamatorní myofibroblastický tumor močového měchýře.....	58
4	Materiál a metody	61
4.1	Základní buněčná kultivace	61

4.2	Karyotypická a genomická analýza	64
4.3	Genetická identita buněčných linií	65
4.4	Analýza aktivovaného fenotypu fibroblastů, analýza kmenového fenotypu a vyhodnocení epiteliálně-mezenchymální tranzice u nádorových buněk	65
4.5	Analýza kmenového fenotypu u rodiny buněčných linií RT112 pomocí průtokového cytometru	66
4.6	Analýza imunosupresivního fenotypu pomocí průtokové cytometrie	66
4.7	Vyhodnocení buněčné proliferace PBMC pomocí průtokového cytometru.....	70
4.8	Mikroskopická analýza chemorezistentního fenotypu.....	70
4.9	Transmisní elektronová mikroskopie.....	70
4.10	Kontrakční kolagenový test	71
4.11	Stanovení viability <i>in vitro</i> pomocí hodnocení funkce mitochondrií (MTT)	71
4.12	Analýza chemorezistence v kokultivačním systému stromálních a nádorových buněk	72
4.13	Vyhodnocení buněčné proliferace pomocí xCelligence systému	72
4.14	Fenotypizace povrchových znaků buněčné linie RT112Heidelberg pomocí qPCR.	73
4.15	Analýza morfologie buněk při epiteliálně mezenchymální tranzici	74
4.16	Klonogenita v polotekutém substrátu (1,5% metylcelulóze).....	74
4.17	Detekce apoptózy použitím Annexin V Alexa Fluor® 568.....	75
4.18	Detekce apoptózy pomocí průtokového cytometru	75
4.19	Elisa analýza	75
4.20	Hodnocení intenzity exprese CD90 u stromálních fibroblastů BC44Fibr	76
4.21	Respirometrie pomocí oxygrafu Oroboros	76
4.22	Aktivita citrátsyntázy	77
5	Výsledky výzkumu a diskuse.....	79
5.1	Výsledky vztahující se k cíli 1	79
5.1.1	Základní charakteristika a původ buněčného modelu RT112/RT112D21	79
5.1.2	Základní charakteristika a původ buněčného modelu BC44/BC44DoxoR...	90
5.2	Výsledky a diskuse vztahující se k cíli 2	95
5.2.1	Základní charakteristika a původ BC44Fibr.....	97
5.2.2	Základní charakteristika a původ MBT	115
5.3	Výsledky a diskuse vztahující se k cíli 3	122
5.3.1	Buněčný model BC44 a BC44DoxoR.....	122

5.3.2	Buněčný model BC44 a BC44 + BC44Fibr	124
6	Závěrečné shrnutí.....	127
7	Závěr.....	133
8	Seznam použité literatury.....	135
9	Přehled publikační činnosti.....	157
9.1	Odborné publikace vztahují se k tématu dizertační práce	157
9.2	Ostatní odborné publikace	157
9.3	Prezentace výsledků na odborných setkáních a konferencích	159
10	Přílohy	165

Seznam zkratek

14-3-3 σ	stratifin
2D	dvojměrná kultivace buněk
3D	trojměrná kultivace buněk
67LaR	lamininový receptor
7ACC2	inhibitor MCT
A1, A3, B18,	názvy exprimovaných genů
A2, Aw32, B5	názvy exprimovaných genů
A25, A10, A3	názvy exprimovaných genů
ABC	ATP dependentní transportér (ATP Binding Cassette)
aCGH	metoda komparativní genomické hybridizace
ADM	adrenomedulin
AKT	homolog virového onkogenu v-akt odvozeného od myšního thymonu 1 (V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1)
ALDH1A1/A2	aldehyddehydrogenáza A1/A2 (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1/A2)
ALK	kináza anaplastického lymfomu (Anaplastic Lymphoma Kinase)
AmA	antimycin A
AMF	faktor autokrinní motility (Autocrine Motility Factor)
APAF1	aktivační faktor apoptotické peptididázy 1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1)
APC	gen adematózní polypózy tlustého střeva (Adenomatous Polyposis Coli Protein)
APOBEC3	apolipoprotein (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3G)
ATP	adenosintrifosfát
AR-C155858	inhibitor MCT
ARF	faktor ribozylace (ADP Ribosylation Factor)
ARID1A	gen AT-Rich Interaction Domain 1A
ATIC	formyltransferáza/cyklohydroláza (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase)
AZD3965	inhibitor MCT
B12, Cw3	názvy exprimovaných genů
B12, Cw5	názvy exprimovaných genů
BAD	BCL2 agonista buněčné smrti (BCL2 Associated Agonist of Cell Death)
BAX (BCL-X)	regulátor apoptózy (BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCL-2	lymfom B buněk (B-Cell Lymphoma 2)
BMI1	název genu
BMP4 (1/5)	protein Bone Morphogenetic 4 (1/5)
BPE	extrakt z hovězí hypofýzy (Bovine Pituitary Extract)
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
Bw35, Cw4	názvy exprimovaných genů
C/EPB δ (NF-IL6 β))	protein CCAAT/Enhancer-Binding Protein Δ
CAF	nádorově asociované fibroblasty (Cancer Associate Fibroblasts)
CARS	syntetáza (Cysteinyl-TRNA Synthetase)
CAV -1	kalveolin 1 (Caveolin-1)
CCL39	buněčná linie plicních fibroblastů
CD	adhezivní molekula

CD44	povrchový glykoprotein (Cell-Surface Glycoprotein)
CDH13	cadherin 13
CDK4 (1/2/6)	cyklin dependentní kinázy (Cyclin Dependent Kinase 4 (1/2/6))
CDKN1A (p21 ^{WAF1/CIP1})	cyklin dependentní kinázový inhibitor 1A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A)
CDKN1B (P27)	cyklin dependentní kinázový inhibitor 1B (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B)
CDKN2A (P16 ^{INK4A})	cyklin dependentní kinázový inhibitor 2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, P16, P14)
CEACAM6	marker kmenových buněk
CEBPA/B	gen kódující protein CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
CIS	karcinom <i>in situ</i>
CK	cytokeratiny
CKC	Krebsův cyklus
CLTC	těžký řetězec klatrinu (Clathrin Heavy Chain)
CTNNB1	beta katenin (Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1)
COX2	cyklooxygenáza 2 (Cytochrome C Oxidase Assembly Factor 2)
CpG Metylace	metylace v dinukleotidu cytosin-fosfát-guanin
CSC	nádorové kmenové buňky (Cancer Stem Cell)
CTGF	růstový faktor pojivové tkáně (Connective Tissue Growth Factor)
CYP450	cytochrom P450
DAMP	molekuly účastnící se procesu imunologické smrti (Danger Associated Molecular Pattern)
DBDS	4,4'-dibenzamidostilben-2,2'-disulfonát
DIDS	4,4'-diisothiokyanostilben-2,2'-disulfonát
DMEM	Dulbeccovo modifikované médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Drw2, Dw4	názvy exprimovaných genů
DxScore	diagnostické skóre
E2F	protein asociovaný s retinoblastomem 1 (Retinoblastoma-Associated Protein 1)
E2F3	transkripční faktor 3
E7	protein E7
E-CAD	E-cadherin
EDA	protein ectodysplasin A
EDNRB	receptor endotelinu typ B (Endothelin Receptor Type B)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)
EGFR1/3	receptor epidermálního růstového faktoru 1/3 (Epidermal Growth Factor Receptor 1/3)
ELISA	enzymová imunoanalýza
EMA	epiteliální membránový antigen (Epithelial Membrane Antigen)
ECM	extracelulární matrix
EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice
EndMT	endoteliálně-mezenchymální tranzice
ENG	endoglin
EP300	protein propionyltransferáza (Protein Propionyltransferase P300)

ERBB2/3	tyrosin kinázový receptor (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2/3)
ERK	extracelulární signál regulující kinázy (Extracellular Signal-regulated Kinases)
ESR	estrogenový receptor (Estrogen Receptor)
ETS	maximální možná spotřeba kyslíku
FAP	aktivační protein fibroblastů (Fibroblast Activation Protein)
FASN	syntáza mastných kyselin (Fatty Acid Synthase)
FBS	fetální bovinní sérum (Fetal Bovine Serum)
FC	průtoková cytometrie (Flow Cytometry)
FCCP	trifluorkarbonylkyanid fenyhydrazonu
FGF16	fibroblastový růstový faktor 16 (Fibroblast Growth Factor 16)
FGFR3	receptor fibroblastového růstového faktoru (Fibroblast Growth Factor Receptor 3)
FHIT	gen Fragile Histidine Triad
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FKHR	transkripční faktor Forkhead in Rhabdomyosarcoma
FOXA1	transkripční faktor Forkhead Box A1
FOXO	transkripční faktor Forkhead Box O1
FSP1	specifický protein fibroblastů (Fibroblast-Specific Protein 1)
G1, G2, M, S	fáze buněčného cyklu
GADD45	protein indukovaný zástavou buněčného dělení a poškozením DNA (Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha)
GADPH	glyceraldehyl-3-fosfátdehydrogenáza (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase)
GATA3	GATA3 vázající protein (GATA Binding Protein 3)
GC	polychemoterapeutické schéma - gemcitabin a cisplatina
GFP (eGFP)	zeleně fluoreskující protein
GLUT3	glukózový transportér (Glucose Transporter 3)
GSK2 β	kináza Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
GTP	guanointrifosfát
H ⁺	vodíkové kationty
HEDGEHOG (SHH)	protein Sonic Hedgehog
HFQ	protein HF-I
HGF	hepatocytární růstový faktor (Hepatocyte Growth Factor)
HIF	hypoxií indukovaný transkripční faktor (Hypoxia-Inducible Factor)
HLA	hlavní histokompatibilní systém (Human Leucocyte Antigen)
HMWCK	vysokomolekulární cytokeratin (High Molecular Weight Cytokeratin)
HNRNPA1	heterogenní jaderní ribonukleoprotein A1 (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1)
HRAS	homolog virového onkogenu odvozeného od Harveyho krysího sarkomu (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)
HRP	křenová peroxidáza (Horseradish Peroxidase)
hTERT	katalytická podjednotka telomerázy
CHC	α -kyano-4-hydroxycinnamát (α -cyano-4-hydroxycinnamate)
IC	inhibiční koncentrace
ID4	DNA vazebný inhibitor (Inhibitor of DNA Binding 4, HLH Protein)
IF	imunofluorescence
IGF	inzulínu podobný růstový faktor (Insulin Like Growth Factor)
IGF-BP3	inzulínu podobný růstový faktor vázající protein 3 (Insulin Like Growth Factor

	Binding Protein 3)
IHC	imunohistochemie
IL	interleukiny
IMP3	malý jaderný ribonukleový protein (U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein)
IMT	inflamatorní myofibroblastický tumor
IFN α , IFN γ	interferon alfa, interferon gama
INK4A	cyklin dependentní kinázový inhibitor 4A (Inhibitors of CDK4)
ITS	inzulin-transferin-selen (Insulin-Transferrin-Selenium)
IU	mezinárodní jednotka (International Unit)
JAK/STAT	janus kináza/transportéry a aktivátory signálu transkripce (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription Pathway)
KDM6A	lysin specifická demetyláza (Lysine (K)-Specific Demethylase 6A)
Ki-67	marker proliferace Ki-67
KRAS	homolog virového onkogenu odvozeného od Kirstenova krysího sarkomu (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
K-RAS4B	homolog virového onkogenu odvozeného od Kirstenova krysího sarkomu exon 4B (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog Exon 4B)
KRT5	keratin 5
LDHA/B	laktátdehydrogenáza A/B (Lactate Dehydrogenase A/B)
LEAK	spotřeba kyslíku potřebná pro transport elektronů nutná na kompenzaci úniku protonů přes vnitřní mitochondriální membránu
LG/HG	nízký/vysoký stupeň (Low/High Grade)
LMWCK	nízkomolekulární cyokeratin (Low Molecular Weight Cytokeratin)
LSM 1077	kultivační médium
LUT1	gen Lutein-Deficient 1
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza 1 (Mitogen-activated Protein Kinase 1)
MASPIN	serinproteínázový inhibitor (Serine (Cysteine) Proteinase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 5)
M-CSF	makrofág kolonie stimulující faktor (Macrophage Colony-Stimulating Factor)
MCT	transportér monokarboxylových skupin (Monocarboxylate Transporter)
MDM2	dvouminutový myší homolog (Mouse Double Minute 2 Homolog)
MDR1	protein mnohočetné lekové rezistence 1 (Multidrug Resistance Protein 1)
MEK	mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase)
MEM	kultivační médium (Minimum Essential Medium Eagle)
MIBC	svalově invazivní nádor močového měchýře (Muscle-Invasive Bladder Cancer)
miR	mikroRNA
MLL	akutní myeloidní leukemie (Myeloid/Lymphoid or Mixed-lineage Leukemia)
MMP	matrixmetalopeptidázy (Matrix Metalloproteinases)
MMT	mezenchymálně-mezenchymální tranzice
MSC	mezenchymální kmenové buňky (Mesenchymal Stem Cell)
mTOR	savčí cíl rapamycinu (Mammalian Target of Rapamycin)
MTORC2	komplex savčího cíle rapamycinu (Mtor Complex 2)
MTT	test hodnotící funkce mitochondrií
M-VAC	polychemoterapeutické schéma - metotrexát, vinblastin, adriamycin, cisplatina
MYC (cMYC)	homolog virového onkogenu odvozeného od ptačí myelocytomatózy (Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog)

NADH	nikotinamidadenindinukleotid, redukovaná forma
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid, oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NANOG	transkripční faktor Homeobox Transcription Factor Nanog
NEA	neesenciální aminokyseliny (Non-Essential Amino Acids)
NF-κB	jaderný faktor kappa (Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells)
NG2	neurální/gliální antigen 2 (Neural/Glial Antigen 2)
NHE1	Na/H antiportér I (Sodium-hydrogen Antiporter 1)
NK	buňky "přirození zabíječi" (Natural Killer Cells)
NMIBC	svalově neinvazivní nádor močového měchýře (Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer)
NOS2	NO syntáza (Nitric Oxide Synthase 2)
NOTCH	protein asociovaný s translokací (Translocation-Associated Notch Protein TAN-1)
NPPB	5-nitro-2-(3-fenylpropylamino)-benzoát (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate)
NRAS	homolog virového onkogenu odvozeného od neuroblastomu (Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog)
NSH	gen Nance-Horan Syndrome Protein
OCT4	transkripční faktor Octamer-Binding Transcription Factor 3
OS	celkové přežití (Overall Survival)
ORR	celková léčebná odpověď (Overall Response Rate)
p63	protein 63
PAX6	gen Paired Box 6
PBMC	primární mononukleáry periferní krve
PBS	fosfátový pufr
P-CAD	p-cadherin
PDGF	destičkový růstový faktor (Platelet Derived Growth Factor)
PDGFRβ	receptor destičkového růstového faktoru beta (Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta)
PDGR1	protein p53 and DNA Damage Regulated 1
PD-L1/2	ligand programované buněčné smrti (Programmed Death-ligand 1/2)
pERK	fosforylovaná kináza (Extracellular Regulated MAP Kinase)
PET/CT	pozitronová emisní výpočetní tomografie
PGE2	prostaglandin E2
PH	fázový kontrast
pHPL	destičkový lyzát (Pooled Human Platelet Lysate)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)
PIK3CA	katalytická podjednotka fosfatidylinositol-3-kinázy alfa (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase Catalytic Subunit Alpha)
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)
PMP	pseudosarkomatózní myofibroblastická proliferace
PPAR-γ	peroxisomový proliferační aktivovaný receptor gamma (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)
PTEN	fosfátový a tenzinový homolog (Phosphatase and Tensin Homolog)
PTGS2	gen kódující cyklooxygenázu 2
qPCR	kvantitativní PCR

RAF	serin/threoninová kináza (Raf-1 Proto-oncogene, Serine/Threonine Kinase)
RANBP2	protein RAN Binding Protein 2
RASSF1a	gen rodiny RAS (RAS Association Domain Family Member 1)
RB	s retinoblastomem asociovaný protein (Retinoblastoma-Associated Protein)
RCCL	banka buněčných linií (Resistant Cancer Cell Line Collection)
RHEB	gen RAS Homolog Enriched in Brain
RHOGDI2	gen Rho GDP-Dissociation Inhibitor 2
RNA	ribonukleová kyselina
ROUTINE	fyzilogická spotřeba kyslíku
ROX	zbytková spotřeba kyslíku
RPM	počet otáček za 1 minutu
RPMI	kultivační médium
RTCA	analýza buněk v reálném čase (Real Time Cell Analyzer)
SD	směrodatná odchylka (Standard Deviation)
SDC1	syndecan
SDF-1 α	stromální růstový faktor (Stromal Cell-derived Factor 1)
SFRP1	gen Secreted Frizzled Related Protein 1
SLC16	transportér monokarboxylových skupin (Solute Carrier Family 16 Member 1)
SOX4, SOX2	pohlaví determinující region na chromozomu Y (SRY, Sex Determining Region Y-Box 4/Box2)
SPARC	protein Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich
STAG2	stromální antigen 2 (Stromal Antigen 2)
STAT3	přenašeč a aktivátor signálu transkripce (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)
Ta, T1, T2, T4	klasifikace zhoubných novotvarů -jednotlivá stádia
TAM	nádorově asociované makrofágy (Tumor-associated Macrophages)
TGF- β 1	transformující růstový faktor beta 1 (Transforming Growth Factor Beta 1)
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin (Tricarboxylic Acid Cycle)
TCC	karcinom močového měchýře z přechodných buněk (Transitional Cell (Urothelial) Carcinoma)
TH-1	lidské buňky T Helper
THBS-1 (TSP1)	trombospondin 1
TNF (SR25)	faktor nádorové nekrózy (Tumor Necrosis Factor)
TNF α	faktor nádorové nekrózy alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
TNM	klasifikace zhoubných novotvarů
TP53	gen p53 (Tumor Protein p53)
TPM3	tropomyosin 3
TPM4	tropomyosin 4
TRAIL	cytokin faktorů nádorové nekrózy
TRIM24	transkripční faktor Tripartite Motif Containing 24
TSC1/2	protein Tuberous Sclerosis 1/2
TUR	transuretrální resekcce
TURBT	transuretrální resekcce tumoru močového měchýře
TWIST	transkripční faktor Twist Family Bhlh Transcription Factor 1provided
UPK	uroplakiny
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFC	vaskulární endoteliální růstový faktor C (Vascular Endothelial Growth Factor C)
VIM	vimentin
WNT	signální dráha Wingless/Int-1
WNT2/4	mitogenní faktory (Wingless-type MMTV Integration Site Family Member 2/4)
ZEB1/2 (GLI1)	gen Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1/2
α SMA (γ SMA)	hladkosvalový aktin alfa (Alpha (Gama)-Smooth Muscle Actin)
Ct	hodnota prahu cyklu (Cycle Threshold)
Δ Np63	bazální epiteliální transkripční faktor

1 Úvod

Uroteliální karcinom je typ tumoru, který se vyznačuje výraznou heterogenitou a vysokou mutační a genetickou zátěží. Předpokladem pro zajištění správné a moderní léčby je včasné zjištění nádoru, což i přes jeho relativně častý výskyt nebývá mnohdy možné. Nejvyšší výskyt toho onemocnění je ve vyspělých státech Severní Ameriky a Evropy.

Většina uroteliálních karcinomů vytváří povrchově rostoucí papilární nádory, které sice mohou často recidivovat, ale riziko progresu do invazivního stádia je dosti nízké. Všeobecně se usuzuje, že předpokladem invazivity je epiteliálně-mezenchymální tranzice, při níž epiteliální buňka získává mezenchymální fenotyp spojený s migrační a invazivní schopností. Většina metastatických nádorů má ovšem epiteliální charakter podobný primárnímu nádoru, což se vysvětluje aktivací opačného procesu, tj. mezenchymálně-epiteliální tranzice (MET). Pro růst nádoru na sekundárním místě je rovněž nezbytná kmenovost, tedy schopnost buněk proliferovat asymetrickým způsobem, kdy jedna dceřiná buňka zůstává kmenová a druhá získává schopnost terminálně diferencovat. Tento mechanismus proliferace pak umožňuje udržovat zásobu nediferencovaných buněk a zároveň produkovat buňky nové a diferencované.

Nádor představuje podle současných představ určitý typ komplexní tkáně složené jednak z vlastních karcinomových buněk, tak i ze stromálních buněk a nádorové extracelulární matrix. Při studiu nádorových transformačních a metabolických charakteristik mají nezastupitelný význam nádorové buněčné linie. Prominentním stromálním buněčným typem jsou nádorově asociované fibroblasty (CAF), které se aktivně účastní vnitřní homeostázy nádoru. V dizertační práci je hlavním výchozím modelem unikátní dvojice buněčných linií odvozených z jednoho konkrétního karcinomu močového měchýře, která zahrnuje jak karcinomovou buněčnou linii BC44, tak i stromální buněčnou linii BC44Fibr. Naše výsledky ukazují, že nádorově asociované fibroblasty jsou schopny vytvářet specifické mikroprostředí, tzv. niku, která podporuje kmenový charakter karcinomových buněk močového měchýře. Mimo to také stromální buňky podporují motilitu a schopnost invazivity a modulují metabolické a imunitní odpovědi nádoru. Imunitní buňky vytvářejí selekční tlak na nádorové buňky, a tím zvyšují u přežívajících nádorových buněk terapeutickou rezistenci, což má nepříznivý dopad na podávanou léčbu. V případě pokročilého uroteliálního karcinomu je velkým problémem multiléková rezistence, neboť i při nasazení kombinované chemoterapie se buňky karcinomu stávají rezistentní nejen k chemoterapeutiku podávanému, ale i na mnoho dalších látek, které dosud nebyly pacientovi podávány a jsou součástí jiných léčebných schémat. Výsledkem je pak neúčinnost chemoterapeutik a špatná prognóza pro pacienty. Pro zkoumání mechanismů multilékové chemorezistence *in vitro* byla použita progresivní série nádorových buněčných linií BC44 a BC44DoxoR, které patří k prvním popsaným modelům takovéto rezistence u karcinomu močového měchýře vůbec.

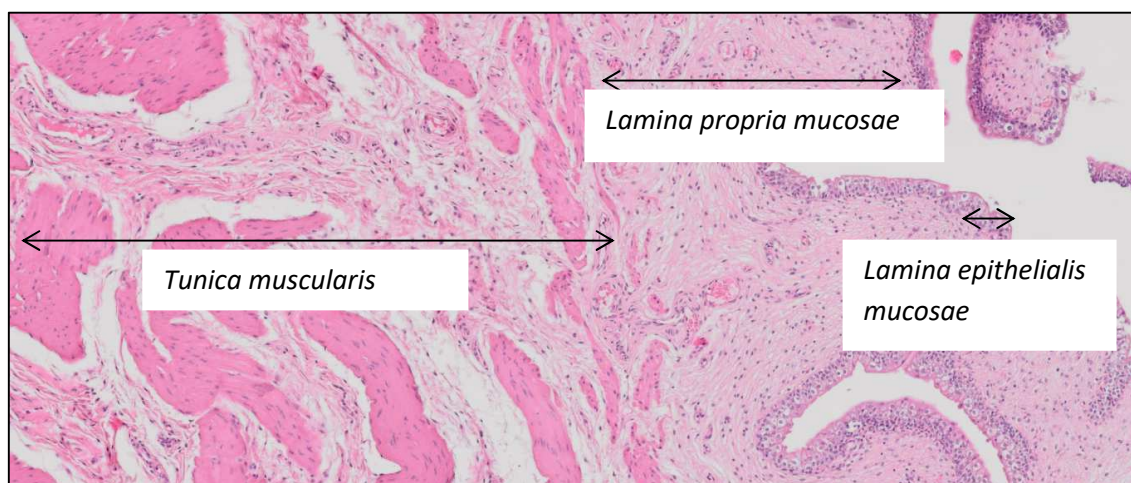
2 Cíle práce

- Blíže charakterizovat stávající etablované modely chemorezistence (RT122/RT112D21) a ustanovit modely nové (BC44DOXOR) pro zkoumání podstaty vzniku mnohočetné lékové rezistence.**
- Odvodit model chemorezistence založený na komplexní patofyziologii nádorového mikroprostředí.**
- Korelovat analyzované modely chemorezistence s intenzitou buněčného metabolismu.**

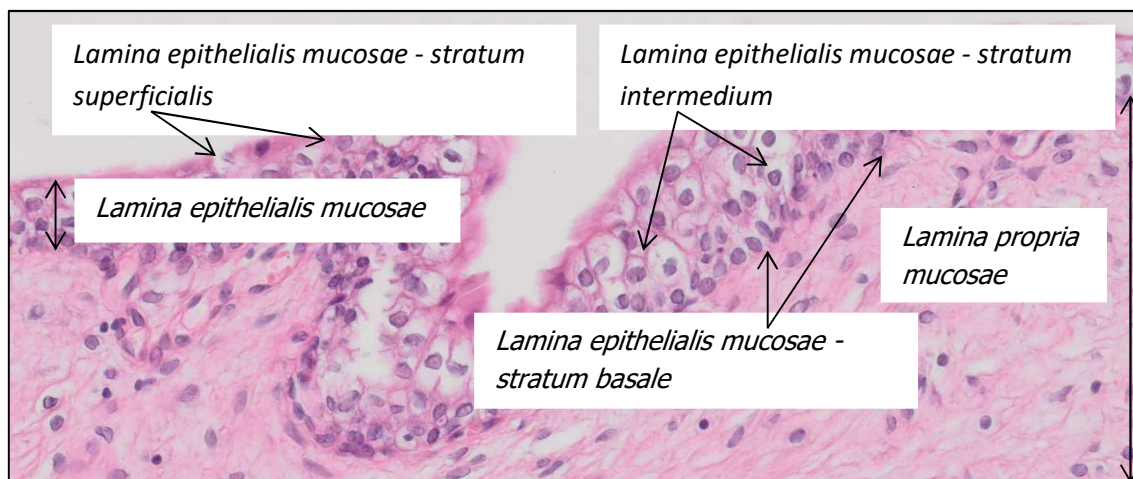
3 Popis současného stavu poznání

3.1 Histologická a imunochemická charakterizace normálního urotelu

Močový měchýř je dutý orgán v malé pánvi, který je tvořen výstelkou a mohutnou vrstvou hladké svaloviny. Normální sliznice prázdného močového měchýře je vystlána pseudostratifikovaným epitelem, jehož hlavním úkolem je poskytnout nepropustnou bariéru mezi močí a krví. Urotel relaxovaného měchýře je 4 – 6vrstevný, zatímco rozepjatý je pouze 2 – 3vrstevný s oploštělými, sníženými epitelii. Povrch pokrývají superficiální buňky s eosinofilní cytoplazmou a větším počtem jader (deštníkové buňky, 50 – 100 µm), které jsou pospojovány četnými desmosomy. Pod vrstvou povrchových buněk se nalézá jedna nebo několik vrstev intermediárních buněk a pod nimi vrstva bazálních buněk, které jsou výrazně menší než deštníkové buňky. Vrstva epitelii je ohraničena bazální membránou, pod kterou se nalézá *lamina propria* tvořená fibrózní tkání a řídkými vlákny hladké svaloviny [1, 2]. Obrázky 1 a 2 ukazují, že mohutnou svalovinu tvoří tři uspořádané vrstvy.

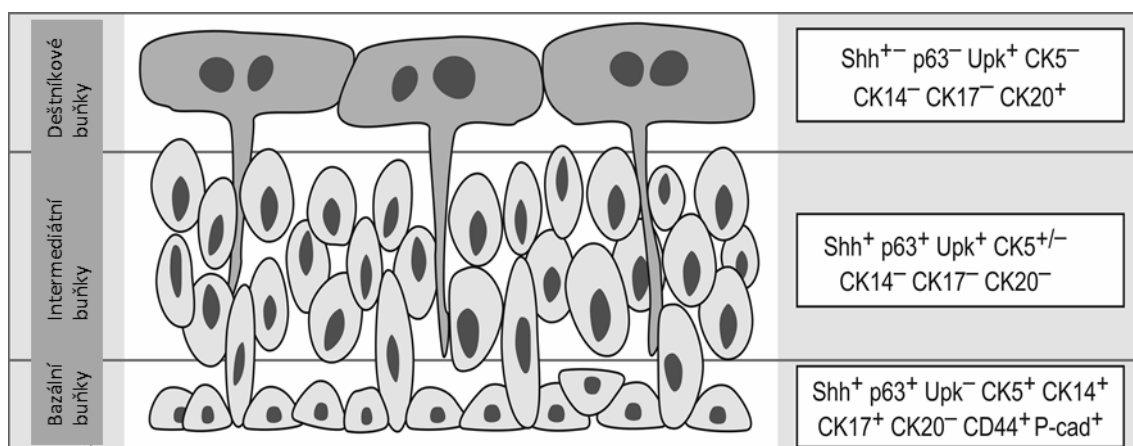


Obrázek 1 – Histologická charakterizace normálního urotelu, zvětšení 4x



Obrázek 2 – Histologická charakterizace normálního urotelu, zvětšení 20x

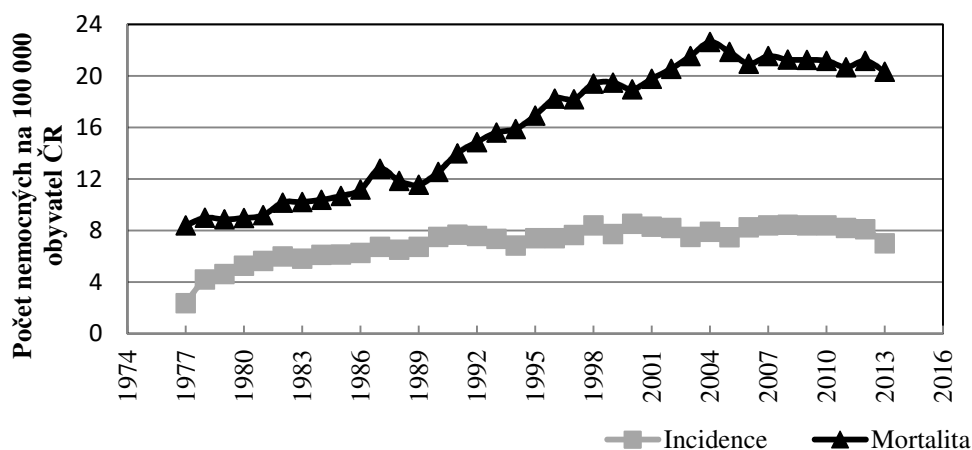
Každý ze tří typů epitelálních buněk má svůj charakteristický biomarker. Nízkomolekulární cytokeratin CK7 (low molecular weight cytokeratin – LMWCK) je nespecificky exprimován ve všech typech buněk urotelu, zatímco vysokomolekulární cytokeratin CK5 (high molecular weight cytokeratin – HMWCK) je nacházen výhradně u bazálních a intermediárních buněk. Naproti tomu pozitivita na cytokeratiny CK20 (LMWCK) je nalézána pouze u deštníkových buněk. Kromě cytokeratinů se buňky močového měchýře liší i v expresi proteinů uroplakinů (deštníkové buňky a intermediární buňky), expresi CD44 u bazálních buněk nebo proteinu p63 (bazální a nepravidelně intermediární buňky). Interpretace exprese nukleárního proteinu lamininového receptoru (67LaR) v normálním urotelu je velmi složitá, protože různé literární zdroje uvádějí různou lokalizaci výskytu. Většina recentních studií však popisuje, že tento protein, který je exprimován během aktivních fází buněčného cyklu a indikuje tedy proliferační aktivitu buňky, se u normálního urotelu objevuje velmi nerovnoměrně a pouze u malého počtu zejména bazálních buněk (< 10 % buněk) [3–6]. Urotel vykazuje při homeostatických podmínkách velmi pomalý buněčný obrat (3 – 6 měsíců), v případě poškození je ale schopen reagovat s rychlou regenerační odpovědí v řádu několika dnů [7].



Obrázek 3 – Stratifikace buněk v normálním urotelu a jejich imunochemická charakterizace [8]

3.2 Incidence karcinomu močového měchýře

Přestože nádory močového měchýře nepatří k nejčastějším nádorům (u mužů je 4. nejčastějším nádorem a u žen 11.), jejich incidence ve vyspělých zemích každoročně narůstá. Ročně je ve světě diagnostikováno kolem 430 000 nových případů a více než $\frac{1}{3}$ pacientů na toto onemocnění umírá. V České republice se výskyt tohoto onemocnění pohybuje okolo 35 případů na 100 000 mužů, resp. 12 na 100 000 žen a odhadované hodnoty incidence Národního onkologického registru ČR pro rok 2020 činí více než 3 000 mužů a žen. Výskyt karcinomu stoupá s věkem, u dětí se s nádory močového měchýře setkáme naštěstí jen velmi zřídka. Přibližně $\frac{2}{3}$ onemocnění se objevují ve věku 65 let a více a i vzhledem k demografickému stárnutí obyvatelstva budou nemocní dále přibývat. Přestože za posledních 30 let došlo téměř až k trojnásobnému nárůstu výskytu, obrázek 4 dokládá, že počet pacientů, kteří onemocnění podlehli, se díky pokrokům v léčbě významně neměnil [9–13].



Obrázek 4 – Vývoj incidence a mortality u karcinomu močového měchýře v České republice [13]

3.3 Etiologie vzniku karcinomu močového měchýře

Jednoznačně nejvýznamnějším etiologickým faktorem vzniku nádoru močového měchýře je kouření cigaret, kdy kuřáci mají zhruba 2 – 4krát vyšší pravděpodobnost vzniku než nekuřáci. Odhaduje se, že 50 % všech nádorů močového měchýře u mužů a 35 % u žen je v přímé souvislosti právě s kouřením s tím, že pravděpodobnost vzniku je v přímé úměře s počtem vykouřených cigaret [14]. Mimo kouření byla prokázána také přímá souvislost mezi profesní expozicí určitým chemickým látkám (aromatické aminy, látky používané v gumárenském, tiskařském a textilním průmyslu, polycyklické aromatické uhlovodíky, látky při výrobě hliníku, asfaltu atd.) a vznikem nádoru. Jednoznačný průkaz kancerogenů je bohužel vzhledem k dlouhé době latence velmi komplikovaný [15]. Dalším významným rizikem pro vznik epidermoidního karcinomu je parazitární infekce *Schistosoma haematobium* (bilharzióza), která vyvolává chronické

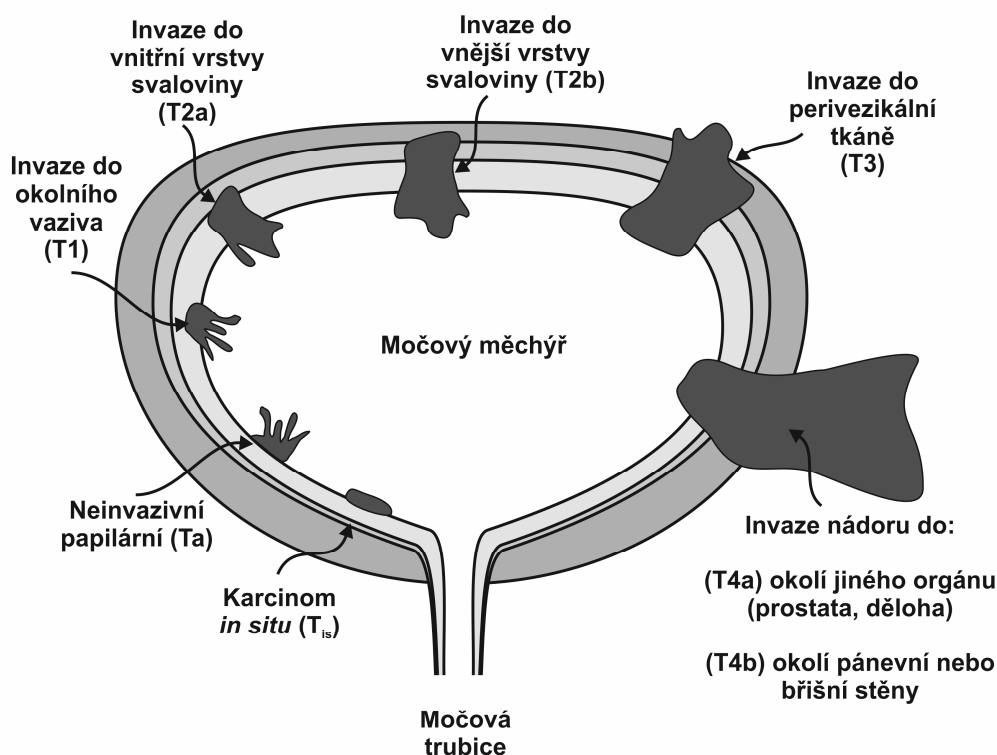
dráždění epitelu s postupnou buněčnou transformací. Tento typ se vyskytuje nejvíce v oblasti severní Afriky a Arabského poloostrova zejména u mladších pacientů mužského pohlaví [16, 17]. Vyšší výskyt invazivního typu karcinomu se často objevuje v anamnéze pacientů s chronickou uroinfekcí, chronickou litiázou, permanentní katetrizací či s inflamatorním myofibroblastickým tumorem močového měchýře [18]. Mimo tyto relativně ovlivnitelné faktory se uplatňují při rozvoji onemocnění zhruba v 10 % také genetické vlivy. Do jisté míry hraje také roli geneticky podmíněná větší vnímavost na některé karcinogeny [14]. Rovněž užívání určitých typů léků (cyklofosamid, analgetika obsahující fenacetin) či dlouhodobá expozice ionizujícímu záření (např. radioterapie v oblasti pánve) může mít negativní efekt na vznik uroteliálního karcinomu [19].

3.4 Klinická klasifikace TNM

Nádory močového měchýře můžeme podle lokálního nálezu dělit do dvou základních skupin, tj. nádory povrchové (75 – 85 % všech nádorů stádia Ta, T1 a karcinom *in situ*) a nádory lokálně pokročilé (T2 – T4). Na obrázku 5, kde je podrobně rozkreslena klasifikace TNM, je papilární neinvazivní tumor močového měchýře ohraničený na sliznici (stadia Ta) a nádor invadující pouze do podslizničního vaziva (stadia T1). Až 80 % těchto nádorů se chová klinicky zcela indolentně (NMIBC – non-muscle-invasive bladder cancer), má obecně dobrou prognózu, ovšem s vysokou tendencí k lokálním recidivám, což si vynucuje soustavné a pravidelné sledování. Nejen že je takový způsob kontroly pro pacienty nepohodlný, ale opakované cystoskopie jsou i poměrně nákladné. 10 – 15 % původně svalově neinvazivního typu nádoru progreduje dále směrem ke svalově invazivním typům (MIBC – muscle-invasive bladder cancer, stadia T2 – T4). V této kategorii nádorů klesá výrazně přežití pacientů úměrně pokročilosti onemocnění a v případě metastatického rozsevu nepřesahuje pětileté přežití 5 % [20–22].

Většina svalově invazivních typů nádorů se však nevyvíjí z progresivních svalově neinvazivních typů, ale jde zcela oddělenou cestou [8]. Oba základní typy nádorů (NMIBC a MIBC) jsou velmi heterogenní a to jak klinicky, histopatologicky tak i molekulárně. Klinické rozdíly se týkají tendence k progresu nádoru a jeho terapeutické odpovědi.

Z histopatologického pohledu tvoří většinu nádorů močového měchýře papilomakarcinomy z přechodného urotelu, přibližně v 5% případech se jedná o spinocelulární karcinom a zcela ojediněle lze na močovém měchýři diagnostikovat adenokarcinom, šupinatý karcinom nebo mikropapilární formu karcinomu močového měchýře. Informaci o prognóze a predikci určuje histopatologický grading (G), kdy se na základě mikroskopického pozorování odebrané tkáně určuje stupeň diferencovanosti nádoru [20, 23]. Posouzení základní biologické heterogenity je možné díky charakterizaci komplexních transkriptomů, kde se ukázalo, že histopatologicky shodné tumory mohou být klasifikovány do subtypů, které se chovají jako odlišné entity onemocnění [8, 24].



Obrázek 5 – Klinická klasifikace TNM u karcinomu močového měchýře [25, 26]

3.5 Léčba karcinomu močového měchýře

Uroteliální karcinom představuje velmi heterogenní skupinu onemocnění se značnými rozdíly v kapacitě k další progresi a tím i v celkové prognóze. Úspěch léčby neinvazivního typu závisí především na biologickém chování nádoru a strategii léčby. Většina povrchových karcinomů (Ta a T1) se řeší transuretrální resekci (TUR) v celkové anestezii. Role transuretrální operační léčby u intraepiteliálních forem (karcinom *in situ*) je spíše diagnostická, protože se předpokládá, že tento typ karcinomu nelze spolehlivě a neinvazivního typu úplně resekovat. Transuretrální resekce může být v indikovaných případech ještě následována adjuvantní intravezikální chemoterapií (mitomycin C, epirubicin, doxorubicin a gemcitabin popř. jejich vhodnou kombinací) nebo intravezikální imunoterapií v podobě BCG vakcíny obsahující mykobakterie (*Mycobacterium bovis* – *bacillus Calmette-Guérin*) nebo interferon alfa (IFN α). Pomocí BCG vakcíny je spuštěna dlouhodobá imunitní reakce ve stěně močového měchýře akumulací imunokompetentních buněk s následnou lokálně zvýšenou koncentrací cytokinů (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL18, IFN γ , TNF α a M-CSF), což cytotoxicky působí na nádorové buňky [25, 26]. I přes častější nežádoucí účinky imunoterapie prokazatelně snižuje počet recidiv a možnost progresu onemocnění ve srovnání s intravezikální chemoterapií a je nejúčinnější léčbou ve stádiu karcinomu *in situ*, kdy dosahuje úplné remise u více než 80 % nemocných [25, 27]. Za perspektivní možnost je považována současná aplikace IFN α a BCG vakcíny, kdy se ukazuje, že interferon potencuje protinádorový účinek vakcíny, což by mohlo přispět nejen ke zvýšení účinnosti imunoterapie jako takové, ale zároveň

k redukci dávky BCG a tím k minimalizaci nežádoucích účinků [28, 29]. Při neúspěšné lokální léčbě pacientů s povrchovým nádorem močového měchýře (nejčastěji typ patologicky klasifikován jako T1G3 nebo karcinom *in situ*) následuje obvykle cystektomie s lymfadenektomií, která je zároveň volbou léčby pro infiltruující nádory močového měchýře. U invazivních nádorů (T2, T3 a T4) může být radikální cystektomie doplněna u mužů o prostatektomii a u žen o hysterektomii a adnexotomii s následnou radioterapií popř. chemoterapií [20, 30, 31]. Cílená terapie se zatím u karcinomu močového měchýře neuplatňuje.

3.5.1 Systémová chemoterapie u karcinomu močového měchýře

Adjuvantní nebo neoadjuvantní systémová chemoterapie bývá obvykle charakteru polychemoterapie. Pro léčbu velmi pokročilého a diseminovaného onemocnění se uplatňují nejčastěji dvě základní polychemoterapeutická schémata, a to MVAC (metotrexát, vinblastin, adriamycin a cisplatina) a GC (gemcitabin a cisplatina). V klinické studii byla demonstrována stejná účinnost obou režimů a méně projevů toxicity při kombinaci GC [31]. Kombinace či monoterapie cytostatik v 2. linii chemoterapie je již značně individuální zahrnující aplikaci gemcitabinu či vinfluninu v monoterapii či např. kombinaci paklitaxelu s cisplatinou [32]. Tabulka 1 shrnuje systémovou chemoterapii u karcinomu močového měchýře.

Tabulka 1 – Systémová chemoterapie u karcinomu močového měchýře [19, 25, 33–35]

Název	Zařazení chemické látky	Mechanismus účinku	Způsob užití
metotrexát	analog kyseliny listové	inhibice biosyntézy nukleových kyselin	systémová chemoterapie
cisplatina	derivát platiny	alkylační cytostatikum (kovaletní vazba na N-7 guanin a adenin)	systémová chemoterapie
vinblastin	rostlinný alkaloid	inhibitor polymerizace tubulinu (brání přechodu G2–M)	systémová chemoterapie
doxorubicin (adriamycin)	antracyklinové antibiotikum	interkalační cytostatikum (chromozomální zlomy)	systémová chemoterapie, intravezikálně
gemcitabin	pyrimidinový analog cytidinu	inhibice biosyntézy nukleových kyselin	systémová chemoterapie, intravezikálně
vinflunin	semisyntetický vinca-alkaloid	inhibitor polymerizace tubulinu (brání přechodu G2–M)	systémová chemoterapie
paklitaxel	rostlinný alkaloid (diterpenoid)	inhibitor depolymerizace tubulinu (brání přechodu G2–M)	systémová chemoterapie
mitomycin C	aminoglykosidové antibiotikum	alkylační cytostatikum	intravezikálně

3.6 Rezistence nádorů

Rezistence nádorových buněk k účinkům cytostatických látek je nejčastější příčinou komplikací a selhání protinádorové léčby. Chemoterapeutická rezistence může být přítomna již na začátku chemoterapie, takže daný nádor je primárně rezistentní a nedochází tak ke klinické odpovědi, nebo se může vyvinout až v průběhu léčby, kdy buď dochází ke snížené klinické odpovědi či ke zdánlivě úplné odpovědi, která je s různě dlouhým časovým odstupem následována relapsem. [36]. Nejčastěji diskutované mechanismy vzniku rezistence jsou [37, 38]:

- snížení příjmu ve vodě rozpustných léčiv
- špatný přísun léčiv z důvodu slabé vaskularizace nádoru či nepropustnosti okolní tkáně
- zvýšená exprese ABC transportérů
- změny intracelulárního či extracelulárního pH (snížení průchodu bazických cytostatik pře plazmatickou membránu)
- změny v metabolismu léčiv, vyšší produkce detoxikačních enzymů
- aktivace mechanismů opravujících poškozenou DNA
- potlačení apoptózy (porušení rovnováhy mezi pro a anti-apoptotickými proteiny, snížení funkce kaspáz a poruchy signálních drah receptorů smrti)
- kvalitativní či kvantitativní změny v cíli (cílovém enzymu), na který je léčivo mířeno (např. topoizomeráza)
- snížení proliferační aktivity
- ochranná bariéra mikroprostředí nádoru (s nádorem asociované fibroblasty, makrofágy)
- zvýšení či oslabení buněčné adheze k extracelulární matrix (proteolytické enzymy jako podpora promigračních a proangiogenních vlastností)
- přechodná změna buněčného fenotypu epiteliálně-mezenchymální přeměnou (zvýšená hladina markerů epiteliálně-mezenchymální tranzice je spojována s větší agresivitou nádorů a s jejich rezistencí k různým protinádorovým látkám)
- protektivní vliv hypoxie v okolí nádoru (stabilizace exprese HIF)
- chemorezistence zprostředkovaná epigenetickými změnami (např. metylace promotoru topoizomerázy, metylace promotorů nádorových supresorů)
- chromozomová nestabilita a vznik chromozomových aberací
- nádorové kmenové buňky jako buňky, které produkují velké množství ABC transportérů, mají dlouhý replikační čas a větší odolnost k poškození DNA – často mají také aktivované antiapoptotické signální dráhy (PI3K/PTEN/AKT/mTOR, JAK/STAT, NF-κB, WNT/β-catenin, Hedgehog a NOTCH)

3.6.1 Modelování terapeutické rezistence uroteliálního karcinomu v buněčných kulturách

Problém chemoterapeutické rezistence nádorů je značně komplexní s velkou škálou možných molekulárních mechanismů. Pro jejich analýzu se s výhodou využívají buněčné kultury, kdy se na mateřskou nádorovou buněčnou linii vyvine selekční tlak prostřednictvím aplikace studovaného cytostatika ve vzrůstající koncentraci a může se tak odvodit chemorezistentní dceřiná linie. Díky této technice se podařilo ustanovit a molekulárně charakterizovat několik modelových systémů u karcinomu močového měchýře, které jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 – Seznam etablovaných rezistentních buněčných linií u karcinomu močového měchýře a možný molekulární mechanismus jejich rezistence [36]

Mateřská buněčná linie	Dceřiná buněčná linie – rezistentní	Rezistence	Molekulární mechanismus rezistence
RT112	RT112 D21	doxorubicin	nadměrná exprese efluxních pump, zejména P-glykoproteinu ABCB1
UM-UC-6	UM-UC-6-dox	doxorubicin	nadměrná exprese efluxních pump a aktivace antiapoptotických signálních drah
T24	T24R1	cisplatina	zvýšená exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2
T24	T24R2	cisplatina	zvýšená exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 a enzymatických systémů na bázi glutathionu
UM-UC-3	UM-UC-3R	gemcitabin	exprese antiapoptotického proteinu clusterinu
RT112	RT112/K1, RT112/K2 a RT112/CP3	cisplatina	zvýšená exprese metalothioneinů
NTUB1	NTUB1/P	cisplatina	zvýšená exprese transkripčního faktoru <i>C/EPBδ (NF-IL6β)</i> ,
T24	T24DDP10	cisplatina	zvýšená exprese receptoru pro inositoltrifosfát
KK47	KK47DDp20	cisplatina	zvýšená exprese receptoru pro inositoltrifosfát
HT1376	HT1376-CisR	cisplatina	zvýšená exprese proteinu adversinu a annexinu
pumc-91	pumc91/ADM	doxorubicin	zvýšená exprese proteinu annexinu

Mateřská buněčná linie	Dceřiná buněčná linie – rezistentní	Rezistence	Molekulární mechanismus rezistence
BFTC-905	BFTC-905-DOXO-II	doxorubicin	aktivace exprese souboru genů kódujících enzymy mevalonátové syntetické dráhy

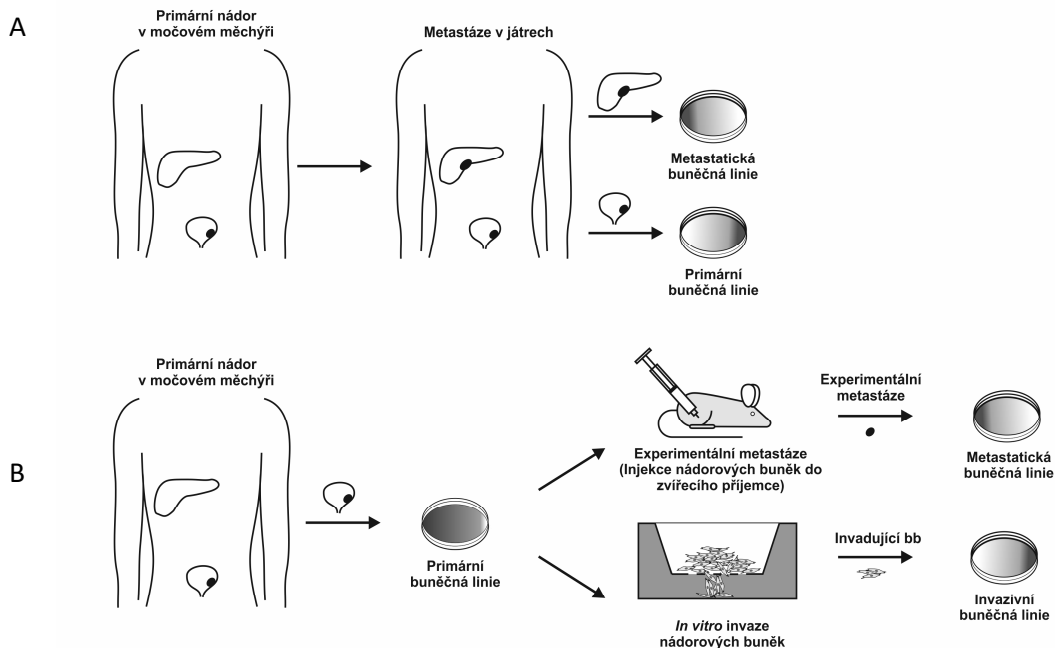
Relativně častý mechanismus rezistence spočívá nadměrné expresi membránového ABC transportéru podkupiny B, konkrétně proteinu ABCB1. Jeho zvýšená exprese se v nádorových buňkách vyvíjí zejména jako specifická substrátová odpověď na vinka alkaloidy, taxany či antracykliny, avšak existují důkazy, že může být přenašeč v buňce upregulován také jako součást stresové odpovědi na další toxické látky (např. gemcitabin či cisplatinu) [39, 40].

Některé z rezistentních buněčných linií vykazují však zároveň tzv. zkříženou rezistenci na celou řadu aplikovaných cytostatik a mohou tak sloužit jako model multilékové rezistence. Nejvýrazněji byla tato vlastnost pozorována u sublinií primárně rezistentních na gemcitabin a cisplatinu, které byly odvozeny od vysoce pokročilého karcinomu močového měchýře. Velmi často se u buněk vyskytovala zkřížená rezistence mezi gemcitabinem a cisplatinou, cisplatinou a karboplatinou, gemcitabinem, docetaxelem, paklitaxelem a larotaxelem [36]. Díky většímu panelu uroteliálních nádorových buněčných linií odvozených primárně jako rezistentní na jedno cytostatikum, avšak vykazující fenotyp zkřížené rezistence, se například podařilo identifikovat některé nové kombinace cytostatik jakožto velmi nadějně kandidáty pro léčbu řady chemorezistentních nádorů. Například se zdá, že vinflunin spolu s vinblastinem by mohly být v těchto situacích velmi účinné. Kromě toho se ukázalo, že u pacientů, kterým nelze z různých důvodů aplikovat cisplatinu, se nabízí alternativní kombinovaná terapie gemcitabinem/oxaliplatinou, která díky odlišnému protinádorovému účinku od ostatních platinových derivátů nevykazovala tak výraznou zkříženou rezistenci [41]. Řada rezistentních buněčných linií je dostupná v registru Resistant Cancer Cell Line Collection (RCCL), kde je možné pro vybranou buněčnou linii získat informace ohledně citlivosti na konkrétní léky v hodnotách IC_{50} (μM). V současné době jsou zde dostupné údaje pro více než 11 typů nádorů včetně karcinomu močového měchýře [42].

3.7 Modely buněčných kultur a jejich postavení v biologické analýze uroteliálního karcinomu

Odvození chemorezistentních buněčných linií představuje jeden ze speciálních příkladů tzv. progresivních sérií buněčných linií. Seznam lidských progresivních buněčných sérií uroteliálních karcinomů je uvedený v tabulce 3. Pro odvození progresivních sérií buněčných linií zaměřených na studium dalších aspektů tumorigeneze lze použít jiné strategie, jako je např. možné z dobře patologicky definovaných nádorů

ustanovit permanentní buněčné linie či odvodit tzv. progresivní nádorové buněčné linie, tedy sérii více klonálně příbuzných buněčných linií, které odrážejí jednotlivá stadia progresu nádorového onemocnění. Jednotlivé strategie odvození progresivních sérií nádorových buněčných linií jsou uvedeny na obrázku 6. Porovnáním genetických a epigenetických změn mezi jednotlivými buněčnými liniemi progresivní série se pak otevírá cesta k pochopení biologie studovaného aspektu nádorové progresu a představuje tak v principu nevyčerpatelný zdroj biologického materiálu příslušného nádoru [36].



Obrázek 6 – Různé strategie odvození progresivních sérií nádorových buněčných linií (A – klinická progresu nádoru umožňuje odvodit nádorovou buněčnou linií jak z primárního nádoru, tak z jeho metastázy, B – koncepčně totožný výsledek umožňuje odvodit experimentální model progresu, např. po xenotransplantaci či *in vitro* selekci progredujících nádorových buněk) [36, 43, 44].

Tabulka 3 – Lidské progresivní buněčné série uroteliálních karcinomů [36]

Název buněčné linie	Doplňkové informace	Zdroj
TCC 97-18-1	etablovaná z primárního tumoru	[45]
TCC 97-21-M	odvozená z biopsie metastatického ložiska	[45]
BFTC-905	málo transformovaná	[46]
BFTC-905-DM	vysoce klonogenní	[46]
T24	jedna z prvních buněčných linií močového měchýře	[47]
T24T	schopná růst v polotekutých substrátech	[48]
T24M	odvozená z biopsie metastatického ložiska	[47]
RT112	doxorubicin senzitivní	[49]
RT112x	celá řada spontánních variant buněčných linií	[49]

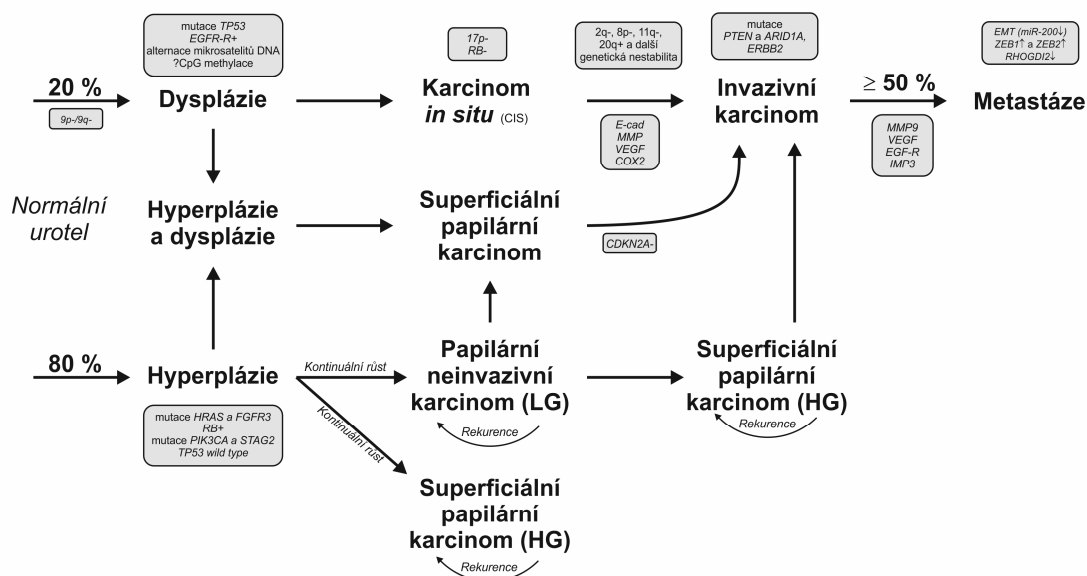
3.8 Molekulární biologie uroteliální tumorigeneze

Karcinogeneze je vícestupňový proces vyznačující se akumulací mnoha molekulárních změn, které pak udělují buňce různé biologické schopnosti např. ztrátu kontroly buněčného cyklu, necitlivost na protirůstové signály, poruchu apoptózy, genetickou nestabilitu, neomezený replikační potenciál či schopnost invaze [50].

Uroteliální nádory mohou vznikat na základě dvou samostatných a z větší části nezávislých molekulárních drah (tzv. Dual Track Concept). Papilární nádory předchází hyperplazie urotelu, zatímco svalově invazivní nádory se vyvíjí většinou z dysplastických lézí, které následně přecházejí v karcinom *in situ*. Přibližně u 15% případů se mohou tyto dráhy zkřížit, což se pak následně odráží v progresi povrchového papilárního nádoru směrem k vysoce invazivnímu fenotypu [51]. Z obrázku 7 je patrné, že molekulární biologie obou typů nádorů je také značně odlišná. Podobně jako je tomu u karcinomu prsu lze i svalově invazivní karcinomy močového měchýře ještě rozdělit na více tzv. molekulárních subtypů (bazální MIBC, luminální MIBC, „p53-like“, aj.), které se vyznačují typickým a specifickým expresním genovým profilem. Pacienti, jejichž tumory vykazují pozitivní expresi na keratiny CK5 a CK14, kmenové markery (CD44), MYC, bazální epiteliální transkripční faktor $\Delta Np63\alpha$ či proteiny zapojené v procesu epiteliálně-mezenchymální tranzice, měli horší prognózu s kratší dobou celkového přežití. Tyto bazální typy nádorů jsou podstatně agresivnější a u pacientů, u nichž nebyla nasazena neoadjuvantní chemoterapie, měl nádor tendenci k rychlejší progresi. U luminálních nádorů karcinomu prsu i karcinomu močového měchýře hrají klíčovou roli zejména dva transkripční faktory, ESR a TRIM24. Kromě toho významná část luminálních nádorů vyazuje také mutaci v genech *FGFR3*, *ERBB2* či *ERBB3*. Jeden z dalších podtypů nádorů – „p53-like“ je charakterizovaný vysokou infiltrací stromálních buněk, zejména nádorově asociovaných fibroblastů. Tyto nádory obohacené o extracelulární matrix produkovanou nádorovým stromatem vykazovaly velmi slabou expresi genů, které podporují postup buněk do pozdních fází buněčného cyklu a měly tendenci být chemorezistentní [52]. Tabulka 4 shrnuje základní exprimované markery u molekulárních subtypů svalově invazivních nádorů močového měchýře.

Tabulka 4 – Expres markerů u molekulárních subtypů svalově invazivních nádorů močového měchýře [8]

Bazální typ			Luminální typ	
CD44	EGFR	CK6B	CK20	FGFR3
P-cadherin	CK14	CK6C	CD24	PPAR- γ
CK5	CK6A	CK16	FOXA1	GATA3



Obrázek 7 – Současný model vývoje a progresu různých typů uroteliálního karcinomu a klíčových genů mutovaných v jednotlivých stádiích [8, 53–57]

Strukturální chromozomální aberace

Strukturální chromozomální aberace představují změny v počtu kopií různých genetických regionů a u uroteliálních nádorů se objevují relativně často. Nejhojněji pozorované chromozomální aberace byly identifikovány na chromozomech 1, 5 (amplifikace 5p12), 6 (amplifikace 6p22 – *SOX4*, *ID4*, *E2F* aj.), 7 (amplifikace 7p12 – *EGFR1*, amplifikace 7q11 – *EGFR2*), 8 (ztráta p raménka, zisk q raménka, amplifikace regionu 8p12), 9 (delece 9p21 – *INK4A/ARF*, 9q22, 9q32-33, 9q34), 10, 11 (amplifikace 11q13 – gen pro cyklin D1), 12 (amplifikace 12q14 – *MDM2*) či 13 (delece – pRb). Nejčastější strukturální chromozomální anomálií je delece v oblasti krátkého raménka chromozomu 9 (konkrétně 9p21), která je nalézána jak u povrchových nádorů, tak i u převážné většiny nádorů svalově invadujících a představuje tak pravděpodobně jednu z prvních mutací celé tumorigenní dráhy. Významná je rovněž delece na krátkém raménku chromozomu 17 postihující tumor supresorový gen pro protein p53 nebo amplifikace regionu 17q11.

Genové mutace

Genové mutace jsou u papilárních typů tumorů nejčastěji nacházeny v systému receptorů fibroblastových růstových faktorů, především *FGFR3* či onkogenech rodiny *RAS*, zatímco u invazivních typů převažuje mutační vyřazení klasického tumorového supresoru *TP53*, nadměrná exprese genu *APOBEC-3* nebo dalších klíčových genů kódujících součásti komplexních enzymatických systémů organizace a remodelace chromatinu (např. *ARID1A*, *MLL*, *EP300* a *KDM6A*) [50, 53, 58]. Inaktivační mutace v genu kódující demetylázu *KDM6A* jsou běžné u svalově neinvazivního typu nádoru, zatímco inaktivační mutace metyltransferázy *MLL2* jsou pozorovatelné u svalově invazivního typu [8, 24, 59]. Tabulka 5 shrnuje nejčastěji mutované geny u invazivního typu karcinomu močového měchýře.

Tabulka 5 – Frekvence mutací u vybraných genů invazivního typu karcinomu močového měchýře [54, 59]

Gen	Frekvence mutací (%)	Gen	Frekvence mutací (%)
<i>TP53</i>	41	<i>RBI</i>	15
<i>KDM6A</i>	28	<i>FGFR3</i>	13
<i>ARID1A</i>	22	<i>HRAS</i>	8
<i>PIK3CA</i>	18	<i>PTEN</i>	4

Epigenetické změny

U karcinomu močového měchýře se také významně uplatňují epigenetické změny DNA či modifikace chromatinu. Catto *et al.* publikovali studii, která ukázala, že hypermethylace promotorů vybraných genů (*RASSF1a*, *CDH1*, *TNFSR25*, *EDNRB* a *APC*) je spojena s horší progresí a vyšší mortalitou [55]. Hypermethylace genu *PAX6* byla detekována u pacientů, u kterých ve většině případů došlo k relapsu onemocnění, zatímco metylace genů *NSH6* a *THBS-1* se ukázala jako možný prognostický marker nádorové progresse [4, 5]. Frekvence metylace u vybraných genů karcinomu močového měchýře je uvedena v tabulce 6.

Tabulka 6 – Frekvence metylace u vybraných genů karcinomu močového měchýře [5]

Gen	Frekvence metylace (%)	Gen	Frekvence metylace (%)
<i>CDH1</i>	36	<i>FHIT</i>	16
<i>RASSF1a</i>	35	<i>retinoid acid receptor</i> β	15
<i>CDH13</i>	29	<i>p16^{INK4A}</i>	7
<i>SFRP1</i>	29	<i>death-associated</i> <i>kinase</i>	4

Vedle genů kódujících prozeiny byla u karcinomu močového měchýře nalazena celá řada mikroRNA, jejichž hladina exprese je v nádorech signifikantně změněna ve srovnání s normální tkání. Tyto miRNA by mohly pomoci při včasné detekci progresu, recidivy či dokonce mikroRNA molekula by mohla být užitečným terapeutickým cílem při léčbě nádoru samotného. U uroteliálního karcinomu bylo v literatuře popsáno více než 76 různých miR, z nichž je v posledních době nejčastěji studováno šest (miR-21, miR-143, miR-155, miR-200, miR-214 a miR-222). Konkrétní miRNA jsou uvedeny v tabulce 7. Vysoké exprese miR-21, miR-143, miR-155 a miR-222 a naopak nízké hladiny miR-200 a miR-214 byly spojeny s výrazně horší prognózou. Nedávná studie publikovaná kolektivem Juráček *et al.* identifikovala na základě analýzy celého genomu další tři miRNA (miR-31-5p, miR-93-5p a miR-191-5p), jejichž hladiny se významně lišily v porovnání mezi skupinou pacientů trpících karcinomem močového měchýře a zdravými jedinci. V moči pacientů byly nalezeny výrazně vyšší koncentrace těchto miRNA. Stanovením diagnostického skóre (DxScore) se dokonce ukázalo, že by bylo na základě stanovení miRNA možné odlišit nádory invazivní od neinvazivních [60]. MikroRNA jsou tedy potenciálními biomarkery, které lze stanovit z tkáně, moče nebo krve. Vysoká stabilita miRNA v moči a relativně jednoduchá analýza tak představuje slibný a neinvazivní přístup vhodný jak pro včasnou diagnostiku, tak i pro sledování vývoje urologických malignit [61–65].

Tabulka 7 – Nejčastěji studované miRNA u karcinomu močového měchýře [61–63, 65]

mikroRNA	Role v karcinogenzi	Mechanismus
miR-21	protoonkogen	VEGFC signalizace
miR-143	tumor-supresor	PI3K/AKT a MAPK signalizace
miR-155	protoonkogen	Wnt/ β catenin signalizace
miR-200	tumor-supresor	Inhibice epiteliálně-mezenchymální tranzice, (miRNA-200c – inhibice laktátdehydrogenázy A)
miR-214	tumor-supresor	Snížení aktivity PDGFR1
miR-222	protoonkogen	Snížení aktivity PTEN

3.8.1 Molekulární genetika papilárních tumorů močového měchýře

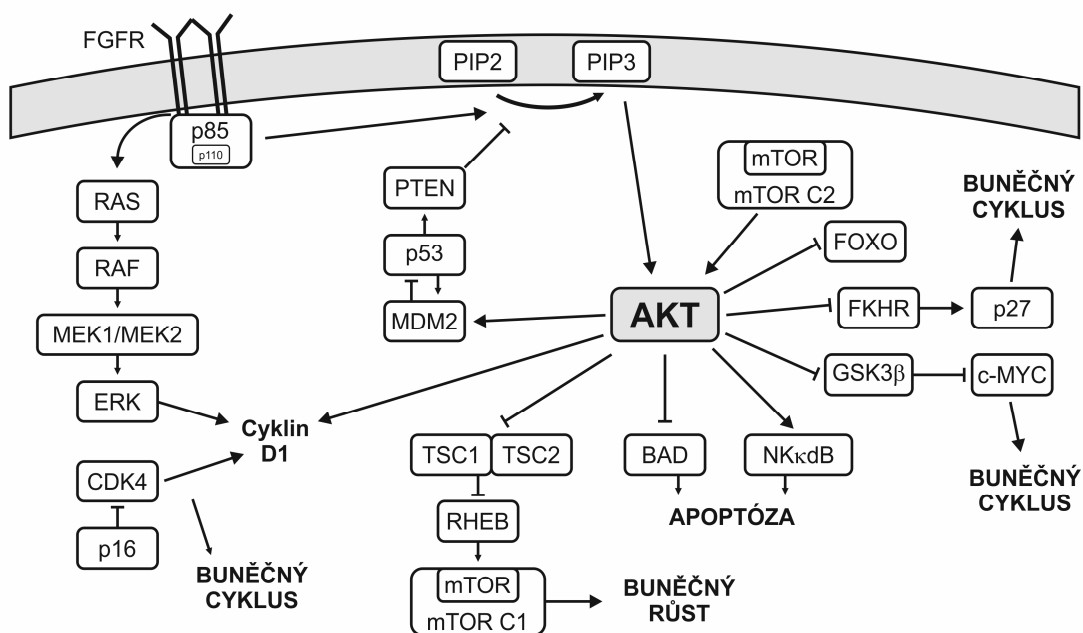
***FGFR3* dráha**

U více než 70% neinvazivních papilárních karcinomů močového měchýře (stádium Ta) se vyskytuje mutace v systému receptorů fibroblastových růstových faktorů, především v genu pro receptor *FGFR3*. Tento transmembránový protein se skládá ze tří domén – extracelulární, transmembránové a cytoplazmatické tyrosinkinázové [66]. Reakcí extracelulární části receptoru s růstovými faktory dochází k iniciaci kaskády signálů, které v konečném důsledku ovlivňují buněčný růst, diferenciaci, migraci a angiogenezi. Nejčastější mutace se vyskytují v exonu 7 (50 – 80 % všech mutací genu *FGFR3*), mutace

v exonu 10 kódujícím transmembránovou doménu se nacházejí v 15 – 40 % a ty, které postihují tyrosinkinázovou část, činí 5 – 10 % (exon 15). Mutace nejčastěji způsobí zařazení chybného cysteinu, dimerizaci a následnou fosforylaci, což vede i v nepřítomnosti ligandu ke konstitutivní aktivaci receptoru. Stálá aktivace receptoru uděluje sice nádorovým buňkám růstovou výhodu, ale současně jsou zachovány regulace buněčného cyklu a mechanismy apoptózy. Tento fakt může vysvětlit rozdíly mezi indolentní a agresivní formou, kde současná mutace v genech *FGFR3* a *TP53* způsobující narušení apoptózy pak velmi výrazně zhoršuje celkovou prognózu [5, 53].

RAS geny

Důležité produkty *RAS* onkogenů hrají ústřední roli zejména v proliferaci, diferenciaci nebo buněčné smrti a patří do tzv. superrodiny guanosin-5'-trifosfatáz (GTPáz), neboli G proteinů, které fungují jako molekulární přepínače mezi receptorovými a nerekceptorovými tyrosinkinázami přenášejícími signál do cytoplazmy. V lidských buňkách existují tři potenciálně onkogenní *RAS* geny, které kódují vysoce příbuzné proteiny Ha-RAS, N-RAS a K-RAS [67]. Ras proteiny spouštějí celou řadu signálních drah, z nichž nejintenzivněji studované molekulární dráhy u karcinomu močového měchýře jsou mitogen aktivovaná protein-kinázová signální dráha (MAPK – mitogen-activated protein kinase) a PI3K/AKT/PTEN kaskáda [5, 55, 58, 68, 69]. Obrázek 8 schématicky ukazuje možný patobiologický vznik papilárních nádorů močového měchýře.



Obrázek 8 – Molekulární genetika papilárních nádorů močového měchýře [5, 55, 58, 68, 69]

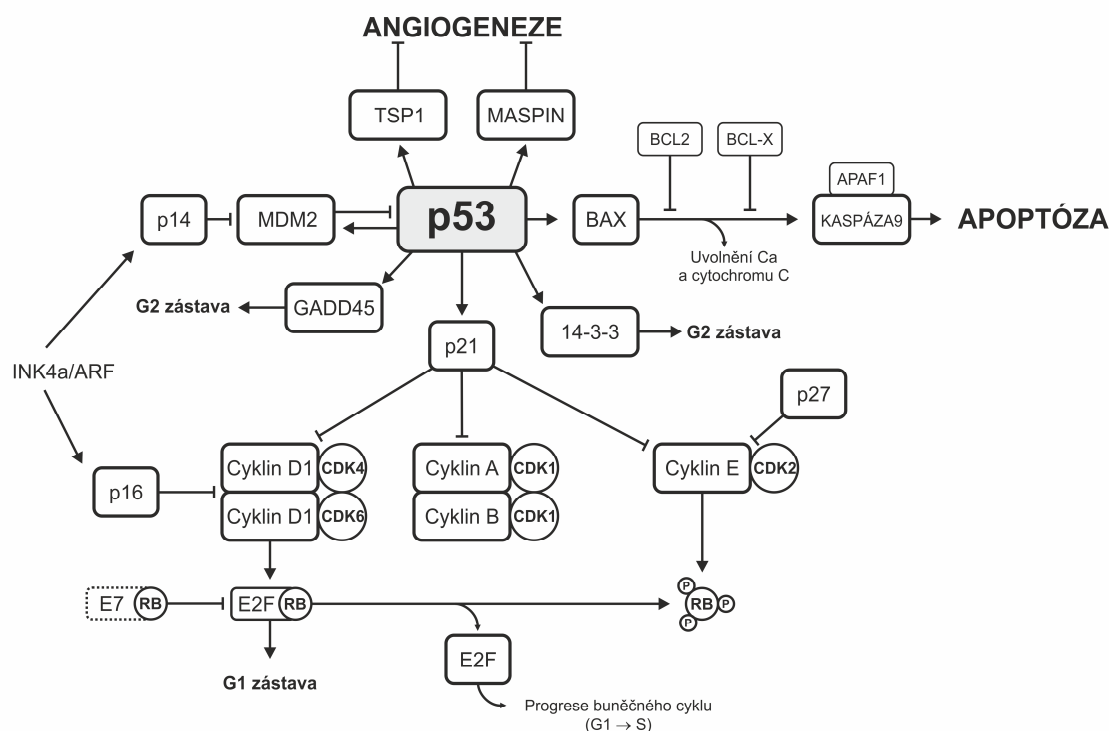
3.8.2 Molekulární genetika invazivních typů tumorů močového měchýře

P53 dráha

Nukleární transkripční fosfoprotein p53 byl objeven již v roce 1979. Hlavní funkcí je regulace buněčného cyklu, oprav DNA a apoptózy. Gen *TP53* je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13.1) a obsahuje 11 exonů a 10 intronů [70]. Díky alternativnímu sestřihu *TP53* mohou vzniknout N-koncové a C-koncové izoformy proteinu, prostřednictvím alternativních promotorů uvnitř genu mohou vznikat další varianty proteinu p53 [71].

Mezi hlavní geny, které byly identifikovány jako cílové pro p53 patří *p21^{WAF1/CIP1}* (funkce proteinu: zastavení buněčného cyklu v G1 fázi), *MDM2* (funkce proteinu: tvorba komplexu s p53, jeho ubiquitinace a následná degradace v proteozomu), *GADD45* (funkce proteinu: zabraňuje vstupu do M fáze buněčného cyklu), *BAX* (funkce proteinu: regulace apoptózy), *IGF-BP3* (funkce proteinu: antimitotická), *14-3-3 σ* (funkce proteinu: zabraňuje přechodu do M fáze), *TSP1* (funkce proteinu: inhibice angiogeneze) aj.

Alterace tumor-supresorového genu *TP53* hraje klíčovou roli u mnoha nádorů včetně tumorů močového měchýře. Mnoho studií ukazuje, že mutace v genu jsou spojeny s invazivnějším chováním, vyšší pravděpodobností výskytu recidivy a nepříznivého výsledku systémové léčby [53]. Nejčastější změny v genu u nádorů močového měchýře byly nalezeny mezi exony 4 a 9 (97 %), ze 72,5 % se jedná o mutace bodové typu missense mutation, v 12,2% způsobí mutaci ztráty smyslu (nonsense mutation) [72]. Velké množství mutací narušujících funkci p53 bylo nalezeno zejména ve vazebné doméně DNA. Tyto mutace neumožňují vazbu proteinu na DNA a tím následnou regulaci cílových genů [73]. Kromě toho se může mutantní protein dokonce vázat na zcela funkční protein p53, a tím zablockovat či modifikovat jeho transkripční funkci [53]. V důsledku toho se může z důležitého nádorového supresoru stát nežádoucí onkogen. Mutovaný p53 nejen, že ztrácí své supresorové vlastnosti, ale dochází ke změně jeho transkripční schopnosti a získá tak možnost aktivovat geny jako jsou *MDR1* (multidrug resistance), *MYC*, *EGFR* (epidermal growth factor receptor), *VEGF* (vascular endothelial growth factor), které naopak přispívají k nádorovému bujení. Nádory s „gain of function“ mutací p53 jsou pak odolnější k chemoterapii či radioterapii dokonce více než nádory, kterým protein p53 zcela chybí [74, 75]. Molekulární genetika invazivních nádorů karcinomu močového měchýře je schématicky navržena na obrázku 9.



Obrázek 9 – Molekulární genetika invazivních nádorů karcinomu močového měchýře [55, 58, 68, 76]

Rb dráha

Retinoblastomový protein RB protein je nádorový supresor, který hraje roli v širokém spektru buněčných dějů, z nichž nejvýznamnějším je regulace buněčného cyklu při průchodu z G1 do S fáze. Komplexy CDK6/Cyklin D a CDK2/Cyklin E fosforylují pRB a tím dojde k uvolnění transkripčního faktoru E2F. Volný E2F pak aktivuje transkripci genů, které jsou nutné pro přechod z G1 do S fáze a replikaci DNA. Inhibitor komplexu CDK4/Cyklin D – protein p16 – lokalizovaný na lokusu *INK4A/ARF* blokuje fosforylaci Rb a hraje významnou roli nádorového supresoru. Vyšší exprese E2F proteinů se nachází relativně běžně u karcinomu močového měchýře. Zejména zvýšená exprese faktoru E2F3 v důsledku amplifikace genu je spojena s výskytem invazivních forem. Naproti tomu vyšší exprese cyklinu D1 se vyskytuje spíše u nižších stádií papilárního typu [5, 77].

PTEN

Tumor-supresorový gen *PTEN* (phosphatase and tensin homology) se skládá z 9 exonů a je lokalizován na chromozomu 10q23.3. Tento region podléhá ztrátě heterozygoty u 20 – 30 % karcinomů. Cytoplazmatický protein PTEN se skládá ze 403 aminokyselin (55 kDa) a má fosfatázovou aktivitu na lipidových substrátech. Ztráta funkce vede k proliferaci buňky a úniku z kontrolních mechanismů vedoucích k apoptóze [5]. Protein působí jako negativní regulátor PI3K dráhy. V tabulce 5 je ukázáno, že gen

PTEN je sice relativně zřídka mutován, ale snížená exprese byla popsána u 42 % neinvazivních a 94 % pokročilých forem tumorů močového měchýře [54].

3.9 Mikroprostředí nádoru

Solidní nádory jsou tvořeny dvěma úzce provázanými a společně se vyvíjejícími součástmi – populací vlastních nádorových buněk (parenchymem) a stromatem, jenž má na nádorový proces a jeho biologické vlastnosti zcela zásadní vliv. Nádorové stroma je tvořeno kromě nenádorových buněk (endotelie, nádorově asociované fibroblasty) a buňky imunitního systému také extracelulární matrix.

3.9.1 Základní charakteristiky extracelulárního prostředí nádorů

Mikroprostředí nádoru je charakterizováno nízkým obsahem kyslíku tzv. hypoxií, extracelulární acidózou a deprivací živin a energie. Průměrné hodnoty parciálního tlaku kyslíku v maligních nádorech se pohybují mezi $pO_2 = 23 - 28$ mmHg, zatímco v normální tkáni je množství kyslíku více než dvojnásobné (54 – 65 mmHg). Dokonce i v rámci jednoho nádoru existuje vysoká variabilita stupně hypoxie a hypoxické regiony obsahují buňky, které oproti ostatním buňkám v nádoru rostou výrazně pomaleji [78]. V důsledku hypoxie (méně než 2 % kyslíku) dochází k indukci genů, které jsou v normální tkáni nedetekovatelné. Jedná se zejména o geny podporující anaerobní metabolismus a angiogenezi. Nejvýznamnějším transkripčním faktorem zodpovědným za aktivaci hypoxických genů je bezesporu heterodimerický protein hypoxií indukovaný transkripční faktor 1 (HIF-1) složený z podjednotek HIF-1 α a HIF-1 β [79], jehož jaderná lokalizace byla nalezena u více než 57 % karcinomů močového měchýře. Prokázal se také jasný vztah mezi expresí faktoru a stupněm diferencovanosti nádoru, kdy málo diferencované uroteliální karcinomy vykazovaly vyšší pozitivitu na *HIF-1*, což z něj vytváří možný prediktivní marker progresu zejména pro svalově infiltrující karcinomy močového měchýře [80]. Aktivace HIF má v nádoru komplexní důsledky, které se odvíjejí od jím aktivovaných genů a které shrnuje tabulka 8.

Tabulka 8 – Účinky HIF-1 u svalově infiltrujících karcinomů močového měchýře [80]

Zvýšení exprese genu <i>HIF</i> či zvýšení jeho aktivity
Metabolická adaptace (<i>LUT1</i> , <i>GLUT3</i> , <i>ALDA</i> , <i>GADPH</i> , <i>LDHA</i>)
Angiogeneze (<i>VEGF</i> , <i>VEGFR2</i> , <i>ENG</i>)
Resistence k apoptóze (<i>IGF2</i> , <i>ADM</i> , <i>NOS2</i>)
Faktory invaze a metastazování (<i>AMF</i> , <i>VIM</i> , <i>MMP2</i> , <i>CK18</i>)
Léková rezistence (<i>MDR1</i>)

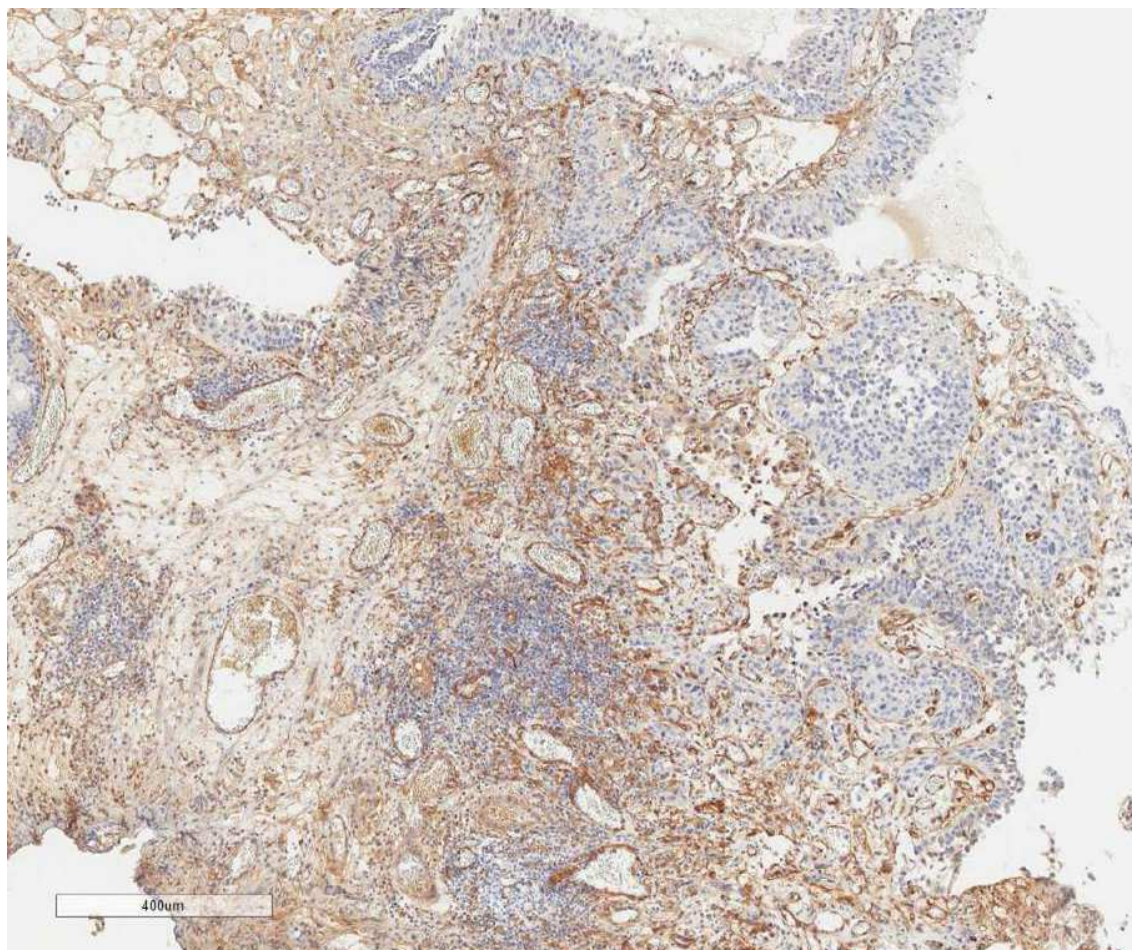
Díky nedostatečnému zásobení kyslíkem jsou nádorové buňky nucené pro pokrytí svých energetických potřeb zvýšit intenzitu glykolýzy. Tento způsob získávání ATP má za následek zvyšování produkce H^+ iontů a následnou acidifikaci celého extracelulárního prostředí nádoru [81]. Důležitou roli při vzniku acidózy hraje také CO_2 (konverzí na hydrogenuhličitan se uvolňuje proton), hydrolýza ATP či větší schopnost pumpovat protony do extracelulárních prostor. Průměrná hodnota pH_e v extracelulární tekutině normální tkáně se pohybuje kolem hodnoty 7,4 (hodnota pH_i v intracelulárním prostoru kolem 7,1), zatímco pro nádory se uvádí průměrná hodnota pH_e extracelulárního prostoru okolo 6,8 a pH_i v rozmezí 7,0 – 7,4 [82, 83]. Existuje mnoho studií, které dokládají, že acidóza okolního prostředí velmi úzce souvisí s rezistencí nádorových buněk k používaným chemoterapeutikům a může dokonce indukovat epiteliálně mezenchymální tranzici [84, 85]. U některých typů nádorů (močového měchýře, ledviny, žaludku) vykazuje extracelulární prostředí ještě extrémnější hodnoty pH_e . Při intravenózní léčbě karcinomu močového měchýře běžně užívanými slabě bazickými chemoterapeutiky (např. vinblastin, doxorubicin) byla prokázána až 10násobná resorpce léku z moči při současném užití látek zvyšujících pH (hydrogenuhličitan sodný, acetazolamid). Hodnota pH moče se zvýšila zhruba o dvě jednotky pH, v krvi o 0,5 jednotky pH a lze tedy předpokládat lepší distribuci léku v cílových tkáních [84].

Dalším specifickým rysem mikroprostředí je glukózový deficit, kdy podle některých publikací klesá koncentrace glukózy na hodnoty několikanásobně nižší. Příčinou poklesu je nedostatečné prokrvení nádorové masy a velmi často také metabolismus jednoduchých cukrů [83]. Existují ale i zcela opačné studie, které tvrdí, že gradient koncentrace glukózy se ve vzdálenosti od bazální membrány mění jen minimálně a glukóza tak nemůže být limitující faktor v průběhu karcinogeneze [86]. Zvýšená spotřeba glukózy má také přímou souvislost s hypoxií, neboť některé důležité enzymy pro glykolýzu jsou regulovány transkripčním faktorem HIF-1. Výsledkem rychlé spotřeby glukózy je nadměrné hromadění laktátu, okyselení celkového nádorového mikroprostředí a vytvoření takových podmínek, které podporují agresivní chování nádoru a jeho expanzi a omezují tak možný léčebný zásah [83].

3.9.2 Základní charakteristiky buněk nádorového stromatu

V nádorovém prostředí se nalézá velmi heterogenní buněčná populace, která se skládá z transformovaných rakovinných buněk, buněk infiltrujících a z buněk podporující nádor. Mezi takové nenádorové buněčné komponenty patří například s nádorem asociované fibroblasty, mezenchymální kmenové buňky (MSC), endotelové buňky, pericyty a hladké svalové buňky cév, adipocyty nebo buňky imunitního systému (nádor infiltrující T-lymfocyty, nádorově asociované makrofágy – TAM). Bylo prokázáno, že téměř všechny výše uvedené buněčné komponenty bývají menší či větší měrou deregulované a v důsledku toho mohou v různé míře podporovat, umožňovat, či dokonce indukovat přežití a růst vlastních nádorových buněk [87–89].

Stěžejní součástí nádorového stromatu jsou nádorově asociované fibroblasty, které v normální tkáni hojně produkují složky extracelulární matrix, především kolagen typu I, III, V a fibronectin. Obrázek 10 dokládá, že nádory močového měchýře, které jsou na stromální buňky poměrně bohaté, se v současné době ukazují jako jednoznačně nepříznivé pro prognózu a progresi onemocnění. [88].

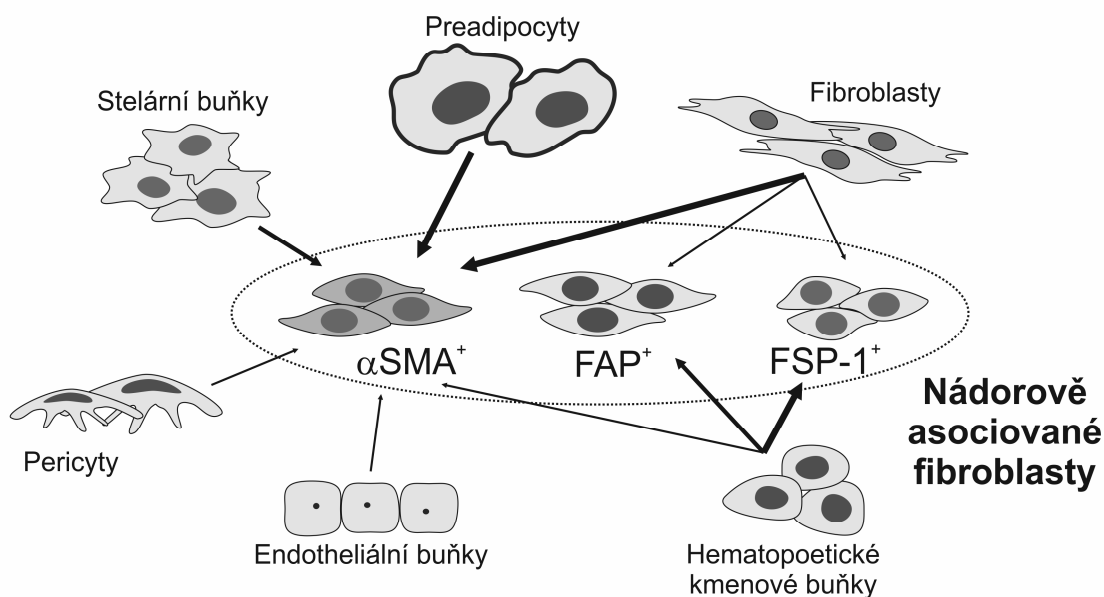


Obrázek 10 – Histologický preparát ukazuje, že nádory močového měchýře jsou velmi bohaté na stromální fibroblasty (klasifikace nádoru: pT1 a pTis cNXcM0 GII, značení: PDGFR- β), zvětšeno 4x [90]

3.9.3 Nádorově asociované fibroblasty

Termínu nádorově asociované fibroblasty se využívá k popisu buněk, které se morfoloicky a funkčně odlišují od nenádorových fibroblastů. Jsou to buňky, které vykazují zvýšenou proliferační aktivitu a hojnější sekreci proteinů alterované extracelulární matrix (kolagen typ I, tenascin, EDA – fibronectin či SPARC). Obsahují velké oválné euchromatické jádro s jedním nebo dvěma jádřky a jejich stresová kontraktální vlákna zůstávají nepřetržitě aktivována. Exprimují celou řadu aktivačních znaků (α SMA a γ SMA, paladin, vimentin, endosialin, podoplanin, FSP1, FAP, CD90,

PDGFR β) [91, 92]. Jejich původ je předmětem celé řady hypotéz, které zahrnují možnosti genetické alterace normálních tkáňových fibroblastů procesem mezenchymálně-mezenchymální tranzice nebo jiných přítomných mezenchymálních buněk (např. adipocytů, pericytů), epiteliálně-mezenchymální přeměny místních epitelových či nádorových buněk, migrace a následné aktivace mezenchymálních kmenových buněk či přeměnou endoteliálních buněk pomocí endoteliálně-mezenchymální tranzice [93, 94].



Obrázek 11 – Možný původ nádorově asociovaných fibroblastů [95]

Nádorové fibroblasty přímo řídí a podporují tumorové epitelové buňky prostřednictvím mnoha různých růstových faktorů, hormonů a cytokinů. Hlavními mitogeny, které jsou jimi produkovány, jsou HGF, IGF-1, EGF, FSP1, VEGF, PDGF, ale také cytokiny SDF-1 α či IL-6. TGF- β 1 působí autokrinně a je zodpovědný zejména za udržení fibrogenese. Jeho akumulace v nádorovém prostředí aktivuje další růstové faktory například VEGF a CTGF, které pak následně podporují nádorovou proliferaci a angiogenezi. TGF- β 1 působí imunosupresivně, podporuje degradaci extracelulární matrix a následnou invazi. Kromě růstových faktorů produkují nádorově asociované fibroblasty a také samotné nádorové buňky mnoho prozánětlivých cytokinů jako jsou interleukiny, interferony a faktory TNF rodiny. Tvorba cytokinů a chemokinů podporuje infiltraci řady imunitních buněk, které pak následně podporují angiogenezi a invazi. Mezi hlavní angiogenní faktory patří VEGF, HFG, MMP2 a IL-8 [94, 96]. Nádorově asociované makrofágy (TAM) mají zhoršenou schopnost prezentovat antigen a potlačují adaptivní imunitní odpověď zprostředkovanou Th1-lymfocyty. Nádorem rekrutované T-lymfocyty udržují svou proliferaci i v nepřítomnosti antigenní stimulace a tím silně podporují v tumoru stav chronického zánětu a jeho následnou progresi. Kromě toho také nádorově asociované fibroblasty přispívají ke zvýšení fibrózy nádoru, což má za následek inhibici

infiltrace T-buněk do nádoru samotného. Expresí ligandů programované smrti (PD-L1 a PD-L2) a jejich interakce s receptory na T-buňkách je tak další možností, jak mohou nádorově asociované fibroblasty tlumit imunitní reakci. Pro inhibici samotných NK buněk i inhibici jimi produkováných cytotoxických látek produkují fibroblasty enzym 2,3-dioxygenázu a tkáňový hormon prostaglandin E2 (PGE2). Stromální buňky jsou tak nástrojem pro vytváření jedinečného prostředí chronického zánětu a imunitní tolerance, který nádorovým buňkám umožňuje být pozitivně ovlivňován růstovými faktory a současně se vyvarovat imunitního dohledu vylučováním různých cytokinů či chemokinů [91].

Velmi důležitou událostí, která je zlomová pro progresi nádoru do maligního stavu, je poškození bazální membrány a šíření nádorových buněk tkáněmi. Tomu mohou opět silně pomoci nádorově asociované fibroblasty, které jsou schopny produkovat např. aktivátory plazminogenu a několik členů matrixmetaloproteázové rodiny (u karcinomu močového měchýře zejména MMP2 a MMP9 detekovatelné i v moči pacienta). Tyto enzymy jsou velmi důležité nejen pro přímou degradaci extracelulární matrix, která je zjevně spojená s expanzí nádoru, invazí (vedoucí přes epiteliálně-mezenchymální tranzici) a angiogenezi, ale také podporují imunosupresivní status nádorového prostředí enzymatickou aktivací TGF- β a inhibicí receptoru pro IL-2 [94, 96, 97]. Proces degradace extracelulární matrix je doprovázen rychlým nárůstem volných radikálů, které indukují genomickou nestabilitu v okolních buňkách včetně buněk nádorových. Důsledkem poruchy interakce mezi normálními buňkami a extracelulární matrix je spuštění procesu programované buněčné smrti zvané anoikis. Nádorové buňky bývají však k tomuto procesu díky aktivaci signální kaskády PI3K-AKT značně rezistentní. Nádorově asociované fibroblasty mohou prostřednictvím různých faktorů PI3K-AKT dráhu aktivovat a ochránit tak nádorové buňky před jinak jistou buněčnou smrtí [91]. Kromě svých schopností vylučovat různé podpůrné faktory a ovlivňovat tak celou řadu buněk, mohou nádorově asociované fibroblasty působit také jako mutagen, který zvyšuje tumorigenní aktivitu nádorových buněk. Jako příklad nám poslouží volné radikály generované právě fibroblasty, které pak v hypoxickém prostředí o nízkém pH působí silně mutageně [94]. Nádorově asociované fibroblasty hrají velmi důležitou roli nejen v iniciaci nádoru, ale také během jeho progresu a proto není překvapivé, že se jim také přičítá výrazná prognostická hodnota. Například pozitivní nález aktivovaných fibroblastů (pozitivních na FAP, α SMA a podoplanin) během histologických barvení často koreluje s velmi špatnou prognózou, což z nich činí slibné terapeutické cíle [91].

Dalším nezávislým rizikovým faktorem přežití u karcinomu močového měchýře je transmembránový protein syndecan (SDC1). Přestože se za fyziologických podmínek tento protein exprimuje pouze v epitelových buňkách, podle Szarvase *et al.* byla zvýšená exprese syndecanu nalezena také u buněk stromálních. Výsledky studie ukazují, že nádorové buňky jsou schopny indukovat expresi SDC1 u stromálních buněk, což zpětně pozitivně podporuje jejich nádorovou proliferaci a migraci. Ztráta exprese proteinu v membráně nádorových buněk a zároveň zvýšená exprese u stromálních buněk spojená se zvýšenou sérovou koncentrací SDC1 u pacientů s progresivním nádorem karcinomu močového

měchýře se zdá být nezávislým rizikovým faktorem přežití, který by mohl být nápomocný při výběru vhodnější terapie [98].

3.9.4 Nádorové kmenové buňky

Model nádorových kmenových buněk je v biologii nádorů poměrně novým konceptem a na rozdíl od stochastického modelu, kde každá nádorová buňka má tumorigenní potenciál a může tedy tvořit nádory, se opírá o pojem vnitřní hierarchie mezi nádorovými buňkami. Na kmenové buňky je nahlíženo jako na nejméně diferencované buňky se schopností sebeobnovy, které jsou výrazně podobné zejména dospělým kmenovým buňkám. Heterogenity tumoru je pak dosaženo postupnou diferenciací těchto nádorových kmenových buněk, které přitom ztrácí svou schopnost sebeobnovy. Kromě schopnosti sebeobnovy a vlastnosti diferenciaci disponují nádorové kmenové buňky i dalšími výhodnými schopnostmi, zejména schopností sebeobrany a relativně nízkou proliferační aktivitou a stávají se tak dlouhotrvajícími a samočinně se rozvíjejícími populacemi. Přestože se nádor chová podobně jako kterýkoliv orgán v těle, jeho homeostatická regulace je narušena [99, 100]. Zatímco v dospělém organismu dochází k buněčné homeostáze, na které se podílí tři základní geneticky podmíněné děje (proliferace buněk, programovaná buněčná smrt a terminální diferenciaci buněk), při nádorové transformaci dochází k jejímu narušení. To se může projevit tak, že buňky získají výhodu neomezeného replikačního potenciálu, jsou soběstačné na růstové faktory nebo necitlivé vůči signálům regulující růst, mohou mít inaktivovanou apoptózu popřípadě získají schopnost migrovat a metastazovat [101]. Tyto vlastnosti mají důležité klinické důsledky, neboť jsou spojeny s terapeutickou rezistencí. Klasická chemoterapie a radioterapie u pomaleji dělících se buněk způsobuje menší poškození v DNA a navíc kmenové nádorové buňky vykazují vyšší hladiny proteinových efluxních transportérů (P-glykoproteiny či ABC transportéry) nebo enzymů důležitých pro metabolismus terapeutik (ALDH) [102].

Kmenové buňky v normálním urotelu

Uroteliální kmenové buňky jsou obvykle v klidovém (quiescentním) stavu a mohou proliferovat a rekonstruovat tkáň zejména v době, kdy je sliznice poškozena. Tkáň močového měchýře zahrnuje několik typů kmenových buněk – uroteliální, mezenchymální, mezenchymální buňky z kostní dřeně či kmenové buňky tukové tkáně [102].

Tradiční pohled na biologii kmenových buněk u uroteliálního karcinomu vychází z předpokladu, že kmenové buňky jsou umístěny ve vrstvě bazálních buněk [103]. Nedávné studie však ukazují alternativní hypotézu, že děštníkové buňky se regenerují vlastním fondem progenitorových buněk, které se nacházejí v intermediární vrstvě, zatímco bazální vrstvu regenerují výhradně buňky nalézající se ve vrstvě bazální [104]. Papafotiou *et al.* ukázali, že mezi CK5⁺ bazálními buňkami existuje malá podskupina

buněk, která je současně pozitivní i na CK14. Množství těchto CK14⁺ buněk vrcholí postnatálně a v průběhu dospívání jejich počet výrazně klesá (30 % CK14⁺ po narození, 0,5 % CK14⁺ v 1 roce života myši). Pomocí studií na transgenních myších *in vivo* a klonogenních experimentů *in vitro* se ukázalo, že se tyto buňky podílejí jak na přirozené regeneraci, tak i na obnově všech vrstev močového měchýře indukované poraněním. Dříve popsané kmenové buňky intermediárních vrstev odpovídají nejspíše progenitorovým buňkám, které se uplatňují spíše pro regeneraci mírně poškozené či nepoškozené nebo stárnoucí sliznice močového měchýře [8, 105, 106].

Nádorové kmenové buňky a jejich heterogenita u karcinomu močového měchýře

Uroteliální nádorové kmenové buňky jsou subpopulací buněk, které jsou schopny iniciace nádoru, sebeobnovy a diferenciaci do diferencovaných buněk. Nemusí být nutně odvozeny od normálních kmenových buněk, mohou pocházet z diferencovaných buněk, které získaly tumorigenní vlastnosti prostřednictvím genetické či epigenetické aberace [107]. Dva nezávislé myší modely přesvědčivě ukázaly, že pro svalově invazivní nádor je iniciační buňkou nádoru bazální buňka, tedy pravděpodobně normální kmenová buňka, zatímco koncepčně velmi podobný výzkum identifikoval pro svalově neinvazivní typ jako pravděpodobnou iniciační buňku intermediární [8, 104, 108].

Jedním z prvních markerů pro nádorové kmenové buňky u karcinomu močového měchýře byla molekula membránového antigenu CD44. Ukázalo se však, že je použitelný pouze pro zlomek nádorů, u některých neinvazivních typů byl exprimován téměř všemi bazálními buňkami, naopak jindy nebyl exprimován vůbec. Subpopulace nádorových kmenových buněk CD44⁺ vykazovaly různé varianty aktivací onkogenů, které jsou zapojeny do sebeobnovovacího procesu (např. *CTNGB1* (β -catenin), *BM11*, *STAT3*, *GL11*, *Sonic Hedgehog* aj.), což dokládá značnou heterogenitu v molekulárním mechanismu udržení kmenového fenotypu buněk. [102, 109].

Heterogenita kmenových buněk se dále rozšiřuje v souvislosti s nedávnou charakterizací vnitřních podtypů jak u invazivního tak i u neinvazivního typu nádoru. Bazální invazivní typy vykazují hojnou expresi kmenových markerů CD44, P-cadherinu, CK5 a CK14 [110], zatímco lumenální nádory pocházející ze svalově neinvazivních typů exprimují zejména ALDH1A1, ALDH1A2, CD133, CD90 a nestin [111]. Unikátní mechanismus udržení kmenového fenotypu se vyskytuje u karcinomu *in situ*, jehož kmenové buňky jsou závislé na Sonic Hedgehog signalizaci. Tato signální molekula hraje roli při regeneraci normálního urotelu v odpovědi na jeho chemické či mikrobiologické poškození. Akceptorem tohoto signálu jsou suburoteliální stromální fibroblasty. Příjem signálu mezenchymální buňkou způsobí velmi rychlou koordinovanou expresi směrem k urotelu jak mitogenních (WNT2, WNT4, FGF16) tak i diferenciaci podporujících (BMP4, BMP5) faktorů, které jsou namířeny zpět do urotelu [103, 112]. Hedgehog dráha je také aktivována například chronickou expozicí arsenu, což je jedním z dobře známých karcinogenů urotelu [8, 113]. Problematika heterogenity nádorových kmenových buněk se tak stává velmi složitou, protože nádorové kmenové buňky jsou vždy úzce spojeny

s konkrétním typem nádoru a stádiem jeho progresu a rovněž metodikou jejich studia a použitím experimentálních modelů. Možnosti studia nádorových kmenových buněk jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 Metody studia kmenových buněk u karcinomu močového měchýře

Metoda studia	Marker nádorových kmenových buněk	Nádorový buněčný typ/ nádorová buněčná linie	Zdroj
<i>In vitro</i> klonogenní test	EMA ⁻ , CD44v6 ⁺	lidské primární buňky z nádoru	[114]
<i>In vitro</i> klonogenní test, <i>in vivo</i> model athymické nahé myši	Side population (DyeCycle violet staining)	SW780	[115]
<i>In vitro</i> klonogenní test	Side population (Hoechst 33342)	T24	[116]
<i>In vitro</i> klonogenní test, <i>in vivo</i> model athymické nahé myši	67LaR ⁺ , CEACAM6 ⁻ , CK17 ⁺	SW780, lidské primární buňky z nádoru	[117]
<i>In vitro</i> klonogenní test, <i>in vivo</i> Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} myší model	CD44 ⁺ , CK5 ⁺ , CK20 ⁻	lidské primární buňky z nádoru, myší primární buňky z nádoru	[118]
<i>In vitro</i> klonogenní test, <i>in vivo</i> model athymické nahé myši	ALDH1A1 (enzym aldehyddehydrogenáza)	RT4, 5637, T24	[119]
<i>In vivo</i> model imunodeficientní myši	CD90 ⁺ /CK14 ⁺	lidské primární buňky z nádoru, myší primární buňky z nádoru	[120]
<i>In vivo</i> model imunodeficientní myši	Koexprese CD44/CD47 (FC)	lidské primární buňky z nádoru, myší primární buňky z nádoru	[121]
<i>In vitro</i> klonogenní test, <i>in vivo</i> model athymické nahé myši	SOX-2	UM-UC-3, A83O2 ⁻ transformovaný urotel	[122, 123]
Transgenní myš <i>Shh-CreERT2</i>	<i>Sonic Hedgehog</i>	myší model	[104, 124]
Transgenní myš <i>Krt 5-CreERT2</i>	CK5	myší model	[105, 125, 126]

3.9.5 Komplexní mechanismy chemorezistence ovlivněné mikroprostředím

Na chemorezistenci se výrazně podílí složení a uspořádání mikroprostředí a stromální komponenty, které tak přispívají k výraznému gradientu v koncentraci léků. To se velmi dobře ukazuje při 3D buněčných kultivacích, kdy jsou buňky k aplikovaným cytostatikům mnohem odolnější než v klasickém 2D uspořádání, kde buňky rostou přichycené na kultivačním plastu [127]. Také jen samotná přítomnost stromálních buněk (fibroblastů, makrofágů, dendritických buněk aj.) ovlivňuje chemorezistenci nádoru [128]. Buněčné modely založené na společné kokultivaci stromálních a nádorových buněk jasně ukazují, že stromální buňky silně ovlivňují jak lékovou rezistenci, tak i aktivují růst nádorových buněk, podporují motilitu a schopnost invazivity a modulují metabolické a imunitní odpovědi nádoru. Imunitní buňky vytvářejí selekční tlak na nádorové buňky a tím zvyšují u přežívajících nádorových buněk terapeutickou rezistenci, což velmi zhoršuje efekt podávané léčby.

Kromě koncentračního gradientu přispívá k chemorezistenci nádorových buněk také zvýšený mezibuněčný tlak okolních kapalin nebo metabolické změny buněk. Slabě kyselé pH v okolí solidních nádorů snižuje průnik některých bazických chemoterapeutik difuzí přes cytoplazmatickou membránu [37, 129]. U nádorových buněk bývá také alterována exprese β 1-integrinu, kdy ve většině solidních nádorů dochází k potlačení exprese, buňky pak jsou nezávislé na pevném ukotvení, což přispívá nejen ke zvýšené schopnosti motility buněk, ale také vyšší rezistenci k apoptóze a k chemorezistenci [37]. Jedním z hlavních znaků nádorového mikroprostředí je hypoxie, která je způsobena nerovnováhou mezi příjmem a spotřebou kyslíku. Přítomnost hypoxie je spojována s rezistencí k radioterapii a chemoterapii, vyšším nádorovým potenciálem buněk, a tím přispívá k horší prognóze onemocnění. Hlavními regulátory buněčné adaptace k nedostatku kyslíku jsou transkripční faktory HIF [130]. Preklinické studie potvrdily, že terapie, které cílí na HIF, mohou pomoci při překonání chemorezistence [131, 132].

Účinek mnoha protinádorových léčiv je založen na aktivaci programované buněčné smrti. Nádorové buňky však mají v důsledku dlouhodobého selekčního tlaku ze strany imunitního systému tyto proapoptické dráhy často poškozené nebo zablokované, a tím získávají čas na opravu poškozené DNA či dalších buněčných struktur [37].

3.9.6 Nádorové kmenové buňky a chemorezistence nádorů

Velkou roli při chemorezistenci hrají nádorové kmenové buňky, které tvoří obvykle malou část nádoru. Větší část tumoru je naopak tvořena rychle rostoucími, případně postmitotickými diferencovanými buňkami, které však nejsou schopny sebeobnovy [101]. Nádorové kmenové buňky disponují specifickými mechanismy vlastní ochrany, které mohou být využity pro jejich vizualizaci či purifikaci. Nejčastěji se využívají dvě jednoduché metody – analýza „Side Population“ a „Aldefluor assay®“ (Tabulka 9). Při analýze „Side Population“ se využívá schopnosti kmenových nádorových buněk pumpovat aplikovaná chemoterapeutika z cytosolu pomocí efluxních transportérů, zatímco metoda

„Aldefluor assay®“ je založena na identifikaci kmenových nádorových buněk na základě aktivity enzymu aldehyddehydrogenázy [128, 133].

U mnoha nádorů byla po chemoterapii nalezena v reziduálním nádoru obohacená populace nádorových kmenových buněk. Z toho vyplývá, že tyto nádorové kmenové buňky jsou nutně chemorezistentní a v důsledku toho dochází při aplikaci cytostatika k jejich přežívání. Ostatní nádorové buňky působením cytostatika umírají. Zdrojem buněčných signálů pro podporu udržení kmenového fenotypu nádorových buněk zde nejsou buňky stromální, ale samotné nádorové buňky. Jejich buněčná smrt je doprovázena aktivací specifického genového expresního profilu, kde jedním z významně aktivovaných genů je ten, který kóduje enzymem cyklooxygenázu 2 (COX-2). Tento enzym katalyzuje syntézu prostaglandinu E2, který se z umírajících buněk uvolňuje do mikroprostředí a zpětně tak stimuluje nádorové kmenové buňky ke vstupu do buněčného cyklu. Tímto jednoduchým způsobem si nádor doplňuje kmenové buňky a udržuje jejich populaci téměř konstatní. V současné době je již schválena farmakologická inhibice COX-2 (lék Celecoxib), který by mohl zmírnit chemorezistenci nádoru zprostředkovanou repopulací kmenových buněk [8, 134].

3.10 Metabolismus nádorových buněk

Přestože příčin transformace normální buňky v nádorovou je celá řada a jednotlivé nádory se velmi liší po genetické stránce, jedno mají společné: nádorové buňky zcela změni úroveň svého metabolismu tak, aby vyhověly nárokům na rychlý buněčný růst a proliferaci. Obvykle přitom dochází k zvýšené spotřebě glukózy ve prospěch vzniku laktátu a částečnému utlumení respiračního řetězce. Této zvýšené spotřeby glukózy se velmi často využívá k přesné lokalizaci nádorové hmoty pomocí zobrazovací metody hybridní pozitronové emisní výpočetní tomografie (PET/CT), kdy se díky izotopicky značené ¹⁸F-deoxy-glukóze detekují tkáně vykazující zvýšený příjem glukózy. Důvodem tohoto způsobu metabolismu a rychlého zisku energie bývá posílení syntézy stavebních kamenů – nukleových kyselin, aminokyselin a lipidů nutných pro zvýšenou proliferační aktivitu. Tyto poznatky byly popsány již v roce 1927 německým lékařem Otto Warburgem, kdy byly připisovány zejména nefunkčním nebo defektním mitochondriím (Warburgův efekt) [135–137].

3.10.1 Metabolismus glukózy, glutaminu a laktátu

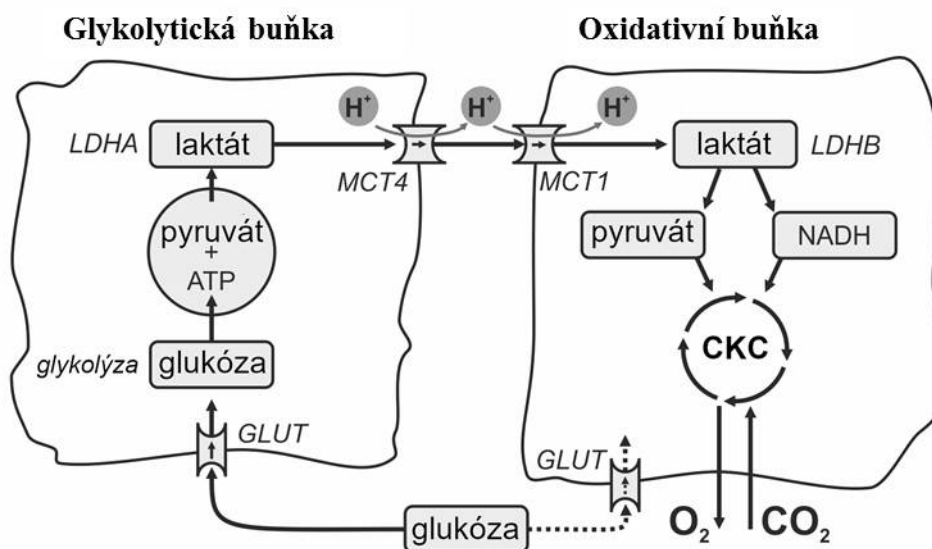
Metabolismus glukózy je v nádorových buňkách zcela odlišný. V normálních buňkách je glykolýzou produkováno maximálně 10 % ATP a zbytek ATP mitochondriální respirací, v nádorových buňkách vzniká glykolýzou i více než 60 % ATP [136]. V roce 1941 bylo potvrzeno, že využití glykolýzy závisí spíše na dostatečné a vhodné koncentraci glukózy než na funkčnosti mitochondrií (Crabtree efekt) a v podmínkách nižší hladiny glukózy dochází ke znovuzapojení dýchacího řetězce ve vyšší míře [136, 138]. Potlačení

funkce mitochondrie není tedy pravděpodobně způsobeno poškozením organely samotné, ale regulací aktivity proteinů zapojených do Krebsova cyklu či dýchacího řetězce [135].

Během vlastní glykolýzy vznikají z jedné molekuly glukózy dvě molekuly ATP a dvě molekuly redukovaného NADH. Za normálních okolností nastupují mitochondrie, kde se pomocí Krebsova cyklu a následně dýchacího řetězce vyrobí zbylých 34 molekul ATP, prekurzory pro syntézu nukleových kyselin, lipidů a aminokyselin. Kromě glukózy využívají buňky i další zdroj energie – glutamin, který je po přijetí do buňky transportován do mitochondrie a procesem zvaným glutaminolýza metabolizován. V nádorových buňkách dochází k několikanásobnému zvýšení spotřeby glukózy a glutaminu. Některé nádory dokonce dokáží žít v prostředí bez glukózy a využívat jako zdroj energie jiné aminokyseliny, které mohou být po přijetí buňkou transportovány a následně metabolizovány a využity v syntéze lipidů. Většina vytvořeného laktátu je sice výsledkem metabolismu glukózy, ale v buňkách s inhibovanou glykolýzou může být jeho zdrojem i glutamin [139]. Přebytný dusík dokáže pak buňka využít při syntéze ostatních aminokyselin. Přestože způsob získávání energie nevypadá u nádorových buněk efektivně, opak je pravdou. Respirační řetězec je schopen vyprodukovat sice 18x více molekul ATP než kolik lze získat pouhou glykolýzou, ale samotná glykolýza odprážená od mitochondriálního metabolismu je až 100x rychlejší. Pro silně proliferující buňku, která má vysoké nároky na stavební materiál a energii, je tento způsob více než efektivní. Nevýhodou rychlejšího metabolismu je i četnější produkce volných radikálů (zejména superoxidový a hydroxylový radikál), které dokáží poškodit jak buňku zdravou tak i nádorovou. Tumorové buňky jsou na volné radikály dokonce citlivější, než buňky normální. Jedním z důležitých ochránců před kyslíkovými radikály je glutathion, který pro svou správnou funkci potřebuje NADPH. Toto řeší tumorové buňky posílením pentozofosfátového cyklu, který mimo jiné slouží i k produkci NADPH. Pentozofosfátový cyklus je pro rakovinnou buňku velmi důležitý, proto je u nich nalézán dimer izoformy pyruvátkinázy M2, který na rozdíl od izoformy M1 (nalézá se u netransformovaných buněk) zpomalí konverzi fosfoenolpyruvátu na pyruvát a dovolí tak buňce využít část glukózy právě v pentozofosfátovém cyklu. Vysoká rychlost glykolýzy a menší zapojení respirace však vyústí do vyšší potřeby reoxidovat stále vznikající NADH. Tento problém řeší transformované buňky zvýšenou produkcí laktátdehydrogenázy, pomocí které dochází k přeměně pyruvátu a na laktát a oxidaci NADH na NAD^+ . Nadměrná tvorba laktátu způsobí sice poté vznik nefyziologického pH vnitřního prostředí, ale tomu se nádorová buňka dokáže ubránit například nadměrnou expresí přenašečů Na^+/H^+ (NHE1) a monokarboxylových transportérů MCT, pomocí nichž reguluje hladinu pH na stabilní hodnotě. Okyselení vnějšího prostředí poskytuje pro nádorové buňky řadu dalších selekčních výhod (inhibici cytotoxických T-lymfocytů, podporu při možné invazi buněk) [82, 135]. Acidóza extracelulárního prostředí indukuje apoptózu pouze v buňkách s funkčním proteinem p53, čímž dochází k další selekci buněk rezistentních k toxicitě kyselého pH a také selekci buněk se zvýšenou schopností invaze [86].

Velmi zajímavý je metabolismus samotného laktátu v různých regionech téhož nádoru. Ukázalo se, že hypoxické regiony (glykolytické buňky) spíše spotřebovávají glukózu a produkují ATP procesem anaerobní glykolýzy. Konečný produkt tohoto procesu

je laktát, který je pak koncentračním gradientem rozptýlen v extracelulárním prostředí. V místech s normální koncentrací kyslíku (oxidační nádorové buňky) je tento laktát importován do buněk pomocí MCT1 transportéru a metabolizován směrem k produkci ATP v dýchacím řetězci. Obrázek 12 popisuje rodinu symportérových proteinů MCT (laktát/H⁺), které se zásadně podílí na regulaci buněčné odpovědi na laktátovou acidózu [81, 82]. Nedávné výzkumy prokázaly, že vysoká produkce laktátu pozitivně koreluje s agresivitou nádoru a špatnou prognózu [140, 141].



Obrázek 12 – Metabolická komunikace mezi glykolytickou a oxidativní nádorovou buňkou [140, 141]

3.10.2 MCT transportéry

Pasivní MCT transportéry jsou součástí velké proteinové rodiny kódované geny skupiny *SLC16*, která obsahuje 14 členů. Předpokládá se, že jejich molekula obsahuje 12 transmembránových domén s intracelulární amino a karboxylovou skupinou a velkou hydrofobní intracelulární smyčkou mezi transmembránovou doménou 6 a 7. Jejich aktivita a ukotvení na plazmatické membráně vyžaduje interakci s chaperonovými proteiny basigin/CD147 a embigin/gp70.

Pouze u izoform MCT1 až MCT4 bylo potvrzeno, že se podílejí na kotransportu monokarboxylových molekul (L-laktátu, pyruvátu, ketolátek – acetoacetátu a D-β-hydroxybutyrátu) a protonů. Každá izoforma má své jedinečné biochemické vlastnosti včetně specifity substrátu, kinetických konstant a citlivosti inhibitorů. Dále se liší v tkáňové distribuci a intracelulární lokalizaci. MCT1 a MCT2, které jsou exprimované zejména v buňkách červených vláken kosterní svaloviny, srdce a neuronech, mají vysokou afinitu k pyruvátu a L-laktátu. Nedávné výzkumy také ukázaly, že mimo přirozené monokarboxylové molekuly slouží také jako transportéry pro 3-brompyruvát (alkylační činidlo) a dichloracetát (inhibitor pyruvátdehydrogenázy kinázy). Hlavní úlohou MCT1 je usnadnit společný transport L- laktátu s ekvimolárním množstvím vodíkových iontů, který

je řízen jejich koncentračními gradienty napříč plazmatickou membránou. Transportovaný laktát je využit zejména v Krebsově cyklu a následně v aerobní oxidaci. MCT4 slouží hlavně pro export laktátu produkovaného glykolýzou, a tím zajišťuje regeneraci cytosolického NAD⁺. Vyskytuje se ve vysoce glykolytických tkáních jako jsou bílá vlákna kosterní svaloviny, astrocyty, leukocyty, chondrocyty a v reakci na hypoxii je upregulována ve všech buňkách. Poslední transportér – MCT3 je lokalizován na buňkách choroidního plexu a v buňkách sítnice, kde spolupracuje s MCT1 [140, 141].

3.10.3 MCT transportéry v nádorových buňkách

Vzhledem k tomu, že závislost na glykolýze je charakteristickým znakem maligních nádorů, není překvapením, že právě MCT jsou nadměrně exprimovány v mnoha solidních nádorech (mozku, tlustého střeva, jater, ovaria, plic a také močového měchýře atd.) [140]. Ve většině normálních tkáních je MCT1 zodpovědný za export laktátu přes plazmatickou membránu do extracelulárního prostoru, nicméně v nádorových buňkách je využíván pro export spíše transportér MCT4. Naopak MCT1 je využíván jako transportér pro přenos laktátu do intracelulárního prostoru a to zejména u dostatečně okysličených nádorových buněk využívajících mimo jiné také oxidativní metabolismus [141]. Způsob transportu laktátu a pyruvátu přes plazmatickou membránu je uveden na obrázku 13.

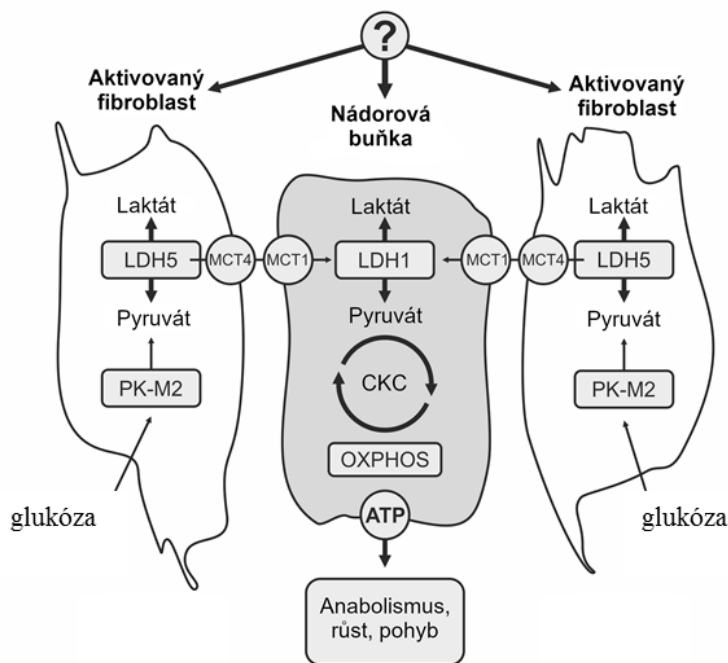
Přestože hlavním úkolem MCT transportérů je transport laktátu spíše než regulace pHi, nedávné studie na melanomových a neuroblastomových buněčných liniích ukázaly, že inhibicí MCT1 se snižuje pHi při zachování nízkého pHe a dochází tak ke snížení životaschopnosti buněk [140]. Buňky CCL39 (buněčná linie plicních fibroblastů) expimovaly za normálních okolností pouze MCT1 a MCT2 a po přidání specifického inhibitoru u nich také docházelo ke snížení intracelulárního pHi. Po přidání oligomycinu se u buněk logicky zvýšila glykolýza, která měla za následek další snižování pHi. U buněk došlo k ektopické expresi MCT4 s následným efluxem protonů. To dokládá fakt, že transportér MCT4 hraje výraznou roli i při regulaci pHi [142]. Tyto výsledky byly dále ještě potvrzeny *in vivo* [143]. Z výše uvedeného vyplývá, že pro dosažení efektu požadované terapeutické odpovědi by bylo vhodné inhibovat oba transportéry najednou. Výsledky studií ukazují, že využitím obou přístupů současně docházelo u buněk k poklesu pHi, což mělo za následek i snížení růstu nádorových buněk [144]. Tabulka 10 uvádí seznam několika obecných i selektivních inhibitorů.

U karcinomu močového měchýře se pro export laktátu přes plazmatickou membránu využívají zejména izoformy MCT1 a MCT4. V mnoha typech nádorů byla nalezena pozitivní korelace mezi expresí chaperonových proteinů pro MCT a MCT samotnými. U karcinomu močového měchýře a ovárií se ukázala významná koexprese CD147 a MCT1, u karcinomu plic CD44 a MCT1. Pozitivita nádorových buněk na výše zmíněné markery (CD147/MCT1) se podle recentních studií ukazuje jako potenciální prediktor špatné prognózy. Experimentálně indukovaná snížená exprese proteinu CD147 pak dokonce zvyšovala chemosenzitivitu buněk karcinomu močového měchýře na cisplatinu

[145]. Pozitivní korelace mezi CD147 a MCT4 se ukázala také u karcinomu prostaty a plic [141].

Tabulka 10 – Inhibitory MCT transportérů [141]

Inhibitor	MCT1	MCT2	MCT4
Phloretin	ano	ano	ano
Quercetin	ano	ano	nestanoveno
DIDS (4,4'-diisothiokyanostilben-2,2'-disulfonát)	ano	nestanoveno	ne
DBDS (4,4'-dibenzamidostilben-2,2'-disulfonát)	ne při 0,1 mM	56% inhibice při 0,1 mM	nestanoveno
NPPB (5-nitro-2-(3-fenylpropylamino)-benzoát)	ano	nestanoveno	ano
CHC (α -kyano-4-ydroxycinnamát)	ano	ano	ano
AR-C155858	ano (krysa)	nesignifikantní inhibice (krysa)	nestanoveno
AZD3965	ano	ano	nestanoveno
7ACC2	50% inhibice při 11 nM		



Obrázek 13 – Metabolická komunikace mezi nádorově asociovanými fibroblasty a maligními buňkami. Nádorové buňky se vyznačují rychlou proliferací, která vyžaduje vysokou spotřebu energie, nádorově asociované fibroblasty dodávají nádorovým buňkám látky bohaté na energii (laktát a pyruvát) [96]

3.11 Ostatní nádory močového měchýře

Více než 90 % nádorů močového měchýře vychází z přechodného epitelu, zbytek novotvarů tvoří nádory z jiných epiteliálních buněk, mezenchymu (sarkom) a metastazující či raritní nádory, jako je feochromocytom, lymfom, choriokarcinom, melanom, karcinosarkom a další [17].

3.11.1 Inflamatorní myofibroblastický tumor močového měchýře

Inflamatorní myofibroblastický tumor (IMT) je velmi vzácnou malignitou mezenchymálního původu, který byl popsán na mnoha místech v lidském těle včetně plic, mozku, retroperitonea, ledvin, prostaty či močového měchýře. Nejčastěji postihuje pacienty v dětském nebo mladším dospělém věku, průměrný věk nemocných, kteří mají postižený močový měchýř, je 39 let. [146]. Etiologie IMT je poměrně záhadná, ale nejčastěji bývá jeho vznik dáván do souvislosti s chronickou infekcí ať už bakteriální nebo virovou [147, 148]. Některé práce ukazují, že by se při vzniku tohoto nádoru mohla uplatňovat spíše autoimunita [149].

Tumor roste velmi pomalu a zřídka vykazuje klinicky agresivní chování. Nebezpečným se stává v okamžiku, kdy se u pacienta s anamnézou IMT vyskytne karcinom močového měchýře. V tomto případě se výrazně zvyšuje progresse nově vzniklého karcinomu močového měchýře a následky bývají pak pro pacienta fatální [150]. IMT je obvykle popisován jako ohraničená, lobulovaná nebo multinodulární pevná šedobílá nebo žlutá léze, která dosahuje velikosti až 20 cm. V močovém měchýři se obvykle nalézají léze v průměru okolo 4,5 cm, které mají různý histologický původ. Většinou se však jedná o tumor vycházející z myofibroblastů nebo fibroblastů s infiltrací plazmatických buněk, neutrofilů a lymfocytů. Téměř většina buněk z IMT lézí je imunohistochemicky pozitivních na vimentin (95 –100 %) a hladkosvalový aktin (48 – 100 %), svalově specifický aktin (62 %) a některé tumory (zejména genitourinární IMT) jsou pozitivní na desmin (5 – 80 %) či dokonce keratin (LMWCK, 10 –89 %) [151, 152]. Přibližně polovina všech tumorů vykazuje pozitivní imunohistochemické barvení na ALK (anaplastická lymfom kináza), nicméně není tento marker zatím používaný v rutinní diagnostice [151]. Nedávné studie lézí myofibroblastického tumoru ukázaly také abnormality v karyotypu buněk. Přibližně 50 – 60 % z nich mělo aberaci na krátkém raménku chromozomu 2 (konkrétně 2p23). V této oblasti se nalézá již zmíněný gen *ALK*, který kóduje anaplastickou lymfomovou kinázu. Přestavba *ALK* genu vedla v řadě případů k translokacím a fúzím s jinými geny jako jsou např. *CLTC*, *RANBP2*, *TPM3*, *TPM4*, *CARS* a *ATIC*. [146, 153]. U IMT močového měchýře byly pozorovány zejména přestavby *ALK-ATIC*, *ALK-TPM3*, *ALK-TPM4*, *ALK-CLTC* či *ALK-HNRNPA1* [154–157].

Dosud není jasné, zda je diagnóza IMT na základě morfoloické, imunohistochemické či molekulární úrovni zcela oddělitelná od jiných raritních lézí (pseudosarkomatózní myofibroblastické proliferace či tzv. postoperative spindle cell nodule). Podrobnější porozumění tomuto onemocnění s nejistým maligním potenciálem by mohlo přinést zlepšení jak při diagnostice, rutinním sledování pacientů, tak i omezení

mnohdy zbytečně dosti agresivní a drahé terapie. Jako slibný možný marker se jeví právě gen ALK, jehož přestavba nebo imunohistochemická odezva produktu genu *ALK* by mohly mít na vznik onemocnění klíčový vliv [158]. Slibně se také ukazuje dvojitá pozitivita ALK⁺/p80⁺, jak publikoval Kato *et al.* [159].

4 Materiál a metody

4.1 Základní buněčná kultivace

Veškeré použité permanentní či primární buněčné linie byly kultivovány podle optimalizovaného protokolu v suplementovaných mediích při teplotě 37 C, 5% koncentraci CO₂ a 100% vlhkosti (Sanyo, Japonsko). Před pasážováním (0,5 % prasečí trypsin, 0,2 % EDTA v Hanksově solném roztoku, Sigma, Praha, ČR) byly buňky vždy opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS). Následně byly v požadované koncentraci buňky použity k analýzám či vysety na vhodný tkáňový plastik. Tabulka 11 uvádí seznam použitých permanentních a primárních buněčných linií a jejich požadavky na buněčnou kultivaci.

Tabulka 11 – Seznam použitých permanentních a primárních buněčných linií

Buněčná linie	Základní medium	Suplementy	Zdroj buněčné linie
BC44 BC61 BC44Fibr	high glucose (4,500 mg/l) - Dulbecco's modified Eagle's medium	EGF (0,5 ng/ml) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) NEA (1 %) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA)	Buněčné linie byly odvozeny na Urologické klinice Heinrich-Heineho univerzity v Düsseldorfu v rámci spolupráce s prof. W.A. Schulzem [46, 160, 161]
BC44GFP	/EpiLife (poměr 1:1) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) ČR	BPE (12,5 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) ITS (1 %) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA)	Buněčná linie byla získána ve spolupráci s Dr. C. Strell z Nádorového centra Karolinska, Stockholm
BC44DoxoR (doxorubicin rezistentní linie)		Glycin (3 mM) (Sigma, ČR) Penicilin 100 U/ml (Sigma, ČR) Streptomycin 100 µg/ml (Sigma, ČR) 5 % teplem inaktivované FBS (Sigma, ČR)	Buněčná linie byla odvozena na Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni [162]

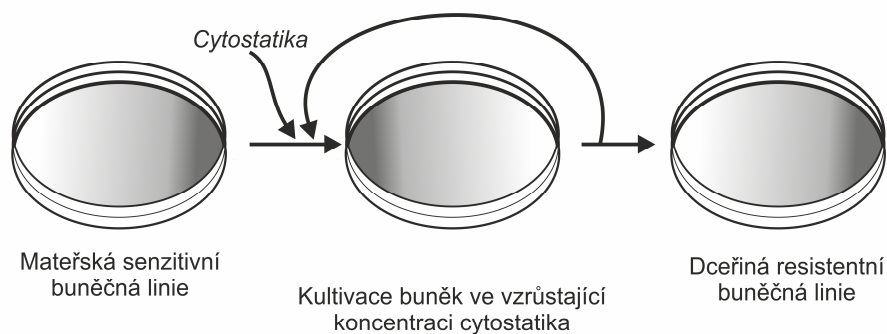
Buněčná linie	Základní medium	Suplementy	Zdroj buněčné linie
SW780	high glucose (4,500 mg/l)- Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma, ČR)	10 % teplem naktivované FBS (Sigma, ČR) Penicilin 100 U/ml (Sigma, ČR) Streptomycin 100 µg/ml (Sigma, ČR)	Buněčné linie byly použity v rámci spolupráce s Dr. Z. Czubou [163]
SW780GFP			Buněčná linie byla získána ve spolupráci s Dr. C. Strell z Nádorového centra Karolinska, Stockholm
RT112			Buněčné linie byly použity v rámci spolupráce s prof. W.A. Schulzem z Urologické kliniky Heinrich-Heineho univerzity v Düsseldorfu [164, 165]
RT112Heidelberg			
RT112D21 (doxorubicin rezistentní linie)			
HT1197	Buněčné linie byly použity v rámci spolupráce s prof. V. Mandysem Patologického ústavu 3. LF UK v Praze [166]		
SCP1	alpha-MEM (Sigma, ČR)	10 % teplem inaktivované FBS (Sigma, ČR) Penicilin 100 U/ml (Sigma, ČR) Streptomycin 100 µg/ml (Sigma, ČR)	Buňky byly použity s laskavým dovolením prof. W. Böckera z Chirurgické kliniky Univerzitní nemocnice v Mnichově [167]
MBT	alpha-MEM/DMEM (poměr 1:1) (Sigma, ČR)	10 % teplem inaktivované FBS (Sigma, ČR) Penicilin 100 U/ml (Sigma, ČR) Streptomycin 100 µg/ml (Sigma, ČR)	Buněčná linie byla odvozena na Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni
Primární mezenchymální kmenové buňky (MSC)	alpha-MEM without Nucleosides with L-Glutamin (PAA, USA)	10 % pHPL (pooled human platelet lysate, místní zdroj – FN Plzeň) 560 IU heparin (Biochrome, Německo)	Buňky byly získány v rámci spolupráce s Hematologicko-onkologickým oddělením Fakultní nemocnice v Plzni

Buněčná linie	Základní médium	Suplementy	Zdroj buněčné linie
Primární mononukleární periferní krve (PBMC)	RPMI 1640 (Lonza, Švýcarsko)	10 % pHPL (pooled human platelet lysate, místní zdroj – FN Plzeň) 560 IU heparin (Biochrome, Německo)	Buňky byly získány v rámci spolupráce s Hematologicko-onkologickým oddělením Fakultní nemocnice v Plzni

Lidská buněčná linie nádorově asociovaných fibroblastů BC44Fibr a nádorová buněčná linie BC44 byly odvozeny z papilární části progresivního nádoru močového měchýře (pT4, G3) [90, 161] a kultivovány podle Seiferta *et al.* [160]. Lidská buněčná linie uroteliálního karcinomu HT1197 byla získána v rámci spolupráce s prof. MUDr. Václavem Mandyssem, Ph.D. z Patologického ústavu 3. LF v Praze a kultivována podle Kuncové *et al.* [166]. Buněčné linie hTERT-BJ1 – Human telomerase-immortalized normal foreskin fibroblasts (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, California, USA) a Cal-29 byly kultivovány podle optimalizovaných protokolů [168, 169]. Lidské primární mezenchymální buňky MSC (kontrolní buněčná linie) byly izolovány z kostní dřeně zdravého dárce pomocí gradientové centrifugace (LSM 1077 medium, PAA, USA) a následnou adherentní separací na kultivační lahvi (175 cm² culture flask; Corning, USA). Imortalizovaná buněčná linie mezenchymálních buněk SCP1 [167] byla získána jako dar od prof. MUDr. Wolfganga Böckera, Ph.D. z Chirurgické kliniky Univerzitní nemocnice v Mnichově. PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) zdravých dárců byly izolovány gradientovou centrifugací (Histopaque-1077, Sigma, ČR) a dále kultivovány v kultivačním médiu RPMI 1640 (Lonza, Švýcarsko) ve finální koncentraci 1 x 10⁶ buněk/ml.

Stabilního fluorescenčního značení buněčných linií BC44GFP a SW780GFP bylo dosaženo pomocí lentivirální transdukce expresního vektoru kódujícího zelený fluorescenční protein (green Fluorescent Protein, eGFP). 25 000 buněk bylo vysazeno na 24jamkovou destičku (Corning, USA) v DMEM médiu obsahující 10 % FBS a 25 µg/ml protamin sulfátu (Sigma, ČR). Dále bylo přidáno 50 µl „ready-to-use“ eGFP-Lentivirus (pLV.ExSi.P/Neo-EF1α-eGFP; Cyagen, Biosciences Inc., USA) a buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C a 5 % CO₂.

Dceřiná buněčná linie BC44DoxoR byla odvozena kultivací BC44 buněk ve zvyšující se koncentraci doxorubicinu (počáteční koncentrace 100 nM, konečná koncentrace 400 nM doxorubicinu) v časovém intervalu tří měsíců. Schéma způsobu odvození buněčné linie BC44DoxoR je uvedeno na obrázku 14.



Obrázek 14 – Schéma způsobu odvození chemorezistentní dceřiné linie BC44DoxoR ve vzrůstající koncentraci doxorubicinu po dobu 3 měsíců

Lidská buněčná linie MBT byla odvozena z inflamatorního ALK pozitivního myofibroblastického tumoru močového měchýře v oblasti vertexu u pacientky Urologické kliniky Fakultní nemocnice v Plzni. Vzorek nádoru byl bezprostředně po excizi umístěn do média (DMEM/MEM) a transportován na Ústav biologie Lékařské fakulty v Plzni. Izolace buněk probíhala sterilně v laminárním boxu, kde byl tumor nejdříve promyt roztokem fosfátového pufru a poté rozmělněn pomocí nůžek a skalpelu. Získaný homogenát byl štěpen použitím komerční směsi hydrolytických enzymů Liberáza o koncentraci 0,2 U (Liberase™ TM Research Grade, Sigma, Praha, ČR) po dobu 2 hodin a 37°C. Po té byla směs řádně promíchána, stočena a získaný supernatant byl přefiltrován (filtr 100 µm). Standardní buněčná kultivace probíhala ve směsném médiu sestávajícím se ze suplementovaných médií MEM a DMEM v poměru 1:1 (Sigma, ČR).

4.2 Karyotypická a genomická analýza

Karyotyp buněčných linií BC44Fibr, BC44, RT112, RT112Heidelberg, RT112D21 a MBT byl analyzován použitím standardních protokolů [170, 171] a hodnocen rutinní technikou G pruhů. Buněčný cyklus byl zastaven pomocí kolchicinu (Colcemid 10 µg/ml, Biological Industries, Cromwell, CT, USA; 100 µl v 5 ml kultivačního média) po dobu 4 hodin a teplotě 37°C. Poté byly buňky sklizeny do hypotonického média, které neobsahovalo sérum (Flushing Medium, CytoGen, Wetzlar, Německo) a fixovány pomocí fixačního roztoku metanolu a kyseliny octové v poměru 3:1. Zmražená buněčná suspenze byla na sklíčku obarvena Giemsovým barvivem. Pro analýzu chromozomových přestaveb a počtu klonů u jednotlivých buněčných linií byla použita metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) pomocí kitu 24Xyte, Human Multicolor FISH Probe, D-0125-060-DI (MetaSystems Probes, Německo). Po denaturaci buněčné DNA fixované na cytogenetickém preparátu a hybridizaci sondy ke komplementárním úsekům cílové DNA byly fluorescenční signály analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Karyotypické analýzy byly provedeny ve spolupráci s Ústavem lékařské genetiky Fakultní nemocnice v Plzni [172].

Detekce kvantitativních změn na celém genomu BC44Fibr byla provedena metodou komparativní genomické hybridizace (aCGH) s použitím SurePrint G3 neomezené CGH ISCA v2, 8x60K mikroarray. Značení a hybridizace byly prováděny podle protokolu výrobce a snímky byly skenovány pomocí skeneru SureScan Microarray a analyzovány pomocí softwaru Agilent CytoGenomics (vše od Agilent Technologies, USA). Analýza, vyhodnocení a statistické zpracování dat bylo součástí kurzu s názvem Analýza aCGH microarray pro genomickou analýzu DNA pořádaném firmou Agilent Technologies v Praze.

4.3 Genetická identita buněčných linií

Analýza genetické identity buněčných linií BC44, BC44Fibr, RT112, RT112Heidelberg a RT112D21 byla provedena na Urologické klinice Heinrich-Heineho univerzity v Düsseldorfu v rámci spolupráce s prof. W.A. Schulzem [46]. Genetická identita buněčné linie MBT byla provedena komerčně společností Generi Biotech, s.r.o., Zkušební laboratoří č. 1650 akreditovanou ČIA podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.

4.4 Analýza aktivovaného fenotypu fibroblastů, analýza kmenového fenotypu a vyhodnocení epiteliálně-mezenchymální tranzice u nádorových buněk

Pro analýzu aktivovaného fenotypu nádorově asociovaných fibroblastů BC44Fibr bylo vybráno několik proteinových markerů – vimentin, hladkosvalový aktin alfa (α SMA), fibroblastový aktivační protein (FAP) [92], nádorový supresor p53 a specifický marker suburotelialních myofibroblastů connexin 43 [173, 174], které byly analyzovány nepřímou imunofluorescencí.

Expresе běžného markeru CD90 u buněčných linií BC44Fibr, BC44 a SW780 byla značena pomocí přímé imunofluorescence [120, 175].

Pro vyhodnocení epiteliálně-mezenchymální tranzice u buněčné linie RT112Heidelberg byly vybrány dva hlavní proteiny – vimentin a E-cadherin, které byly hodnoceny nepřímou fluorescencí.

Kmenové markery u nádorových buněčných linií RT112Heidelberg, BC44 a SW780 byly analyzovány pomocí nepřímé fluorescence (CK17, pERK, 67LaR, P-cadherin a CD90).

Buňky narostlé na krycím sklíčku byly opláchnuty fosfátovým pufrém a ihned fixovány ledovým 100% methanolem nebo 4% paraformaldehydem přes noc. Poté bylo sklíčko třikrát opláchnuto fosfátovým pufrém a ohraničeno po obvodu slabou vrstvou hydrofobního fixu Dako Pen (Agilent Technologies, USA). Při značení intracelulárních proteinů bylo potřeba permeabilizovat plazmatickou membránu 15 minut permeabilizačním roztokem (Image-iT® Fixation/Permeabilization Kit, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Poté byla sklíčka opatrně promyta fosfátovým pufrém po dobu 2 –5 minut a byl přidán na 60 minut blokovací roztok (3 % BSA, Thermo

Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Značení primárními protilátkami probíhalo přes noc při teplotě 4 C, aplikace primárních značených protilátek probíhala vždy přesně podle pokynů výrobce. Sekundární protilátky byly aplikovány po řádném promytí na dobu 60 minut ve tmě při pokojové teplotě. Výsledné preparáty byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81 vybaveným kamerovým systémem Hamamatsu Orca (Olympus, Tokyo, Japonsko).

Pro kvantitativní analýzu exprese adhezních molekul CD90 byla buněčné linie SW780GFP analyzována na průtokovém cytometru. 100 µl buněčné suspenze obsahující 10^7 buněk bylo značeno protilátkami CD90 APC po dobu 15 minut ve tmě a po důkladném promytí byla kvantitativní exprese měřena průtokovým cytometrem BD FACS Aria-Fusion se softwarem Diva (Beckman Coulter, USA). Kvantitativní hodnocení CD 90 probíhalo u buněk SW780, které byly kultivovány samostatně, v kokultivaci s BC44Fibr a MBT nebo kultivovaných samostatně v prostředí dvou běžně užívaných cytostatik (doxorubicin a cisplatin) po dobu 72 hodin. Data byla analyzována pomocí softwaru FlowJ v10 (FlowJ, LLC, USA). Expresse hladiny povrchových markerů CD90 byla statisticky zpracována pomocí Mann-Whitney U-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

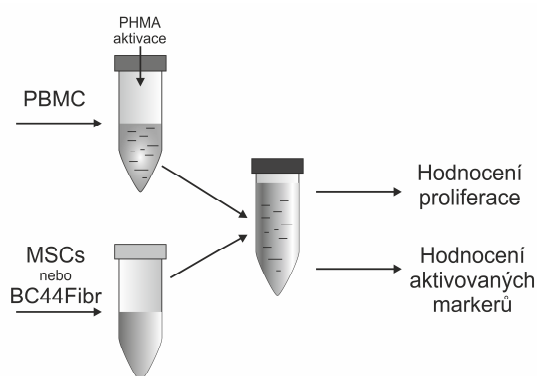
4.5 Analýza kmenového fenotypu u rodiny buněčných linií RT112 pomocí průtokového cytometru

Dceřiné buněčné linie RT112Heidelberg a doxorubicin rezistentní RT112D21 (obě odvozené od parentální linie RT112) byly kultivovány do různých stupňů buněčných denzit. Poté byla pomocí průtokového cytometru BD™ LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) kvantifikována exprese vybraných markerů – CD90, CD44, CD49f a CD47. Vzorky byly inkubovány 20 minut při pokojové teplotě s primární neznačenou protilátkou, promyty roztokem 0,09 % azidu sodného a 0,2 % želatiny v PBS, a následně značeny 20 minut sekundární protilátkou při pokojové teplotě ve tmě. Vzorky značené přímo byly inkubovány 20 minut s primárně značenými protilátkami (Tabulka 12). Po promytí bylo k vzorkům přidáno barvivo Hoechst 33342 (0,1 µg/ml, Sigma, ČR) a vzorky změřeny na průtokovém cytometru BD™ LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Výsledky byly získány ve spolupráci s laboratoří Dr. K. Drbala z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze [161].

4.6 Analýza imunosupresivního fenotypu pomocí průtokové cytometrie

Primární mononukleáry periferní krve (PBMC) od 15 zdravých dárců byly izolovány centrifugací v gradientu (Histopaque-1077, Sigma, ČR) a naředěny na finální koncentraci 1×10^6 /ml. Mezenchymální kmenové buňky (lidské primární mezenchymální buňky a buněčná linie SCP-1) a BC44Fibr (nádorově asociované fibroblasty) byly smíchány s fytohemaglutininem stimulovanými (PHMA, Sigma, Praha, ČR) a nestimulovanými PBMC v poměru 1:2 a kokultivovány ve 2 ml RPMI 1640 média (Lonza, Švýcarsko) při

37 °C a 5 % CO₂. Po třech dnech byla provedena cytometrická analýza aktivačních markerů CD69 a CD25 na buňkách pozitivních na CD3. 200 µl buněčné suspenze bylo inkubováno s CD45-ECD, CD3-FITC, CD25-PC5, CD69-PC7 (Beckmann Coulter, USA) při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Následně byly buněčné suspenze lyzovány pomocí lyzačního roztoku Optylise C (Beckman Coulter, USA) a centrifugovány při 1500 RPM po dobu 5 minut. Analýza proběhla na cytometru FC500 vybaveným softwarem CXP (Beckman Coulter, USA). Data byla statisticky hodnocena pomocí neparametrického Wilcoxonova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Schéma experimentu je uvedeno na obrázku 15. Analýzy byly provedeny na základě spolupráce Ústavem imunologie a alergologie a Hematologicko-onkologickým oddělením Fakultní nemocnice v Plzni.



Obrázek 15 – Schéma experimentu analýzy imunosupresivního fenotypu pomocí průtokové cytometrie

Tabulka 12 – Seznam použitých protilátek při analýze přímé a nepřímé fluorescence a analýze průtokovým cytometrem

Antigen	Primární protilátka (značená, neznačená)	Sekundární protilátka	Metoda	Typ buněk
Vimentin	Mouse monoclonal, clone VIM-13.2 (Sigma, Praha, ČR)	Goat α -mouse IgM – FITC (Sigma, Praha, ČR)	IF	BC44Fibr, RT112Heidelberg MBT
α SMA	Mouse monoclonal, clone 1A4 (Sigma, Praha, ČR)	Goat α -mouse IgG-R (Santa Cruz, Dallas, TX, USA)	IF	MBTr
α SMA	Mouse monoclonal, clone 1A4 (Sigma, Praha, ČR)	Goat α -mouse IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	BC44Fibr

Antigen	Primární protilátka (značená, neznačená)	Sekundární protilátka	Metoda	Typ buněk
FAP	Mouse monoclonal, clone 1E5 (Sigma, Praha, ČR)	Goat α -mouse IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	BC44Fibr
p53	Mouse monoclonal, clone DO1 (Sigma, Praha, ČR)	Goat α -mouse IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	BC44Fibr
Connexin 43	Connexin 43 IgG, Rabbit polyclonal (Bioss, Woburn, Massachusetts, USA)	Goat α -rabitt IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	BC44Fibr
CD90	Mouse monoclonal, clone 5E10 – FITC (BD Pharmingen – BD Biosciences, San Jose, CA, USA)		IF	BC44
CD90	Mouse monoclonal, clone 5E10 – APC (Biolegend, San Diego, CA, USA)		FC	BC44Fibr BC44 SW780 MBT
CD90	Anti-CD90/Thy1 antibody [EPR3133] (Alexa Fluor® 594)		IF	SW780 BC44 MBT
CD44	Vyvinuto na UMG, clone MEM-85		FC	RT112Heidelberg
CD44	Rat monoclonal, clone IM7 – PE 594 (Biolegend, San Diego, CA, USA)		FC	RT112Heidelberg
CD47	Mouse monoclonal, clone CC2C6 – PE (Biolegend, San Diego, CA, USA)		FC	RT112Heidelberg
CK17	Mouse monoclonal, clone CK-E3 (Sigma, Praha, ČR)	Goat α -mouse IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	BC44 SW780 RT112Heidelberg

Antigen	Primární protilátka (značená, neznačená)	Sekundární protilátka	Metoda	Typ buněk
CD44v6	Mouse monoclonal, clone VVF-7 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA)	Goat α -mouse IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	HT1197
CD3	CD3-FITC (Beckman Coulter, USA)		FC	PBMCs
CD25	CD25-PC5 (Beckman Coulter, USA)		FC	PBMCs
CD45	CD45-ECD (Beckman Coulter, USA)		FC	PBMCs
CD69	CD69-PC7 (Beckman Coulter, USA)		FC	PBMCs
E-cadherin	VENTANA anti-E-cadherin (36) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Roche, Švýcarsko)	Goat α -mouse IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	RT112Heidelberg
P-cadherin	A-10: sc-74545 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA)	Goat α -mouse IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	BC44
pERK	Mouse monoclonal IgG _{2a} , sc-7383 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA)	Goat anti-mouse IgG _{2a} -R: sc-2085 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA)	IF	RT112Heidelberg
67LaR	Anti-67kDa Laminin Receptor antibody (Abcam, UK)	Goat α -rabbit IgG – Atto 488 (Sigma, Praha, ČR)	IF	SW780 BC44
ALK	VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Roche, Švýcarsko)	Goat Anti-Rabbit IgG – Atto 488 antibody (Sigma, Praha, ČR)	IF	MBT
CD90	Rabbit monoclonal anti-CD90/THY1 (Abcam, UK)	OmniMab anti-Rb-HRP, Ventana (Roche, Švýcarsko)	IHC	tkáňové řezy nádorů karcinomu močového měchýře

4.7 Vyhodnocení buněčné proliferace PBMC pomocí průtokového cytometru

K hodnocení buněčné proliferace pomocí průtokové cytometrie byl použit BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (BD Pharmingen – BD Biosciences, San Jose, CA, USA). PBMC stimulované fytohemaglutininem (2,5 mg/ml roztok fytohemaglutininu) byly smíchány s MSC nebo BC44Fibr ve finální koncentraci 1×10^5 /ml, doplněné médiem RPMI 1640 (Lonza, Švýcarsko) na výsledný objem 2 ml a inkubovány 72 hodin při teplotě 37 °C. Značení buněk probíhalo přesně podle doporučení výrobce BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (BD Pharmingen BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA) a výsledná data byla analyzována pomocí Multicycle AV software (Phoenix Flow System, USA). Množství dělicích se buněk bylo stanoveno jako součet buněk v S a G2/M fázi buněčného cyklu. Analýzy byly provedeny na základě spolupráce s Ústavem imunologie a alergologie a s Hematologicko-onkologickým oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. Data byla statisticky hodnocena pomocí neparametrického Wilcoxonova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4.8 Mikroskopická analýza chemorezistentního fenotypu

Mateřská buněčná linie BC44 a odvozená dceřiná buněčná linie BC44DoxoR byly kultivovány do stadia 80 % konfluence a po té byla aplikována cytostatika ve výsledných koncentracích roztoků: 5 μ g/ml cisplatiny (Cisplatin Hospira 0,5 mg/ml, Hospira, Velká Británie), 25 μ g/ml metotrexátu (Metotrexate Hospira 25 ml/ml, Hospira Velká Británie), 0,2 μ g/ml doxorubicinu (Doxorubicin Teva 2 mg/ml, Teva Pharmaceuticals ČR), 3,8 μ g/ml gemcitabinu (Gemcirena 38 mg/ml, Fresenius Kabi, ČR) a 0,1 μ g/ml vinblastinu (Vinblastin Teva 1 mg/ml, Vinblastini sulfas, Teva Pharmaceuticals ČR) (Tabulka 13). Po 96 hodinách byly buněčné kultury fotograficky dokumentovány prostřednictvím zobrazovacího systému Olympus IX81 – CellR (kamera Hamamatsu Orca-ER, invertovaný mikroskop Olympus IX 81 (Olympus; Tokyo, Japonsko) [162].

4.9 Transmisní elektronová mikroskopie

Ultrastrukturální organizace buněk BC44Fibr včetně klíčových znaků nádorově asociovaných fibroblastů byla posouzena pomocí elektronové transmisní mikroskopie [176, 177]. Nádorově asociované fibroblasty BC44Fibr byly vysety v různých ředěních na krycí sklíčka, následně fixovány 2 % glutaraldehydem (Agar Scientific, Stansted, Essex, Velká Británie) a poté ještě 1% OsO₄ v Sorensenově pufru (0,1 M, pH 7,2 – 7,4). Následně byla sklíčka dehydratována a zalita epoxidovou pryčičicí Epon-Durcupan (Sigma, Praha, ČR). Ultrastrukturální analýzy ultratenkých řezů (70 – 90 nm) byly provedeny transmisním elektronovým mikroskopem Morgagni 268 při napětí 80 kV

a mikroskopem TECNAI G2 20 LaB6 při napětí 200 kV. Pro zvýraznění kontrastu ultrastruktur byla na ultratenké řezy aplikována uranylacetáza (Agar Scientific Stansted, Essex, Velká Británie). Obrazy byly zachyceny fotoaparátem Mega View III CCD (Olympus Soft Imaging Solutions, Tokyo, Japonsko). Analýzy proběhly ve spolupráci s ÚMG AV ČR v Praze, oddělení Biologie buněčného jádra [90].

4.10 Kontrakční kolagenový test

Schopnost stromálních buněk BC44Fibr kontrahovat kolagenový gel je jedním z typických znaků aktivovaných fibroblastů [178]. Analýza byla provedena pomocí komerčně dostupného gel-kontrahujícího kitu (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). Suspenze buněk BC44Fibr o koncentraci 2×10^6 byla smíchána s vychlazeným roztokem kolagenu v poměru 1:4. Do 24jamkové destičky bylo napipetováno vždy po 0,5 ml vzniklé směsi a po dobu 1 hodiny inkubováno při 37°C. Po polymerizaci kolagenu bylo do každé jamky ještě přidáno 1 ml kultivačního média a destička byla umístěna do 37°C. Fotografie volně plovoucích kolagenových gelů byly pořízeny ihned po jejich uvolnění ode dna jamky, dále po 24, 48 a 288 hodinách pomocí inverzního mikroskopu Olympus IX81 – CellR s příslušenstvím (Olympus, Tokyo, Japonsko) a analyzovány pomocí softwaru ImageJ (FIJI). Průměry plovoucích gelů byly statisticky zpracovány pomocí Mann-Whitney U-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4.11 Stanovení viability *in vitro* pomocí hodnocení funkce mitochondrií (MTT)

Pro stanovení viability buněk v prostředí různých koncentrací cytostatik byl použit test funkce mitochondriálních dehydrogenáz [162]. Na 96jamkovou destičku s rovným dnem (TPP, Švýcarsko) bylo nasazeno 7 000 buněk v celkovém objemu 200 μ l média. Buňky byly kultivovány 24 hodin ve standardním CO₂ inkubátoru při 37 °C (Sanyo, Japonsko). Po 24 hodinách bylo k buňkám přidáno 20 μ l roztoku cytostatika (Doxorubicin, Metotrexát, Vinblastin, Cisplatina, a Gemcitabin) v sestupných koncentračních řadách. (Tabulka 13). Po 48 hodinách bylo k buňkám přidáno 20 μ l žlutého roztoku MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid, Sigma, Praha, ČR) v koncentraci 5 mg/ml fosfátového pufru a kultivační destička byla ponechána 2,5 hodiny při 37 °C přikrytá alobalem. Poté bylo médium s cytostatiky opatrně odsáto a vzniklé fialové krystaly byly rozpuštěny ve 200 μ l rozpouštědla (DMSO a absolutní etanol v poměru 1:1) a za mírného protřepávání byly buňky ponechány při pokojové teplotě 30 minut. Ke kvantitativnímu vyhodnocení MTT testu byla využita metoda absorpční spektrofotometrie (BioTek, Winooski, Vermont, USA). Pro vybrané koncentrace testovaných látek byla sestavena časová závislost viability, kterou v logaritmicím měřítku reprezentuje sigmoidní křivka. Výsledné naměřené hodnoty absorbancí dvou souborů byly analyzovány pomocí neparametrického Mann-Whitney U testu pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$. Tento

pořadový test vyhodnotil statistickou významnost rozdílu mediánů dvou souborových hodnot, tedy hodnot absorbancí pro linie BC44 a linii BC44DoxoR resp., RT112, RT112Heidelberg a RT112D21. Koncentrace jednotlivých použitých cytostatik jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13 – Koncentrace aplikovaných cytostatik

Cytostatika	µg/ml fosfátového pufru							
	ředění							
	mg/ml	0x	10x	100x	1000x	10000x	100000x	1000000x
Cisplatina	0,5	500	50	5	0,5	0,05	0,005	0,0005
Doxorubicin	2	2000	200	20	2	0,2	0,02	0,002
Gemcitabin	38	38000	3800	380	38	3,8	0,38	0,038
Metotrexát	25	25000	2500	250	25	2,5	0,25	0,025
Vinblastin	1	1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001

4.12 Analýza chemorezistence v kokultivačním systému stromálních a nádorových buněk

Stromální fibroblasty BC44Fibr a nádorové buňky BC44 byly společně kokultivovány po dobu 5 dní. Poté byly po dobu 48 hodin vystaveny roztoku cisplatiny (0,5 µg/ml). Detekce mitochondriální apoptózy byla provedena pomocí kitu Mitocapture™ (BioVision Incorporation, CA, USA) a obrazová dokumentace byla pořízena inverzním mikroskopem Olympus IX81 – CellR s příslušenstvím (Olympus, Tokyo, Japonsko) [128].

4.13 Vyhodnocení buněčné proliferace pomocí xCelligence systému

xCelligence systém (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) monitoruje buněčné události v reálném čase měřením elektrické impedance pomocí mikroelektrod umístěných na dně každé kultivační jamky. RTCA software počítá buněčný index (CI, cell index) jako relativní změnu měřené impedance. 10 000 buněk ve 200 µl média bylo vysazeno na 16jamkovou destičku E plate 16 (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). Dynamika proliferace a růstu byla monitorována každých 15 minut po dobu 77 hodin. Analýza buněčné proliferace byla provedena přesně podle instrukcí výrobce (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). Vyhodnocením dat byly získány dvě základní charakteristiky buněčného růstu, rychlost růstu buněk v exponenciální fázi (k, směrnice) a čas zdvojení (DT, doubling time). Ke statistickému zpracování dat byl použit neparametrický Mann-Whitney U-test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4.14 Fenotypizace povrchových znaků buněčné linie RT112Heidelberg pomocí qPCR

Buněčná linie RT112Heidelberg byla kultivována do různých stupňů buněčných denzit. Z pelety buněk byla vyizolována RNA a vodou naředěna na koncentraci 12,5 ng/μl. Následně byla provedena reverzní transkripce. Pro zvýšení čistoty byly vzorky (8 μl vzorku + 2 μl H₂O) inkubovány s 2 μl DNázy I po dobu 10 minut a při teplotě 75 °C. K vzorkům byly následně přidány 2 μl RT MasterMix1 (1 μl náhodných hexamerů, 1 μl deoxynukleotidů v poměru 1:1:1:1). Po 5 minutách v 65°C a následném ochlazení na ledě bylo přidáno 6 μl RT MasterMix2 (4 μl pufru, 1 μl dithiotreitolu, 1 μl SuperScript III RT, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA).

Expresi vybraných transkripčních faktorů (*OCT-4*, *SOX-2*, *TWIST1*, *TWIST2*, *CEBPA*, *CEBPB*, *c-MYC*, *ZEB1*, *ZEB2*) a povrchových receptorů *CD44* a *CD133* byla analyzována pomocí qPCR. K qPCR MasterMix (8,2 μl H₂O, 10 μl SYBR Greenu, 0,4 μl forward primeru, 0,4 μl reverse primeru) byl přidán 1 μl vzorku. Parametry reverzní transkripce a qPCR jako je délka, počet a teplota cyklů jsou uvedeny v tabulce 14 a sekvence použitých primerů v tabulce 15.

Tabulka 14 – Sekvence použitých primerů, primery byly darovány laboratoří MUDr. Zdeňka Hodného, Ph.D., Ústav molekulární genetiky, Akademie věd ČR [160]

Gen	Fwd primer	Rev primer
<i>OCT-4</i>	CAGCTTGGGCTCGAGAAG	CCTCTCGTTGTGCATAGTCG
<i>SOX-2</i>	CAAGATGCACAACCTCGGAGA	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC
<i>TWIST-1</i>	GCAGGACGTGTCCAGCTC	CTGGCTCTTCCTCGCTGTT
<i>TWIST-2</i>	GCAAGAAGTCGAGCGAAGAT	GCTCTGCAGCTCCTCGAA
<i>CEBPA</i>	AGGAGGATGAAGCCAAGCAG CT	AGTGCGCGATCTGGAAGTGC AG
<i>CEBPB</i>	CGCTTACCTCGGCTACCA	ACGAGGAGGACGTGGAGAG
<i>C-MYC</i>	CCTACCCTCTCAACGACAGC	ACTCTGACCTTTTGCCAGGA
<i>ZEB-1</i>	GGCATAACCTACTCAACTAC GG	TGGGCGGTGTAGAATCAGAG TC
<i>ZEB-2</i>	AATGCACAGAGTGTGGCAAG GC	CTGCTGATGTGCGAACTGTAG G
<i>CD44</i>	CCAGAAGGAACAGTGGTTTG GC	ACTGTCCTCTGGGCTTGGTGT T
<i>CD133</i>	TTTTCGCGTAAACTGGCTAA	CCATTTTCCATATTTTTCATG

Tabulka 15 – Průběh reverzní transkripce a kvatitativní PCR

	Teplota	Čas (minuty)	Počet pakování cyklu
Reverzní transkripce	65°C		
	0°C	5	1
	25°C	1	1
	50°C	5	1
	70°C	50	1
	15°C	15	1
	Teplota	Čas (minuty)	Počet pakování cyklu
qPCR	95°C	10	1
	95°C	30	40
	55°C	1	40
	72°C	1	40
	95°C	1	1
	55°C	30	1
	95°C	30	1

Z naměřených hodnot byla vypočítána relativní hodnota exprese $R = 2^{(-\Delta Ct)}$, kde ΔCt testovacího vzorku = Ct cílového genu – Ct house-keeping genu. Tyto hodnoty byly získány za použití programu GenEx v6 (<http://www.biomcc.com/genex-software.html>).

4.15 Analýza morfolgie buněk při epiteliálně mezenchymální tranzici

Vhodná koncentrace buněk RT112Heidelberg byla vyseta na 6jamkovou destičku a buňky se nechaly narůst do různých stupňů buněčné denzity. Morfolgie buněk byla hodnocena fázovým kontrastem pomocí invertovaného mikroskopu Olympus IX81 – CellR s příslušenstvím (Olympus, Tokyo, Japonsko).

4.16 Klonogenita v polotekutém substrátu (1,5% metylcelulóze)

Klonogenita v polotekutém médiu byla kvantifikována jako počet buněčných kolonií (sfér), které jsou adherentní nádorové buňky schopny vytvořit bez možnosti přichycení na dno kultivačního plastu [179]. Po rutinní trypsinizaci byly buňky zcentrifugovány, resuspendovány v 1,5% metylcelulóze (Sigma, Praha, ČR) rozpuštěné v plně suplementovaném médiu DMEM a vysazeny v počtu 20 000 buněk/jamku (Ultra-Low Attachment Surface 6-well plates, Corning, USA). Při některých analýzách byly nádorové buňky vysety do polotekutého substrátu nad konfluentní monovrstvu stromálních BC44Fibr. Po 2 – 3 týdnech byly vzniklé kolonie spočítány a fotograficky

zdokumentovány pomocí mikroskopu Olympus IX81 – CellR s příslušenstvím (Olympus, Tokyo, Japonsko). Výsledky analýz byly hodnoceny pomocí Mann-Whitney U-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4.17 Detekce apoptózy použitím Annexin V Alexa Fluor® 568

Buňky SW780 byly kultivovány samostatně a v kokultivaci s BC44Fibr, vysety na 24jamkovou destičku a vystavené 20 ng/ml ligandu TRAIL po dobu 5 hodin. Po té bylo k buňkám přidáno 8 μ L Annexin V Alexa Fluor® 568 conjugate (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) ve 200 μ L Annexin-Binding Bufferu (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, a 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) a směs inkubována při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Po opláchnutí annexinovým pufrům byly buňky analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus AX70 vybaveným Olympus DP71 kamerovým systémem při zvětšení 10x (Olympus, Tokyo, Japonsko). Analýzy byly provedeny v rámci spolupráce s Dr. Z. Czubou z Ústavu mikrobiologie a imunologie Lékařské fakulty v Katovicích v Polsku [163].

4.18 Detekce apoptózy pomocí průtokového cytometru

Buňky SW780 byly kultivovány samostatně a v kokultivaci s BC44Fibr, vysety na 24jamkovou destičku a vystavené různým koncentracím ligandu TRAIL (25 – 100 ng/ml) po dobu 20 hodin. Poté byly buňky trypsinizovány a resuspendovány v 1 ml annexinového pufru. 500 μ l buněčné suspenze bylo inkubováno s 5 μ l Annexin V-PE a 10 μ l 7-AAD ve tmě po dobu 10 minut. Populace Annexin V pozitivních buněk byla analyzována pomocí průtokového cytometru BD FACScan Becton Dickinson Immunocytometry Systems (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Pilotní analýzy byly provedeny v rámci spolupráce s Dr. Z. Czubou z Ústavu mikrobiologie a imunologie Lékařské fakulty v Katovicích v Polsku [163].

4.19 Elisa analýza

Analýzy ELISA byly prováděny přesně podle instrukcí výrobců pomocí komerčně dostupných kitů – IL-8 (ImmunoToolsGmbH, Friesoythe, Německo) a HGF (R&D Systems, minneapolis, Minesota, USA). Ke statistickému zpracování dat byl použit neparametrický Mann-Whitney U-test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Analýzy byly provedeny ve spolupráci s Ústavem biochemie II, Univerzitní nemocnice v Jeně v Německu [169].

4.20 Hodnocení intenzity exprese CD90 u stromálních fibroblastů BC44Fibr

Celkem bylo hodnoceno 344 vzorků histologických preparátů značených na CD90 u pacientů Uppsalské univerzitní nemocnice z let 1984 až 2005 [180]. Histologické řezy byly značeny pomocí automatického přístroje Ventana Benchmark Discovery, NexES V10.6 (Ventana, Tuscon, Arizona, USA) primární králičí monoklonální protilátkou anti-CD90 (Abcam, Velká Británie) zředěnou puřem v poměru 1:100 (Ventana, Tuscon, Arizona, USA) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po té se po dobu 32 minut a laboratorní teplotě inkubovaly vzorky se sekundární protilátkou (OmniMab anti-Rb-HRP, Ventana, Švýcarsko). Intenzita CD90 byla hodnocena použitím čtyřstupňového skóre (0 – negativní, 1 – lehká intenzita, 2 – střední intenzita a 3 – vysoká intenzita) dvěma jedinci nezávisle na sobě. Pro konečnou analýzu byla vypočítána průměrná hodnota. Asociace mezi expresí CD90 a klinicko-patologickými parametry (věk, pohlaví, TNM klasifikace a grade) byly analyzovány pomocí Gamma testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Celkové přežití bylo vypočítáno jako doba od data operace do data úmrtí nebo posledního sledování po pěti letech. Výpočty byly provedeny pomocí statistického balíčku IBM SPSS Statistics Version 24 (IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.) Studie byla provedena ve spolupráci s Dr. C. Strell z Cancer Center Karolinska ve Stockholmu.

4.21 Respirometrie pomocí oxygrafu Oroboros

Spotřeba kyslíku buňkami uvedenými v tabulce 16 byla měřena ve skleněných komůrkách oxygrafu Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Rakousko) o objemu 2 ml. Oxygraf byl kalibrován s kultivačním médiem na okolní atmosférický tlak a teplotu 37°C (koeficient rozpustnosti kyslíku 0,89) [181]. Spotřeba kyslíku byla analyzována on-line pomocí softwaru DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) jako záporně vzatá časová derivace koncentrace kyslíku v komoře vyjádřená v pmol O₂/s.10⁶ buněk a korigovaná na ROX a instrumentální pozadí. Po kalibraci byly komory uzavřeny a následně injikovány buňky pomocí Hamiltonovy stříkačky. Nejprve se měřil fyziologický stav rutinního stavu dýchání (ROUTINE; R), k indukci stavu LEAK (spotřeba kyslíku potřebná pro transport elektronů nutná na kompenzaci úniku protonů přes vnitřní mitochondriální membránu) byl použit oligomycin (2 µg/ml) [182]. Pro vyvolání stavu ETS (E) byl aplikován rozpřahovač trifluorhydrokarbonylkyanid fenylylhydrazon (FCCP, titrační stupně 0,05 µmol/l). Zbytková spotřeba kyslíku (ROX) byla stanovena podáním antimycinu A (2,5 µmol/l). Ve výsledcích byly kyslíkové toky zaznamenané v jednotlivých titračních krocích korigovány na ROX. Výsledná data byla vypočtena jako průměr ± SD. Statistické rozdíly byly analyzovány pomocí softwarového balíčku STATISTICA CZ, 8 (StatSoft Inc., Praha, ČR). Po testování normální distribuce a homogenity odchylek byla data srovnána pomocí t-testu.

Tabulka 16 – Seznam buněčných linií, u kterých byla měřena spotřeba kyslíku oxygrafem Oroboros (Oroboros, Innsbruck, Rakousko)

BC44
BC44 v kokultivaci s BC44Fibr
BC44DoxoR

4.22 Aktivita citrátsyntázy

Aktivita citrátsyntázy se využívá ke standardizaci oxygrafických měření nebo k odhadu množství mitochondrií. Aktivita enzymu se stanovovala z buněk zbylých v komůrkách po oxygrafických měřeních pomocí světelné spektroskopie. K homogenizovanému obsahu komůrek (200 μ l) bylo přidáno 800 μ l média (0,1 mmol 5,5-dithio-bis2-nitrobenzoová kyselina, 0,25 % Triton-X, 0,5 mmol/l oxalacetát, 0,31 mmol/l acetylkoenzym A, 5 μ mol EDTA, 5 mmol/l trietanolamin hydrochlorid a 0,1 mol/l Tris-HCl pH 8,1). Vzniklá směs byla měřena při vlnové délce 412 nm, 30 °C po dobu 200 s. Výsledná hodnota aktivity enzymu byla vyjádřena v mIU na $1 \cdot 10^7$ buněk. Statistická analýza byla provedena pomocí OriginPro2017 software (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA). Po testování normálního rozložení byla data srovnávána pomocí statistické metody Studentova T testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

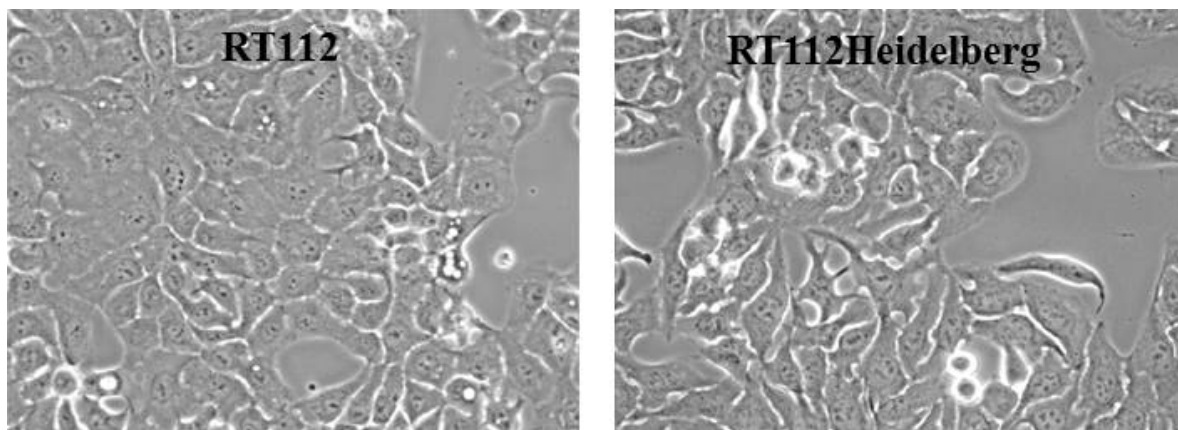
5 Výsledky výzkumu a diskuse

5.1 Výsledky vztahující se k cíli 1

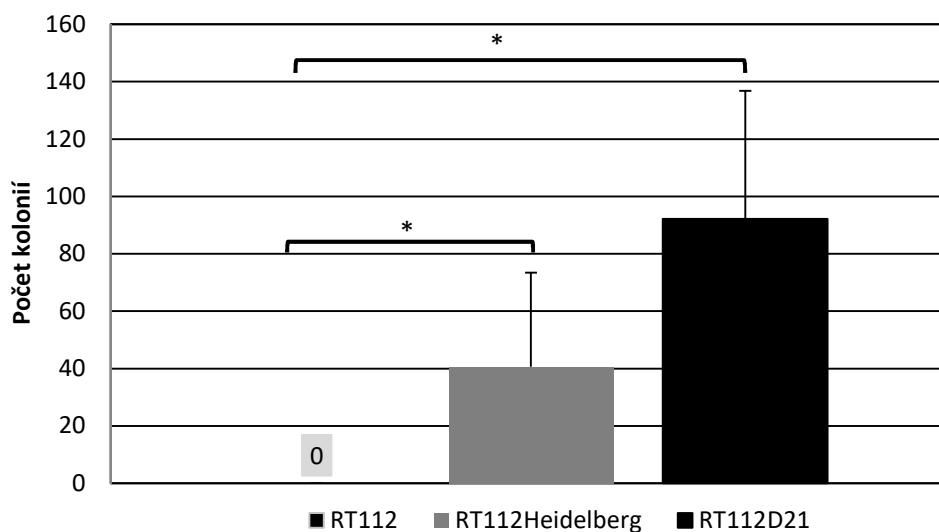
Cíl 1: – Blíže charakterizovat stávající etablované modely chemorezistence (RT122/RT112D21) a ustanovit modely nové (BC44DOXOR) pro zkoumání podstaty vzniku mnohočetné lékové rezistence

5.1.1 Základní charakteristika a původ buněčného modelu RT112/RT112D21

Chemoterapie představuje jednu ze základních možností léčby zhoubných novotvarů. Velmi často je však pozorována odolnost vůči aplikované chemoterapii, kdy chemorezistentní nádorové buňky mohou získat schopnost vyhnout se působení i více třídám různých protinádorových léků současně. Abychom lépe porozuměli procesům, které jsou základem klinické chemorezistence, využili jsme dostupného modelu buněčných kultur, který se skládá ze dvou klonálně příbuzných buněčných linií - RT112 a od ní odvozené dceřiné linie RT112D21 rezistentní k doxorubicinu [164, 165]. Buněčné linie (RT112 a RT112D21 resp. RT112Heidelberg) byly získány jako laskavý dar od Dr. M. S. Michela z Urologické kliniky Lékařského centra v Mannheimu a byly použity v rámci spolupráce s prof. W. A. Schulzem z Urologické kliniky Heinrich-Heineho univerzity v Düsseldorfu [164, 165]. V průběhu pilotních analýz však bylo náhodně zjištěno, že původní mateřská buněčná linie RT112 se chová jinak, než bylo popsáno v odborné literatuře. Marshall *et al.*, který ji v roce 1977 ustanovil a charakterizoval, uvádí, že tato linie není klonogenní, a tedy není schopna růst v polotekutém substrátu (počet kolonií 0) [183]. Naše výsledky však ukázaly, že jedna ze získaných buněčných linií pod názvem RT112 je klonogenní a je schopna v 1,5% metylcelulóze tvořit buněčné kolonie, tzv. sféry (počet kolonií 40 ± 32). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 17 a na obrázku 17. Obrázek 16 ukazuje základní morfologii buněk, RT112 vykazují epiteliální tvar, zatímco u RT112Heidelberg pozorujeme aberantní buňky, které mají spíše mezenchymální tvar. Z výše uvedeného důvodu byla buněčná linie původně získána pod názvem RT112 nazvána RT112Heidelberg.



Obrázek 16 – Morfologie buněk nádorové buněčné linie RT112 a RT112Heidelberg, fázový kontrast, zvětšeno 10x



Obrázek 17 – Klonogenita v polotekutém médiu (Podle Marshall *et al.* je původně získaná buněčná linie RT112 neklonogenní, naše výsledky však ukázaly, že je schopna tvořit buněčné kolonie. Tato buněčná linie byla pojmenována RT112Heidelberg [184], (n = 6, p = 0,0022)

Tabulka 17 – Počet buněčných kolonií u nádorových buněčných linií rodiny RT112

Nádorová buněčná linie	Počet buněčných kolonií
RT112	0 ± 0
RT112Heidelberg (původně získaná jako RT112)	40 ± 32
RT112D21	95 ± 45

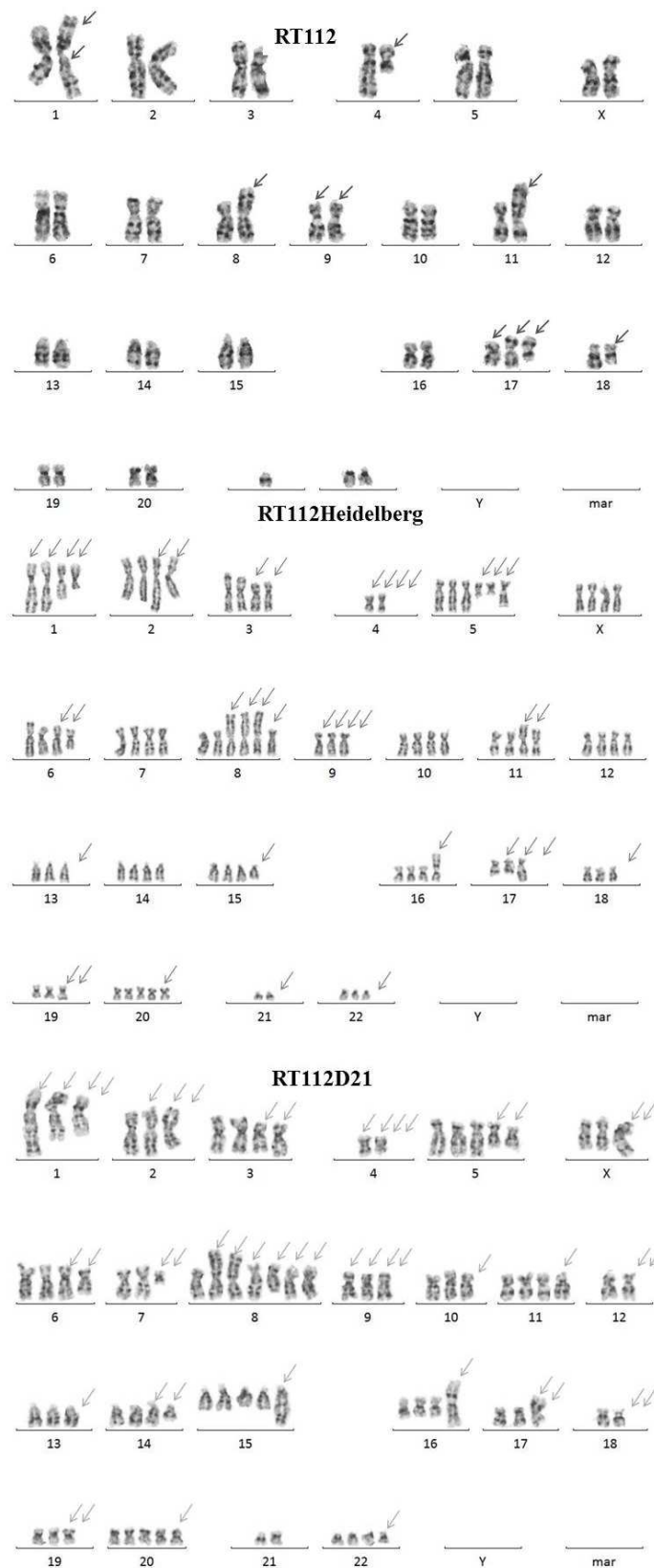
Ověřením genetické identity buněčných linií rodiny RT112 bylo zjištěno, že všechny tři buněčné linie mají společný genetický původ. Buněčné linie RT112Heidelberg a RT112D21 jsou si více podobné a pravděpodobně je linie RT112D21 subklonem buněčné linie RT112Heidelberg a nikoli subklonem přímo z linie RT112. Genetická identita buněčných linií RT112 rodiny je uvedena v tabulce 18.

Při analýze karyotypů se opět potvrdilo, že buněčné linie RT112 a RT112Heidelberg nejsou liniemi totožnými [165]. Zatímco buněčná linie RT112 byla monoklonální, její komplexní karyotyp měl 46 chromozomů a vykazovala 12 chromozomových aberací, tak RT112Heidelberg byla polyklonální [49], hlavní klon měl 87 chromozomů a 49 chromozomových aberací a vedlejší klon měl má 89 chromozomů a 49 chromozomových aberací. Rezistentní linie RT112D21 byla také polyklonální a bylo u ní možné identifikovat dva hlavní a dva dlejší klony. Cytogenetické vyšetření jednoznačně prokázalo, že buněčná linie považovaná za RT112 (nyní již pod názvem RT112Heidelberg), je ve skutečnosti jiná buněčná linie. V řadě RT112, RT112Heidelberg

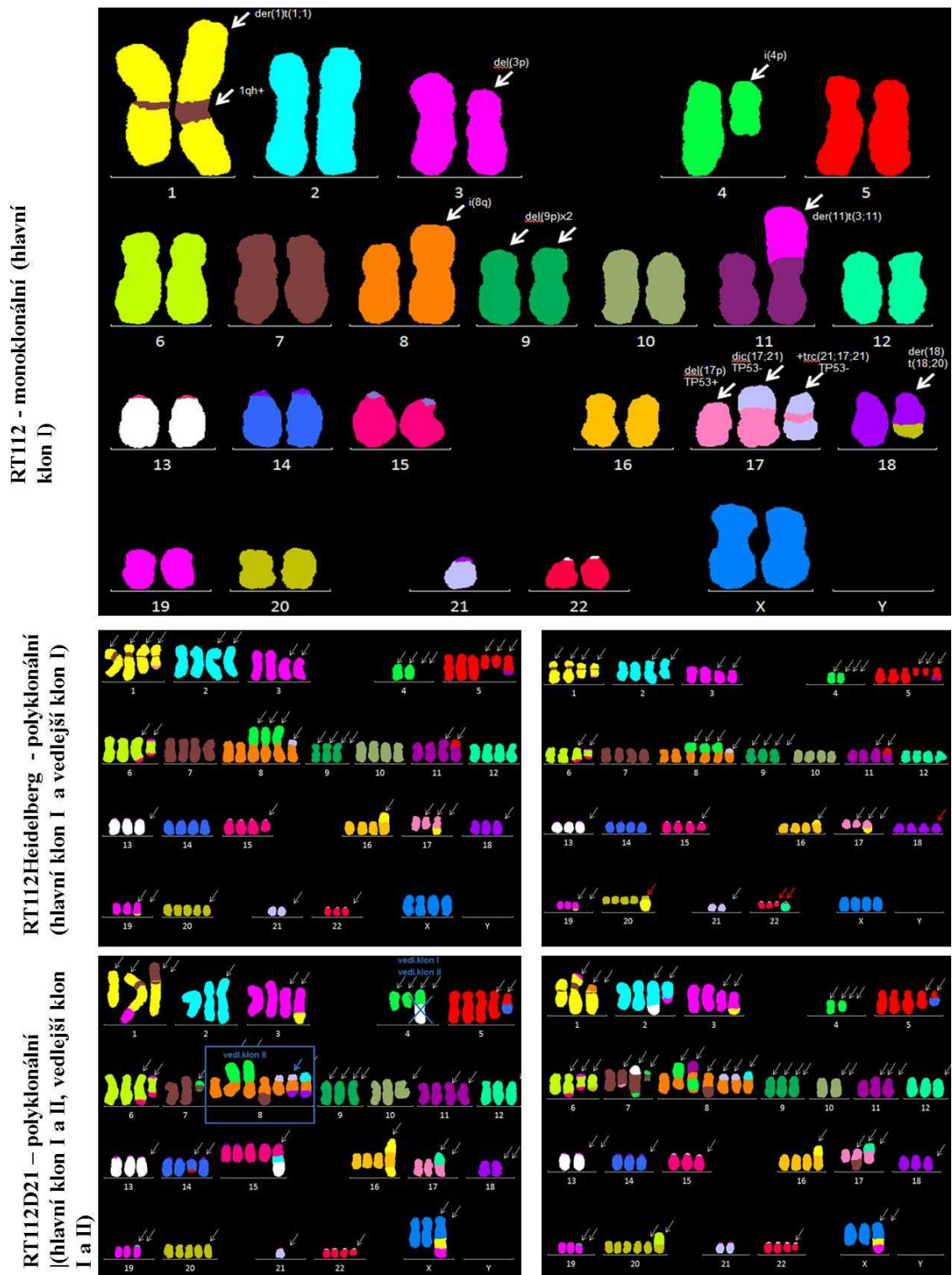
a RT112D21 byl prokázán vzrůstající výskyt cytogenetických markerů nádorové progresi, jako jsou například komplexita a nestabilita karyotypu, vícenásobné přestavby stejného chromozomu a přestavby související s nádorovou progresí. Celkové výsledky cytogenetického vyšetření tak podpořily domněnku, že chemorezistentní buněčná linie RT112D21 nebyla odvozena přímo z linie RT112 ale z agresivnější dceřiné buněčné linie RT112Heidelberg a jedná se tedy o progresivní model tří nádorových buněčných linií. Výsledky karyotypů jednotlivých buněčných linií a jejich klonů jsou uvedeny na obrázcích 18 a 19.

Tabulka 18 – Genetická identita buněčných linií RT112 (data byla analyzována na Urologické klinice Heinrich-Heineho univerzitě v Düsseldorfu a získána v rámci spolupráce s prof. W.A. Schulzem)

Název genetického markeru	RT112	RT112Heidelberg	RT112D21
<i>Hum VWA</i>	14-17	17-17	17-17
<i>D19S433</i>	13-15	13-15	13-15
<i>D18S51</i>	17-17	15-15	15-15
<i>Hum TH01</i>	7-7	7-7	7-7
<i>D21S11</i>	27(28-28) 30	27(28-28) 30	27(28-28) 30
<i>D8S1179</i>	13-15	13-15	13-15
<i>D3S1358</i>	15-15	15-15	15-15
<i>D2S1338</i>	17-24	27-24	27-24
<i>FGA</i>	25-25	23-23	23-23
<i>SE33</i>	2-28,2	20-29,2	20-29,2
<i>D16S539</i>	11-13	11-13	11-13
<i>Amel</i>	XX	XX	XX

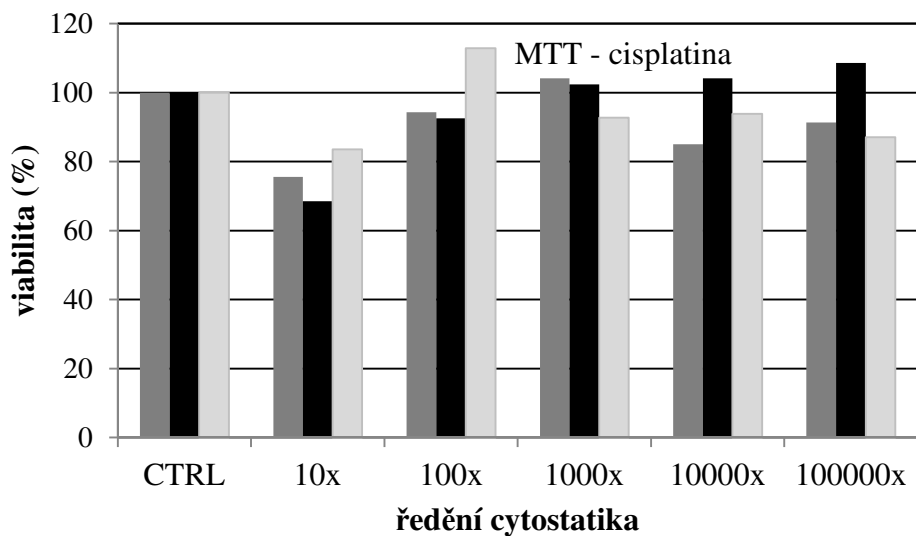
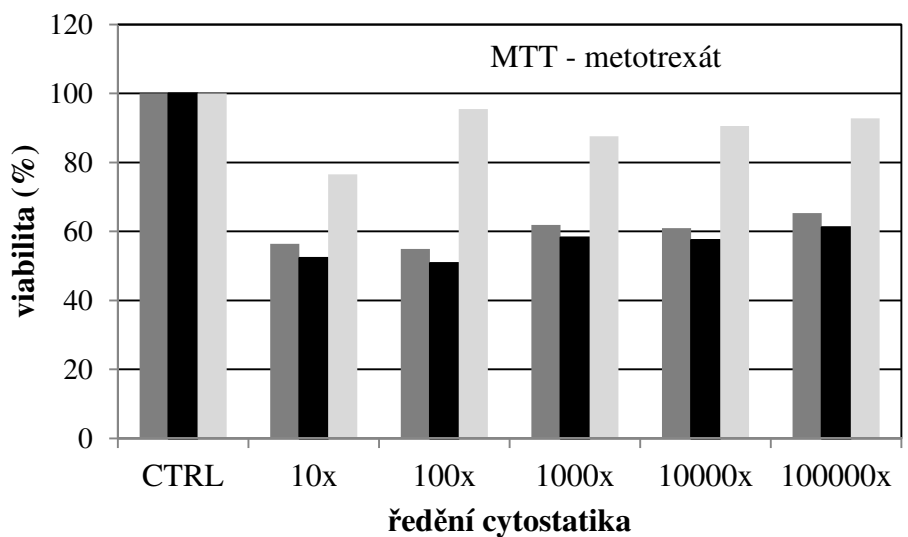


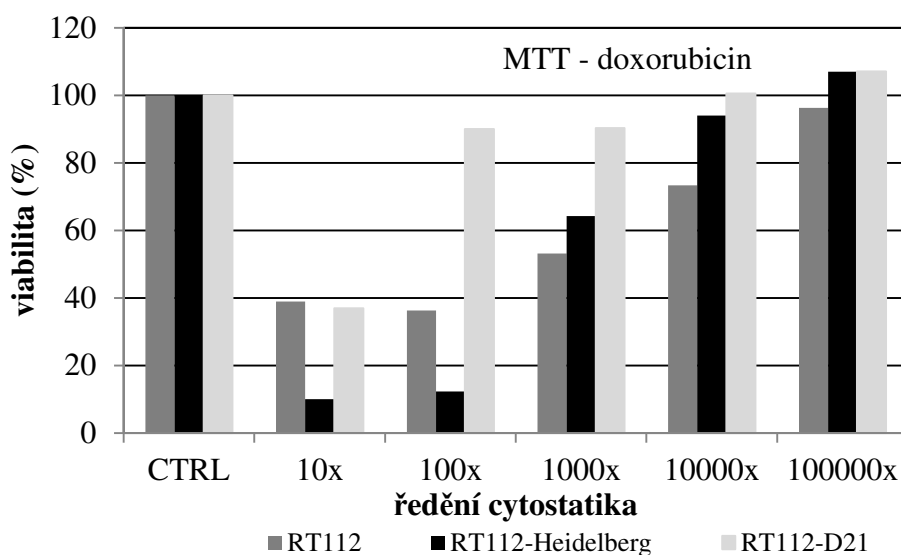
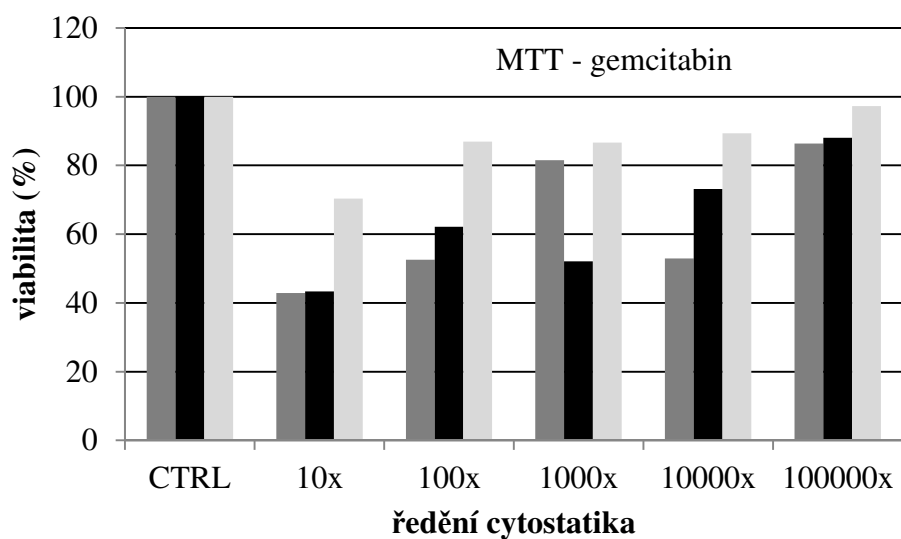
Obrázek 18 - Karyotypy jednotlivých buněčných linií rodiny RT112 ukazují, že RT112 a RT112Heidelberg nejsou totožné totožné buněčné linie, za které byly původně vydávány (Výsledky byly získány v rámci spolupráce s Ústavem lékařské genetiky Fakultní nemocnice v Plzni.) [172]



Obrázek 19 – Metoda Multicolor – FISH u buněčných linií RT112, RT112Heidelberg a RT112D21 ukázala, že linie se liší v počtu klonů i v chromozomových přestavbách (Výsledky byly získány v rámci spolupráce s Ústavem lékařské genetiky Fakultní nemocnice v Plzni.) [172]

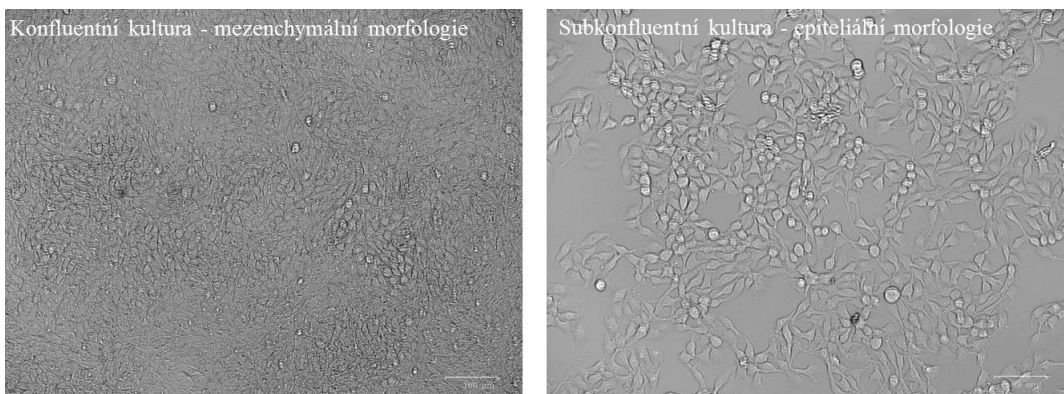
Pilotní test chemorezistence pomocí MTT testu na progresivní buněčné sérii RT112 (RT112, RT112Heidelberg a RT112D21) ukázal, že buněčné linie nevykazují ideální fenotyp mnohočetné lékové rezistence, neboť se potvrdila rezistence pouze na doxorubicin, gemcitabin a metotrexát. Na cisplatinu je linie RT112D21 dokonce citlivější než RT112 a RT112Heidelberg. Výsledky MTT pro jednotlivá cytostatika jsou uvedeny na obrázku 20. Způsob ředění cytostatik a jejich koncentrace je uvedena v tabulce 13.





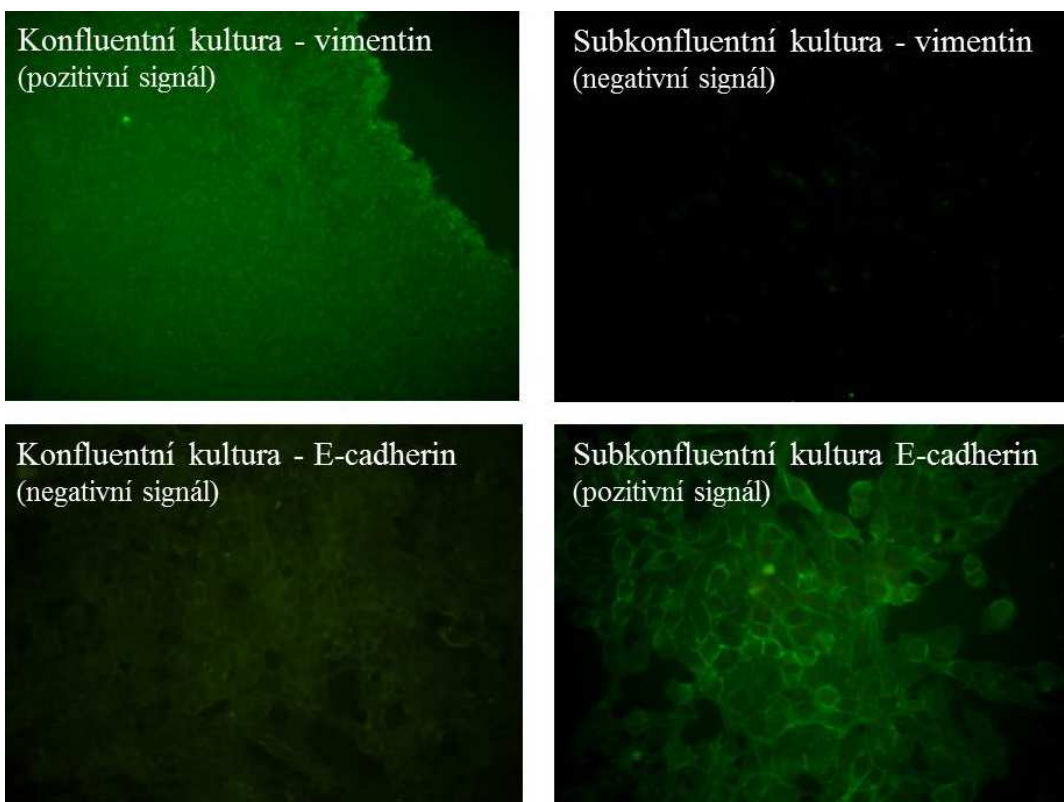
Obrázek 20 – Pilotní výsledky viability buněčných linií RT112, RT112Heidelberg a RT112D21 při aplikaci běžně užívaných chemoterapeutik po dobu 48 hodin (CTRL označuje viabilitu buněk, které nebyly vystaveny žádné koncentraci cytostatika. Způsob ředění cytostatik a jejich koncentrace jsou popsány v tabulce 13)

Kromě toho, že se tato progresivní serie buněčných linií ukázala při pilotních testech jako nevhodný model chemorezistence, bylo při náhodném pozorování objeveno, že morfologie buněk RT112Heidelberg, které byly kultivovány v různém stupni buněčné denzity, se výrazně lišila. Následné analýzy fenotypu v závislosti na hustotě buněčné kultury opravdu potvrdila, že konfluentní kultura výrazněji vykazovala mezenchymální morfologii. Morfologie buněk RT112Heidelberg v různém stupni buněčné hustoty je doložena na obrázku 21.



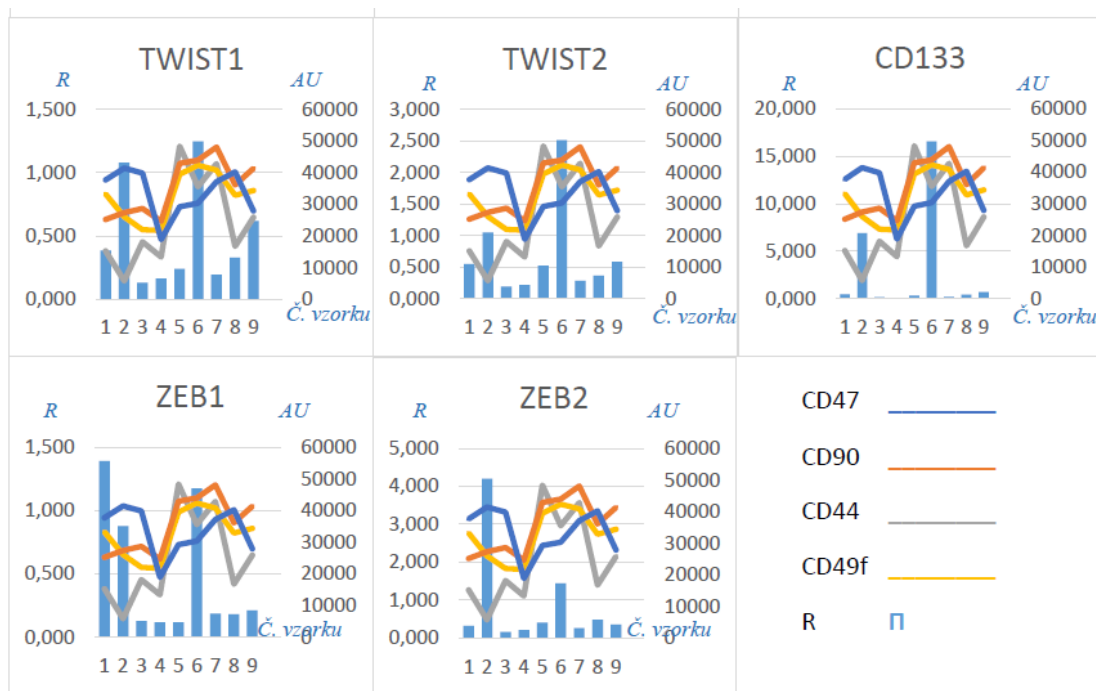
Obrázek 21 – Buněčná linie RT112Heidelberg v konfluentním (mezenchymální morfologie) a subkonfluentním stavu (epiteliální morfologie), fázový kontrast, zvětšeno 4x

Stejný výsledek se potvrdil i při imunofluorescenčním značení na typické mezechymální a epitheliální markery. Konfluentní kultura vykazovala silnou pozitivitu na protein vimentin a velmi slabý signál na epitheliální marker E-cadherin. Naopak jak ukazuje obrázek 22 kultura v subkonfluentním stavu byla vysoce pozitivní na E-cadherin a téměř úplně negativní na vimentin jakožto typický mezenchymální marker.



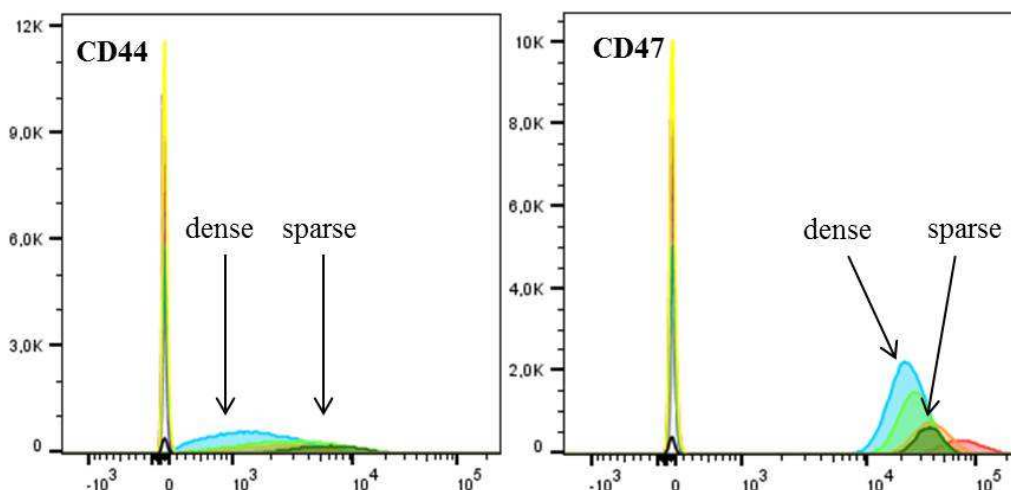
Obrázek 22 – Reverzibilní epitheliálně-mezenchymální tranzice u nádorové buněčné linie RT112Heidelberg v závislosti na buněčné hustotě kultury (konfluentní kultura je pozitivní na vimentin a negativní na E-cadherin, subkonfluentní kultura je pozitivní na E-cadherin negativní na vimentin), zvětšeno 4x

Stejný trend se ukázal i při expresní analýze transkripčních faktorů (*TWIST1*, *TWIST2*, *ZEB1*, *ZEB2*), které pozitivně regulují epiteliálně-mezenchymální přeměnu [185]. Vyšší exprese markerů epiteliálně-mezenchymální tranzice byla pozorována u buněk, které byly kultivovány v konfluentní kultuře. Obrázek 23 ukazuje porovnání exprese CD47, CD90, CD44 a CD49f a mRNA pro vybrané geny.

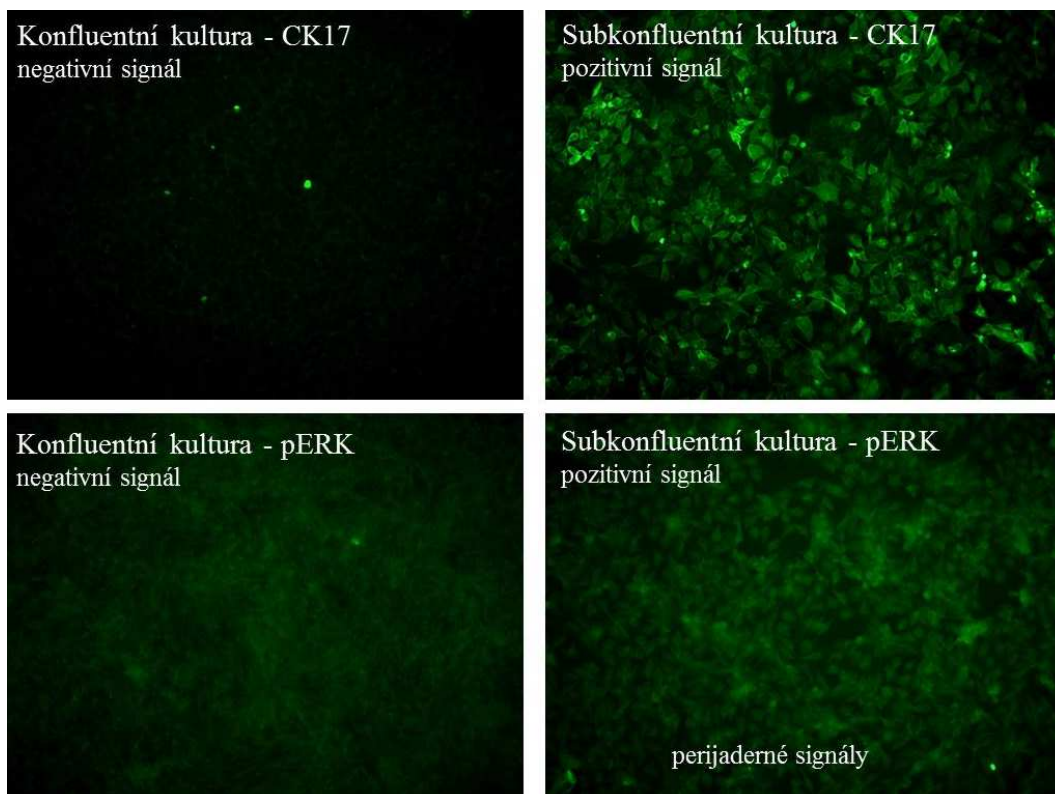


Obrázek 23 – Porovnání exprese CD47, CD90, CD44 a CD49f (měřeno FCM, vedlejší osa) a mRNA pro vybrané geny (qPCR, hlavní osa). AU = „arbitrary unit“, arbitrární jednotka, která byla vypočtena pro větší přehlednost grafu. Výsledky byly získány ve spolupráci s laboratoří Dr. K. Drbala z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze [185]

Analýza kmenového fenotypu průtokovou cytometrií (CD47 a CD44), jejíž výsledky jsou uvedeny na obrázku 24 a imunofluorescenční značení buněk na kmenové markery popsané u uroteliálního karcinomu (CK17, pERK) a uvedené na obrázku 25, vykazovaly přesně opačný trend, než byl nalezen u markerů epiteliálně-mezenchymální tranzice (*TWIST1*, *TWIST2*, *ZEB1*, *ZEB2*) tzn., že vyšší expresi kmenových markerů mají buňky, které mají zároveň nižší expresi transkripčních faktorů regulujících epiteliálně-mezenchymální tranzici. Konfluentní kultura RT112Heidelberg vykazovala velmi slabý signál na typické kmenové znaky, zatímco subkonfluentní kultura RT112Heidelberg exprimovala silný pozitivní signál proteinů, které nalzáme zejména u kmenových nádorových buněk. Celkové výsledky dokazují, že buněčná linie RT112Heidelberg podstupuje při buněčné kultivaci spontánní a reverzibilní epiteliálně-mezenchymální tranzici v závislosti na buněčné hustotě.

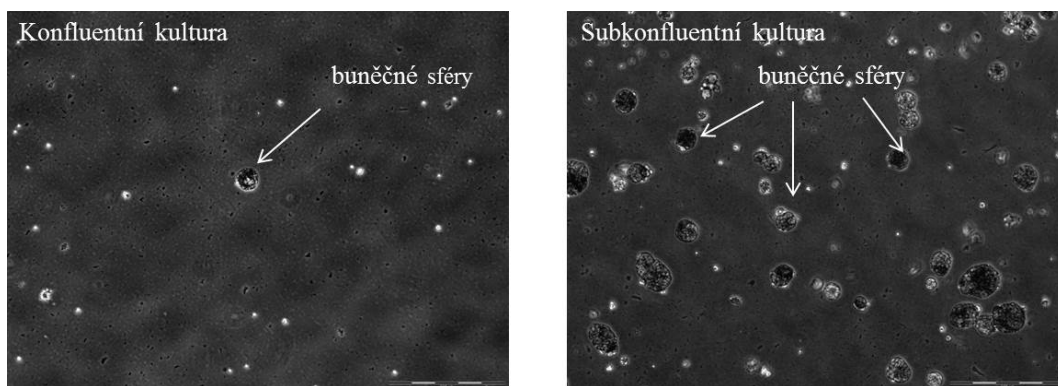


Obrázek 24 – Analýza kmenových markerů (CD44 a CD47) u buněčné linie RT112Heidelberg v závislosti na hustotě buněčné kultury (výsledky z průtokového cytometru ukazují, že kmenové markery CD44 a CD47 se vyskytují u buněčné linie, která byla kultivována v subkonfluentním stavu, analýza byla provedena ve spolupráci s laboratoří Dr. K. Drbala z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze) [185]

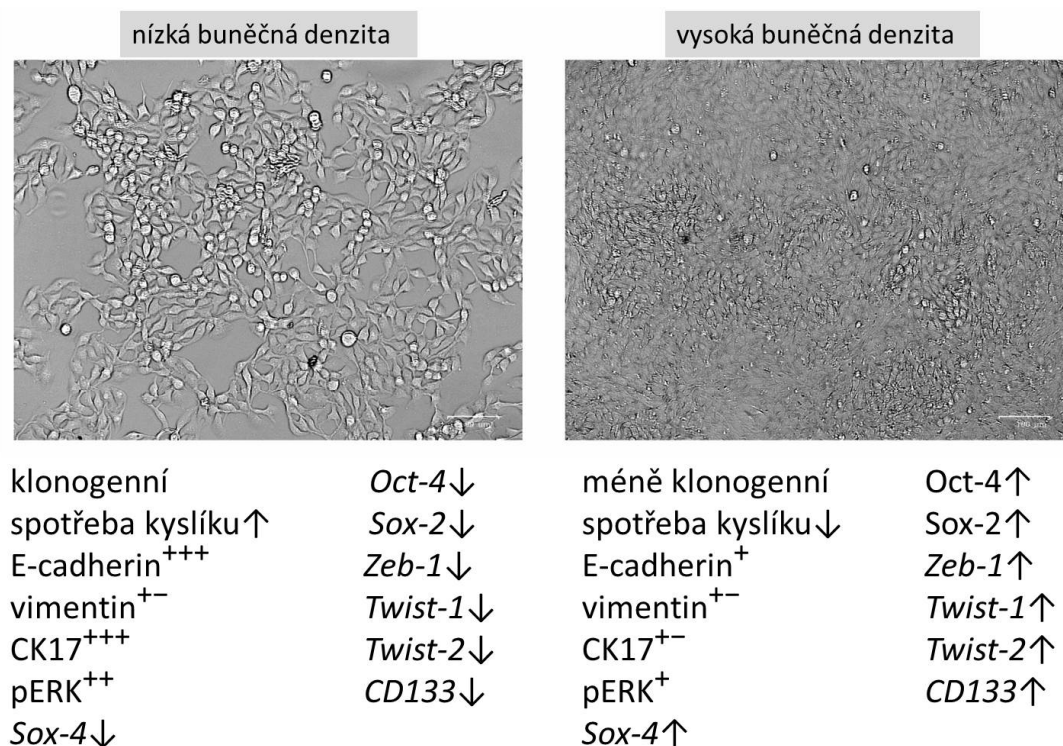


Obrázek 25 – Analýza kmenových markerů (CK17 a pERK) u buněčné linie RT112Heidelberg v závislosti na buněčné hustotě buněčné kultury, zvětšeno 4x

Jednou z možných metod, jak analyzovat subpopulaci kmenových nádorových buněk *in vitro*, je specifická buněčná kultivace, kdy jsou buňky nuceny přežít a dělit se v polotekutém médiu bez kontaktu s pevným povrchem kultivačního plastu. Při nasazení buněk, které rostly po určitou dobu v konfluentním stavu, se ukázalo, že jejich schopnost takto růst je velmi malá a většina buněk tento způsob kultivace nepřežila. Buňky, které byly naopak kultivovány v subkonfluentním stavu prokázaly, že tento způsob růstu jim nečinil výrazné problémy. Obrázek 26 ukazuje výrazně menší počet buněčných kolonií, které vytvořily buňky kultivované ve vysoké hustotě. Výsledky našich výše uvedených analýz tak podporují nedávno publikovanou teorii, která vylučuje vzájemnou podmíněnost kmenového fenotypu a epiteliálně-mezenchymální tranzice [186, 187].



Obrázek 26 – Klonogenita v polotekutém médiu buněčné linie RT112Heidelberg (šípkami jsou označené buněčné kolonie), fázový kontrast, zvětšeno 4x

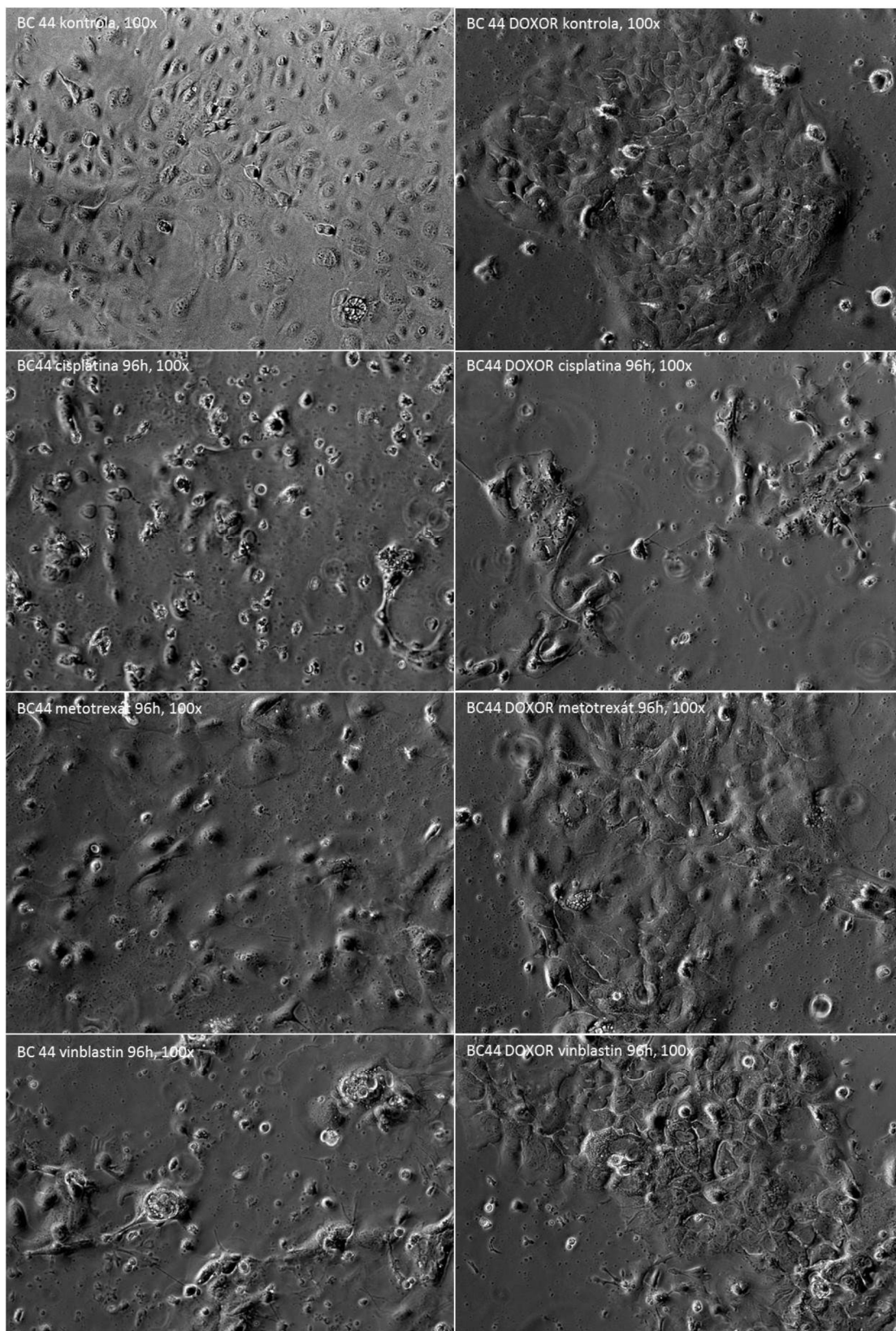


Obrázek 27 – Shrnutí důležitých parametrů buněčné linie RT112Heidelberg v závislosti na buněčné hustotě, fázový kontrast, zvětšeno 4x [8]

5.1.2 Základní charakteristika a původ buněčného modelu BC44/BC44DoxoR

Vybraný buněčný model RT112/RT112D21 se díky výše popsaným výsledkům ukázal jako nestabilní a z tohoto důvodu bylo upuštěno od jeho další analýzy chemorezistentního fenotypu. Další námi odvozený buněčný model se skládá ze dvou klonálně příbuzných buněčných linií – BC44 a od ní odvozené dceřiné chemorezistentní linie BC44DoxoR [36]. Podrobná biologická a molekulární analýza tohoto modelu by mohla přispět k odhalení důležitých biologických mechanismů terapeutické rezistence uroteliálního karcinomu. Schéma způsobu odvození je uvedeno v kapitole 4 Materiál a metody.

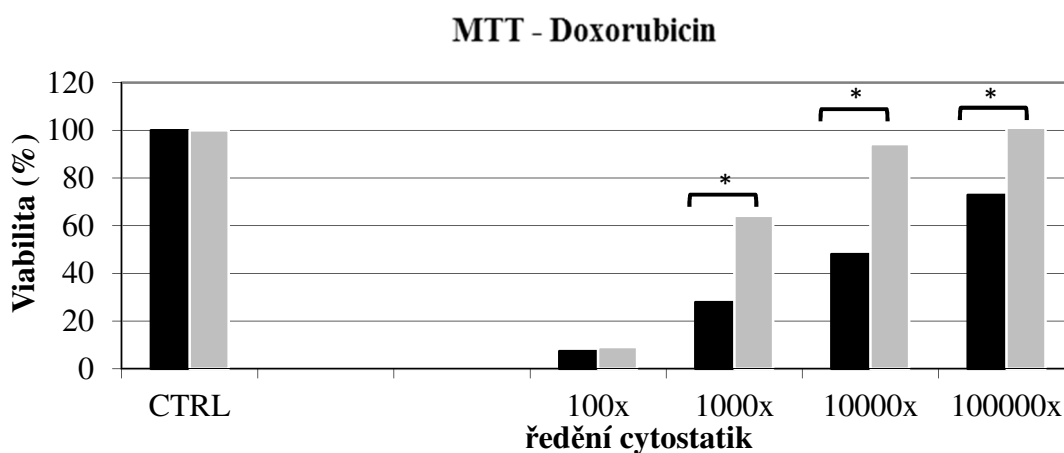
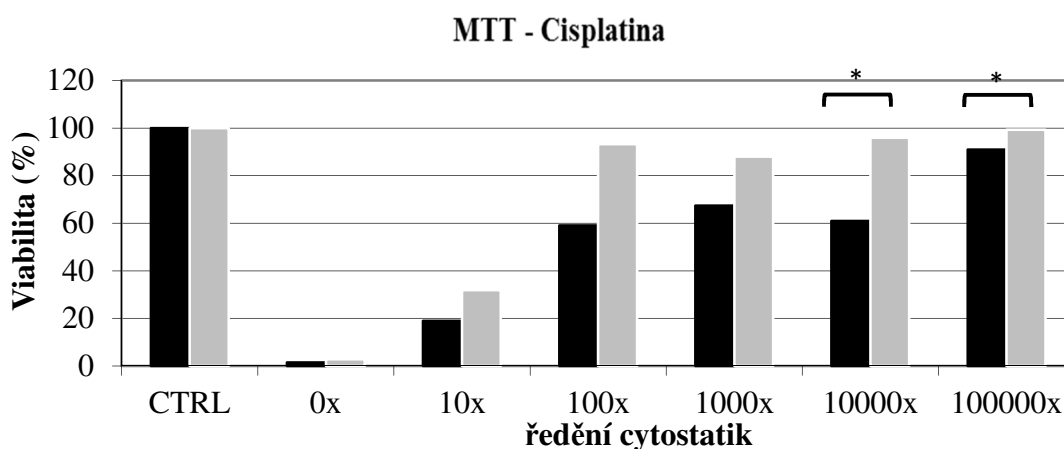
Mateřskou i dceřinou buněčnou linii jsme podrobili sérii analýz, při kterých jsme ověřovali jejich potenciální rezistenci i na jiná cytostatika než je doxorubicin, a která se zároveň běžně užívají při léčbě karcinomu močového měchýře (cisplatina, gemcitabin, vinblastin a metotrexát). Prvotní mikroskopická analýza, která je uvedena na obrázku 28, prokázala multirezistentní fenotyp buněčné linie BC44DoxoR a tento nález se nám podařilo potvrdit i kvantitativně testem mitochondriální funkce. Výsledky kvantitativního MTT testu uvedené na obrázku 29 a v tabulce 19 přesvědčivě prokázaly, že hodnota IC_{50} se pro obě linie signifikantně lišila.

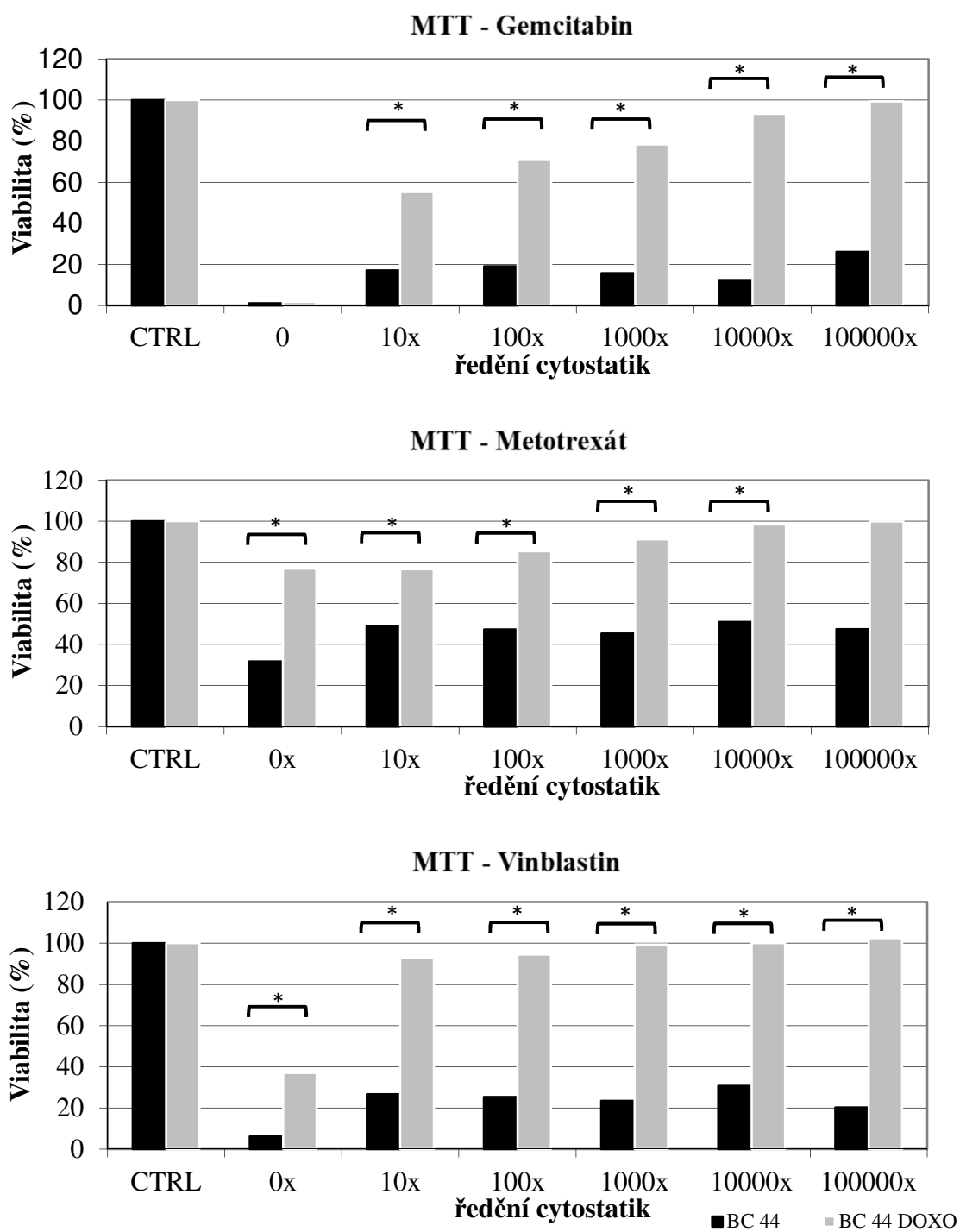


Obrázek 28 – Mikroskopická analýza multirezistentního fenotypu BC44DoxoR buněk při aplikaci různých chemoterapeutik, fázový kontrast, zvětšeno 10x [162]

Z výsledků vyplývá, že nejvyšší rezistenci vykazovala dceřiná buněčná linie BC44DoxoR ve vztahu k gemcitabinu, metotrexátu a vinblastinu, naopak u cisplatiny je

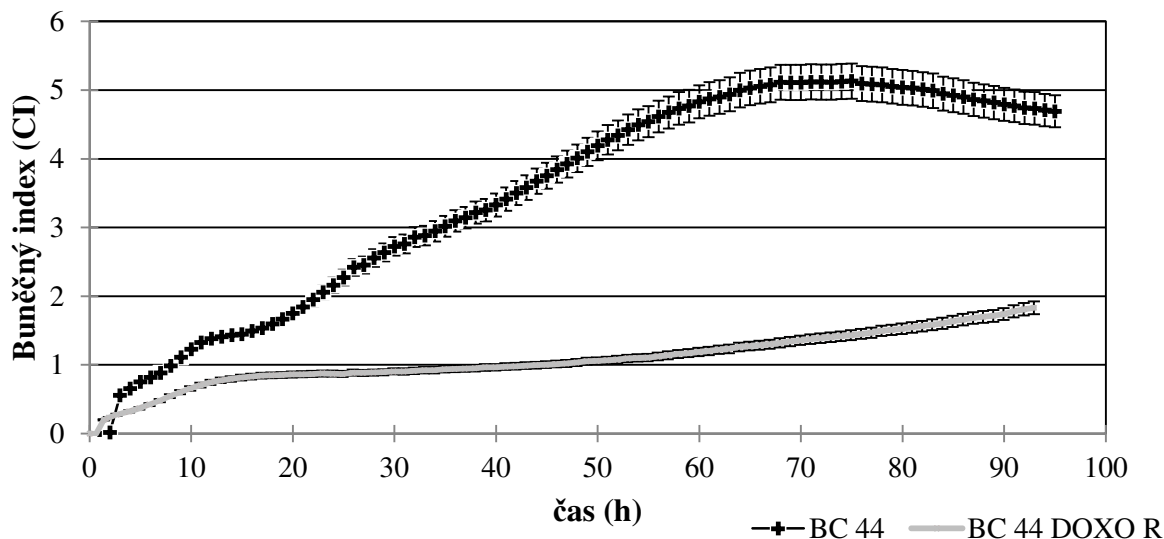
relativní rezistence nejnižší. Výsledky rezistence vůči doxorubicinu je nutno rozebrat blíže, protože tato látka, chemicky dostupná jako injekční roztok hydrochloridu doxorubicinu, je již komerčně dodávána jako barevný roztok s absorbcí ve viditelné oblasti přibližně při vlnové délce $\lambda = 550$ nm. Test funkce mitochondrií (MTT) byl měřen při vlnové délce $\lambda = 490$ nm a díky interkalační schopnosti doxorubicinu do molekuly DNA docházelo při nižších ředěních cytostatika k obarvení buněk a tudíž ke zkreslení výsledků. Tyto výsledky samozřejmě nejsou součástí statistického zpracování. Při vyšších ředěních již barevnost původního zásobního roztoku nehrála roli a data se spolehlivě statisticky potvrdila. [162].



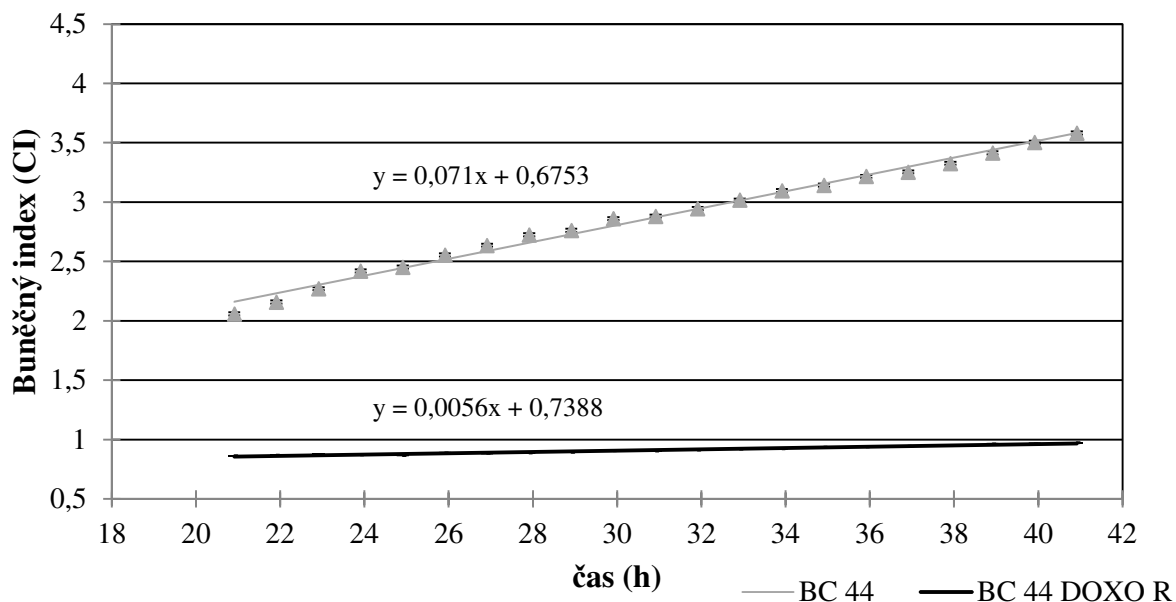


Obrázek 29 – Výsledky MTT testu mateřské buněčné linie BC44 a dceřiné rezistentní buněčné linie BC44DoxoR při aplikaci sestupné koncentrační řady jednotlivých chemoterapeutik (n = 9, p < 0,05), (CTRL označuje viabilitu buněk, které nebyly vystaveny žádné koncentraci cytostatika. Způsob ředění cytostatik a jejich koncentrace jsou popsány v tabulce 13) [162]

Rezistentní buněčná linie BC44DoxoR vykazuje oproti své mateřské buněčné linii BC44 signifikantně nižší proliferační aktivitu. Jak se ukázalo na obrázcích 30 a 31, čas zdvojení buněčné linie BC44 je v exponenciální fázi méně než 5 hodin, zatímco u buněčné linie BC44DoxoR je více než 35 hodin.



Obrázek 30 – Růstové křivky mateřské buněčné linie BC44 a dceřiné buněčné linie BC44DoxoR analyzované pomocí xCelligence systému (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) (n = 8, p = 0,0016)



Obrázek 31 – Regresní přímky proložené body růstové křivky v exponenciální fázi u buněčné linie BC44 (n = 8, p < 0,05) a dceřiné buněčné linie BC44DoxoR (n = 5, p < 0,05)

5.2 Výsledky a diskuse vztahující se k cíli 2

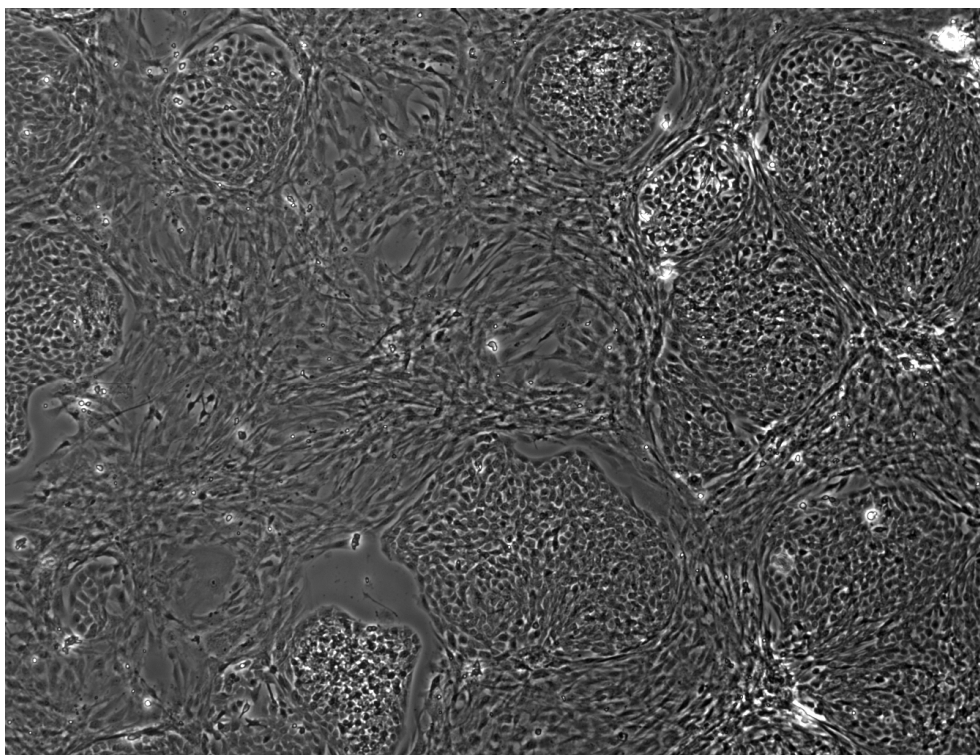
Cíl 2 Odvození modelu chemorezistence založeném na komplexní patofyziologii nádorového mikroprostředí

Nádor představuje komplexní ekosystém založený na vzájemných interakcích mezi buněčným transformovaným parenchymem a ostatními stromálními, převážně normálními buňkami. Relativní přínos jednotlivých buněčných typů k rozvoji a progresi onemocnění se může podstatně lišit u různých typů karcinomů. Publikované výsledky ukazují, že u karcinomu močového měchýře má stroma zcela zásadní vliv, stromální buňky aktivují růst nádorových buněk, podporují motilitu a schopnost invazivity, modulují metabolické a imunitní odpovědi nádoru a podporují chemorezistenci na aplikovanou léčbu [90, 128, 168, 188]. Výraznou překážkou pro experimentální analýzu těchto komplexních mechanismů chemorezistence je skutečnost, že u uroteliálního karcinomu dosud nebyla v literatuře popsána žádná stromální nádorová buněčná linie. Doposud se zatím využívaly heterologní systémy různého původu, které studovaly interakce mezi stromálními a karcinomovými buňkami [168, 189, 190] či primárně kultivované fibroblasty karcinomu močového měchýře, které jsou však kultivovatelné pouze omezeně [169, 175].

Při odvození karcinomové buněčné linie BC44 [160] se díky rozsáhlé infiltraci mezenchymálními buňkami podařilo současně ustanovit také buněčná linie fibroblastů nazvaná BC44Fibr. Pomocí rozdílné adhezivity obou typů buněk bylo možné diferenciální trypsinizací buňky elegantně oddělit a získat tak dvě čisté buněčné kultury. Po 3 – 4 pasážích došlo u fibroblastů k senescenci, ale pomocí retrovirové transdukce geny *hTERT* byly fibroblasty immortalizovány. Výhoda této linie je, že pochází ze stejného klinického vzorku jako buněčná linie BC44, a jsou tedy generovány ze stejného genetického pozadí [161]. Obrázek 32 ukazuje primární nádorovou buněčnou kulturu BC44 a BC44Fibr v subkonfluentním stavu, zatímco obrázek 33 zachycuje stejné buňky již jako laboratorně připravenou kokultivaci. Morfologie samostatně kultivovaných fibroblastů BC44Fibr je ukázána na obrázku 35.



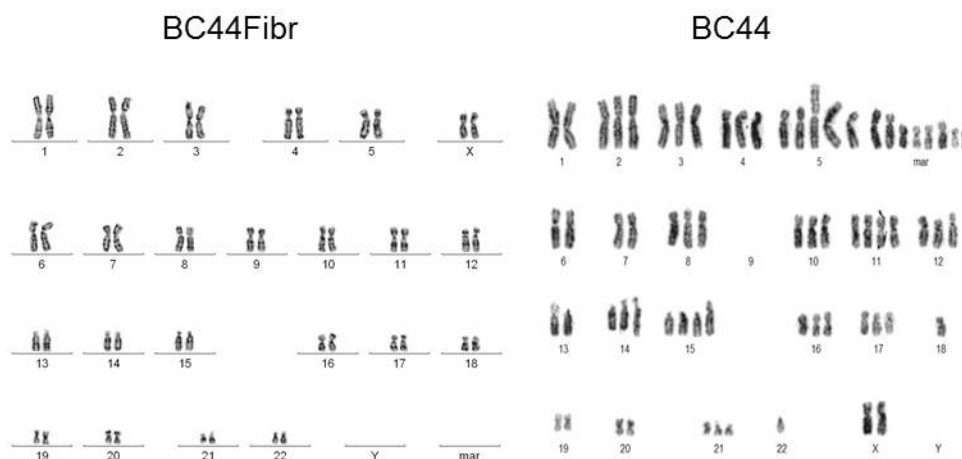
Obrázek 32 – Primární nádorová buněčná kultura BC44 a BC44Fibr v subkonfluentním stavu, zvětšeno 4x



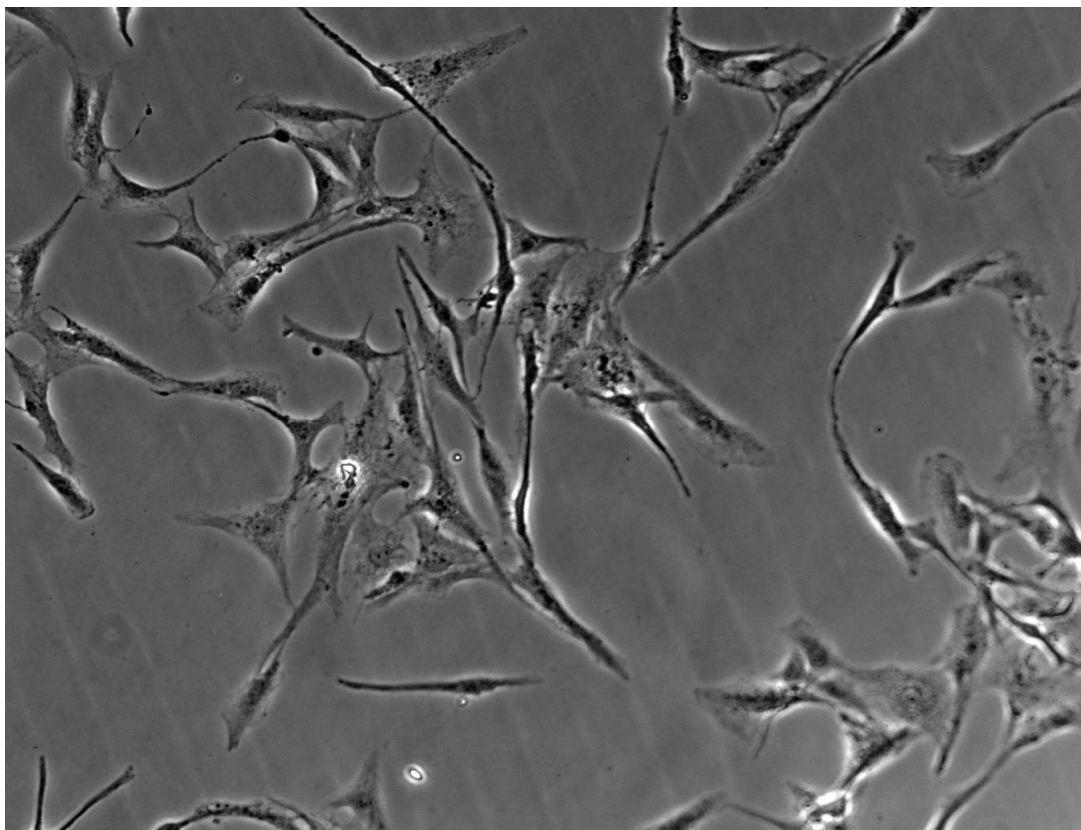
Obrázek 33 – Laboratorně připravená kokultivace BC44 a BC44Fibr, v konfluentním stavu, zvětšeno 4x

5.2.1 Základní charakteristika a původ BC44Fibr

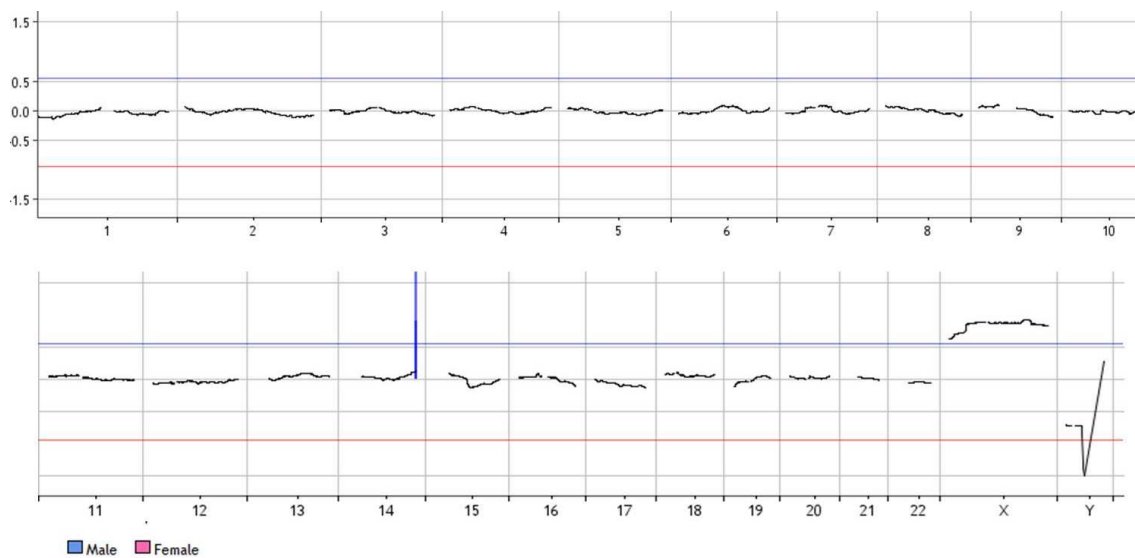
Původ fibroblastů v mase nádoru může být vysvětlen několika způsoby. Jedním z nich je epiteliálně-mezenchymální tranzice, kterou podstoupí epitelové nádorové buňky, další možností je existence lokální populace původních fibroblastů vyskytující se běžně v močovém měchýři či nešťastnou kontaminací nepříbuznými fibroblasty v průběhu buněčné kultivace. Námi popisované fibroblasty BC44Fibr vykazují na rozdíl od epiteliální buněčné line BC44 normální diploidní karyotyp a normální profil CGH včetně chromozomálních oblastí 17p, 3p a 9q, což dokazuje, že jejich původ epiteliálně-mezenchymální tranzicí z karcinomových buněk je vyloučen. Výsledky komparativní genomické analýzy a karyotypické analýzy jsou uvedeny na obrázcích 34 a 36. Odpověď fibroblastů na genotoxický stres zprostředkovaná p53 a vyvolaná 24hodinovou expozicí doxorubicinu (Obrázek 37) byla na rozdíl od buněčné linie BC44 normální, což je další argument, který vyvrací původ fibroblastů díky epiteliálně-mezenchymální tranzici [161].



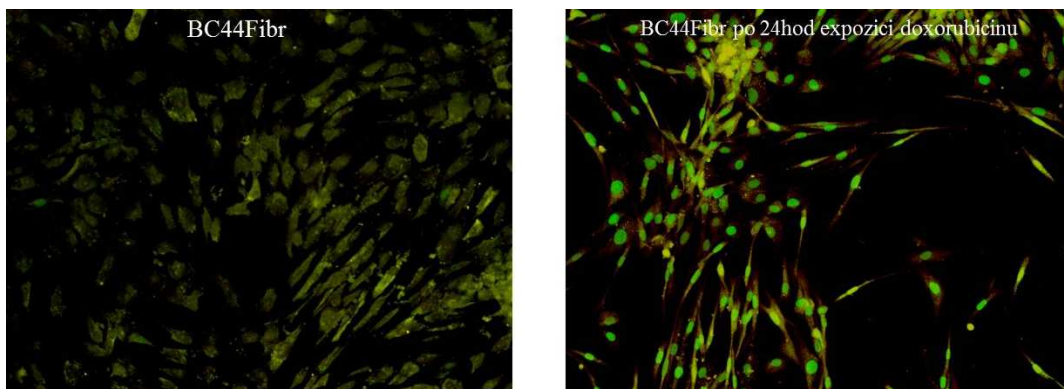
Obrázek 34 – BC44Fibr mají normální diploidní karyotyp, BC44 mají aneuploidní karyotyp. Analýza karyotypů vylučuje původ fibroblastů pomocí epiteliálně-mezenchymální tranzice (výsledky byly získány v rámci spolupráce s Ústavem lékařské genetiky Fakultní nemocnice v Plzni)



Obrázek 35 – Morfologie stromálních buněk BC44Fibr, fázový kontrast, zvětšeno 10x



Obrázek 36 – Výsledek komparativní genomické analýzy dokládá normální profil BC44Fibr včetně oblastí 17p, 3p a 9q (čísla označují chromozomy)

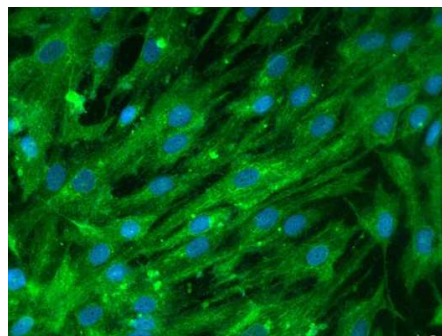


Obrázek 37 – BC44Fibr mají normální odpověď p53 na genotoxický šok vyvolaný 24hodinovou expozicí 300 nM doxorubicinu, což vylučuje jejich původ procesem epiteliálně-mezenchymální tranzice, zvětšeno 10x

Výsledky DNA analýzy uvedené v tabulce 19 ukázaly, že buněčná linie BC44 a BC44Fibr vykazují genetickou identitu a tedy kontaminace nepřibuznými fibroblasty je též vyloučena. Jedním ze znaků normálních suburotelových fibroblastů je exprese conexinu 43. Při imunofluorescenčním značení se na obrázku 38 ukázalo, že fibroblasty BC44Fibr jsou jednotně a silně pozitivní na tento marker, což dokládá jejich pravděpodobný původ [173, 174].

Tabulka 19 – Genetická identita BC44 pacient (DNA izolovaná z leukocytů pacientů), BC44 (DNA izolovaná z buněk nádorové linie) a BC44Fibr (DNA izolována z buněk stromální linie), (data byla analyzována na Urologické klinice Heinrich-Heineho univerzity v Düsseldorfu a získána v rámci spolupráce s prof. W.A. Schulzem) [161]

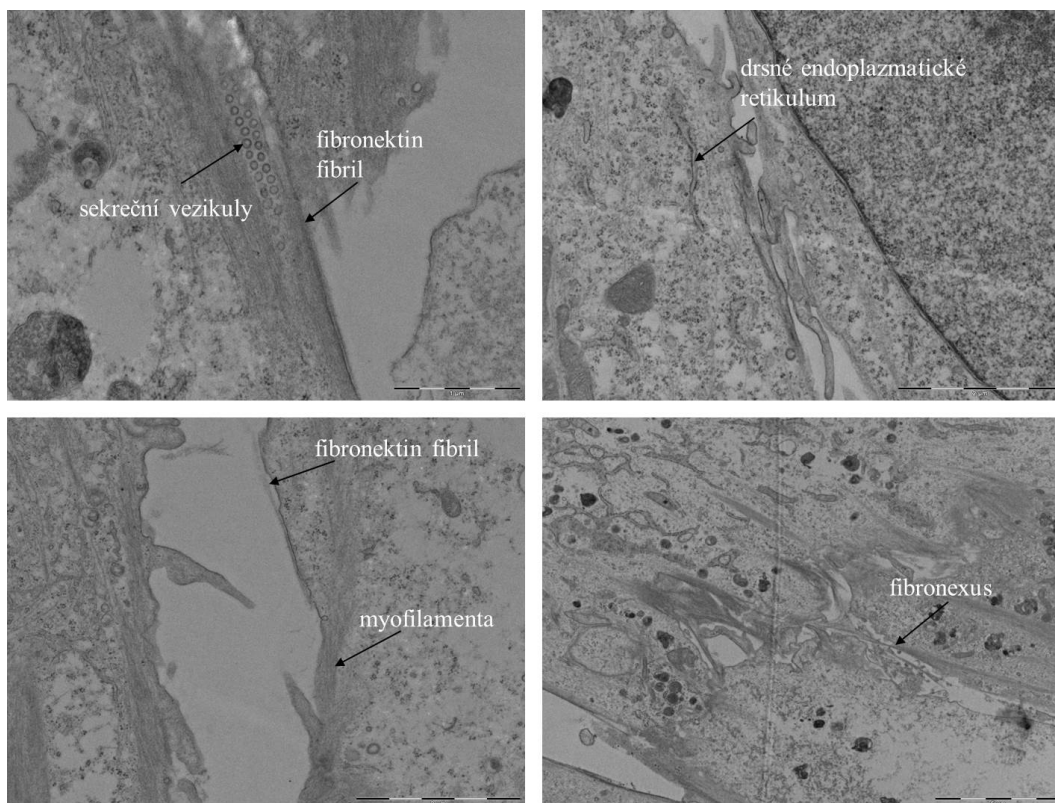
Název genetického markeru	BC44 pacient	BC44	BC44Fibr
<i>Hum VWA</i>	14-17	14-17	14-17
<i>D19S433</i>	14-15		14-15
<i>D18S51</i>	15-15	15-15	15-15
<i>TPOX</i>	8-11		8-11
<i>Hum TH01</i>	9,3	9,3	9,3
<i>D21S11</i>	28-30,2	28-30,2	28-30,2
<i>D8S1179</i>	14-14	14-14	14-14
<i>D5S818</i>	11-11		11-11
<i>D3S1358</i>	17-17	17-17	17-17
<i>D2S11358</i>	19-20		19-20
<i>FGA</i>	20-23	20-23	20-23
<i>SE33</i>		19-19	
<i>Amy</i>	XX	XX	XX



Obrázek 38 – Fluorescenčně značený konexin 43 u BC44Fibr jako znak urotelových fibroblastů, zvětšeno 10x

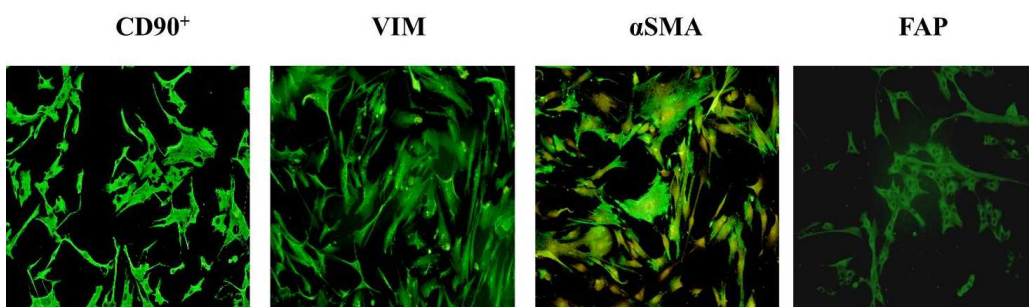
Znaky aktivovaných fibroblastů

Nádorově asociované fibroblasty se vyznačují řadou charakteristických znaků. Ultrastrukturální analýza BC44Fibr na obrázku 39 odhalila přítomnost všech kanonických znaků včetně fibronexu – transmembránovou strukturu spojující intracelulární kontraktilní aparát s extracelulární na fibronektin bohatou laminou, což je obecně považováno za znak aktivovaných fibroblastů [176, 177]. Dalšími rysy je morfologie a umístění Golgiho aparátu, kolagenové sekreční vezikuly, gap junction a další s aktinem asociovaná nedesmozomální spojení [176, 177]. Mimo to vykazují silnou a jednotnou pozitivitu na vimentin a α hladkosvalový aktin, což je obecně považováno další z kritérií pro definování nádorově asociovaných fibroblastů [191, 192].

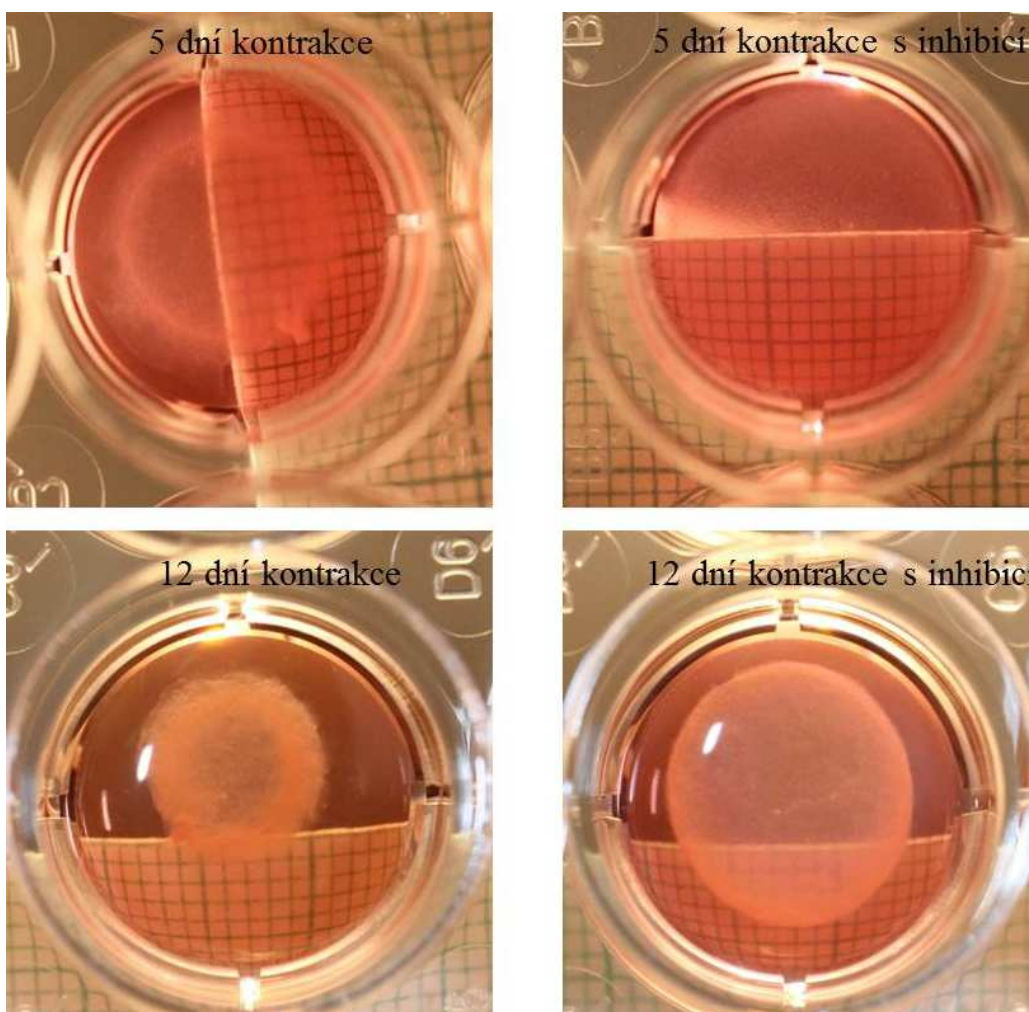


Obrázek 39 – Ultrastrukturální analýza BC44Fibr potvrzuje znaky aktivovaných fibroblastů (analýzy proběhly ve spolupráci s ÚMG AV ČR v Praze, oddělení Biologie buněčného jádra) [90]

Mezi další znaky aktivovaných fibroblastů patří pozitivita na povrchový marker CD90 a fibroblastový aktivovaný protein (FAP). Obrázek 40 ukazuje, že veškeré fibroblasty byly jednotně pozitivní na CD90 a více než 80 % z nich vykazovalo pozitivitu také na fibroblastový aktivovaný protein. Při analýze schopnosti kontrakce kolagenového gelu vykazovaly fibroblasty výraznou kontrakční aktivitu, což jasně ukazuje na jejich aktivovaný fenotyp (obrázek 41) [175].

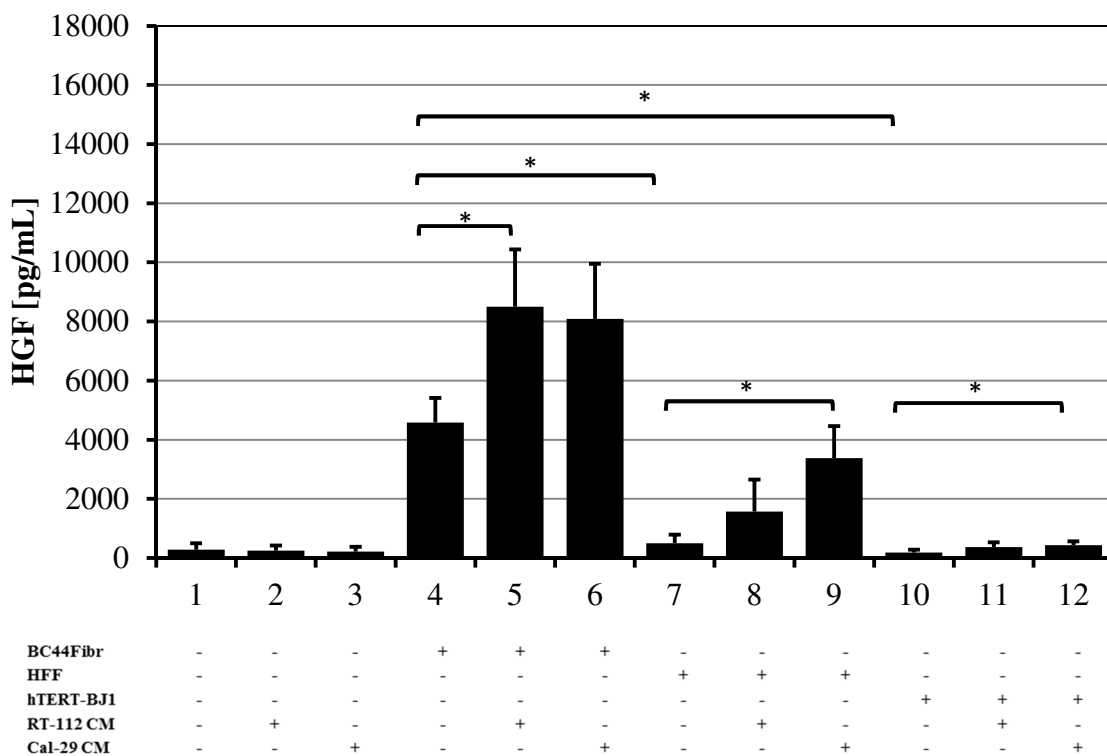


Obrázek 40 – Imunoprofil BC44Fibr potvrzuje znaky aktivovaných fibroblastů (imunofluorescenční značení na proteiny CD90, vimentin, α hladkosvalový aktin a fibroblastový aktivovaný protein), zvětšeno 10x

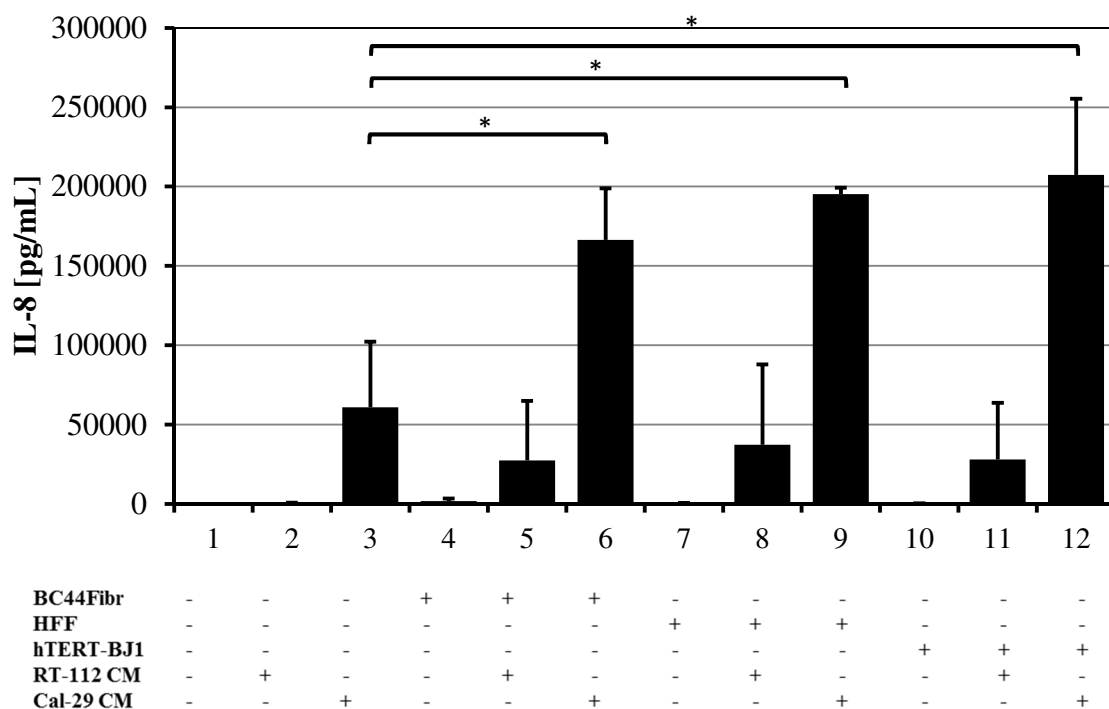


Obrázek 41 – Ukázka kontrakce kolagenového gelu potvrzuje aktivovaný fenotyp BC44Fibr

Dříve publikované výsledky ukazují, že při kokultivaci nádorových buněčných linií karcinomu močového měchýře RT112 a Cal-29 a primárních nádorových fibroblastů, secernují fibroblasty významné množství hepatocytárního růstového faktoru (HGF) a interleukinu 8 (IL-8) [169]. Nádorová buněčná linie BC44Fibr vykazovala při kokultivaci s nádorovými epitelálními buněčnými liniemi identické výsledky. Výsledky sekrece obou protumorigenních faktorů jako odpověď na signály nádorových buněk jsou uvedeny na obrázcích 42 a 43. Například sekrece růstového faktoru HGF a interleukinu 8 byla v kokultivaci RT112 + BC44Fibr signifikantně vyšší, než při kultivaci samotných RT112 (HGF: 8523,8 pg/ml ± 1925 pg/ml, resp. 4010 pg/ml ± 883,5 pg/ml, IL8: 27333 pg/ml ± 37619,2 pg/ml, resp. 1875,2 pg/ml ± 1529,7 pg/ml). Stejný trend je vidět na obrázcích 42 a 43 i při kokultivaci jiné nádorové buněčné linie Cal-29 se stromálními buňkami BC44Fibr.



Obrázek 42 – Sekrece protumorigenního faktoru HGF jako odpověď na signály nádorových buněk (n = 3, p < 0,05), (Analýzy byly provedeny ve spolupráci s Ústavem biochemie II, Univerzitní nemocnice v Jeně v Německu.)



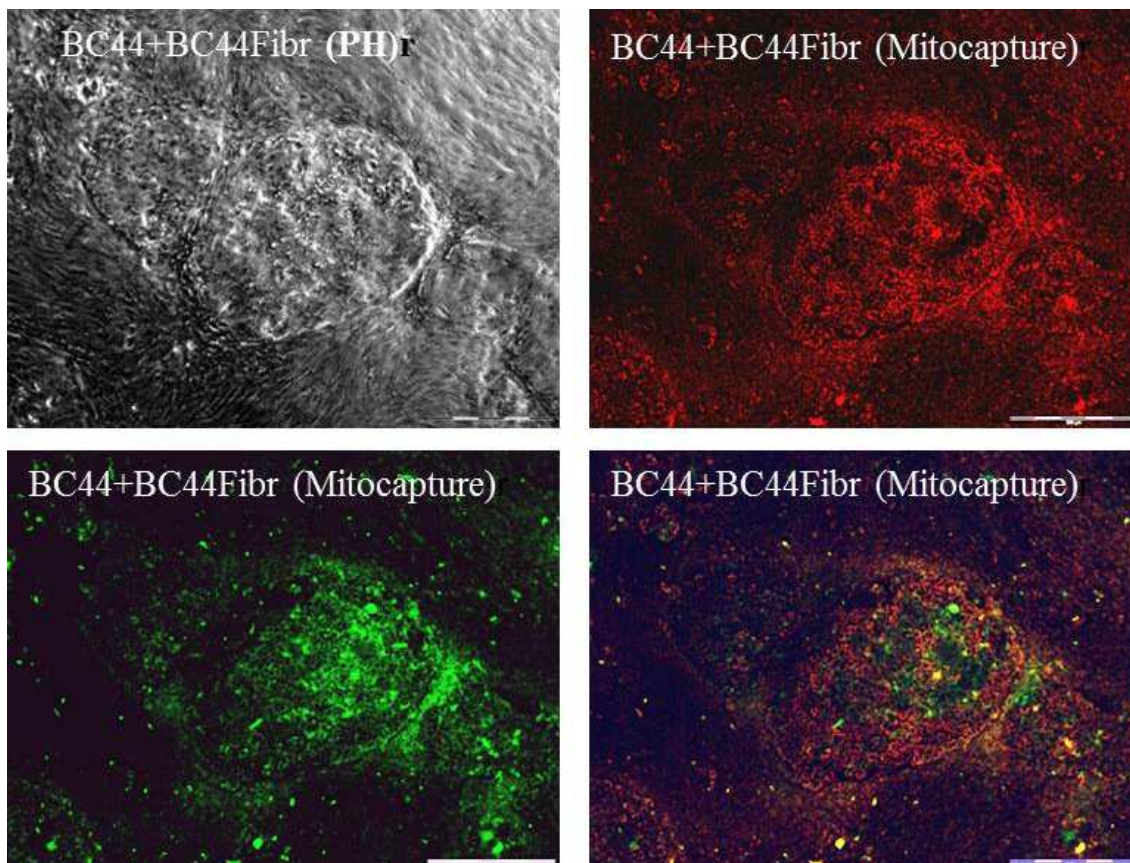
Obrázek 43 – Sekrece protumorigenního faktoru interleukinu 8 jako odpověď na signály nádorových buněk (n = 3, p < 0,05), (Analýzy byly provedeny ve spolupráci s Ústavem biochemie II, Univerzitní nemocnice v Jeně v Německu.)

Fenotyp nádorově asociovaných fibroblastů zahrnuje celou řadu specifických markerů. Naše výsledky ultrastrukturální analýzy buněk, imunofluorescenčního značení aktivovaných markerů, schopnosti kontrahovat kolagenový gel a sekrece protumorigenních faktorů jako odpověď na signály nádorových buněk dokazuje, že námi odvozená buněčná linie BC44Fibr má charakter nádorově asociovaných fibroblastů.

BC44Fibr způsobují terapeutickou rezistenci

- BC44Fibr podporují chemorezistenci nádorových buněk

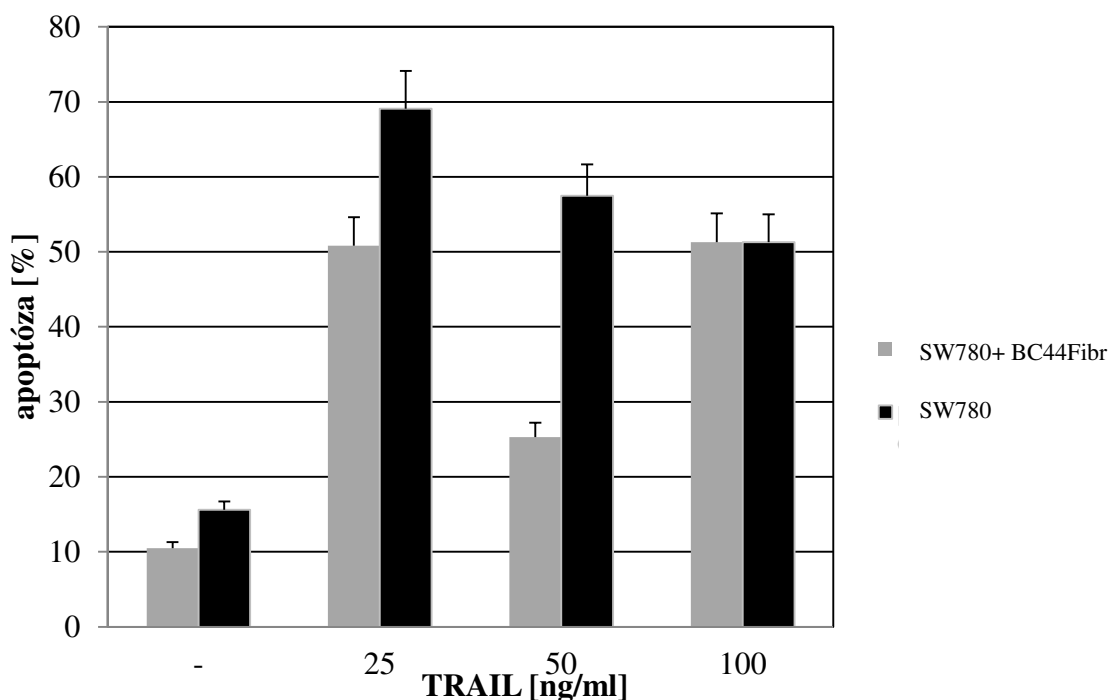
Porucha mitochondriálního potenciálu je jedním z raných ukazatelů apoptózy. MitoCapture fluoreskuje ve zdravých buňkách červeně, v apoptotických buňkách nemůže agregovat v mitochondriích, a výsledkem je pouze zeleně fluoreskující cytoplazmatická lokalizace monomerního barviva. Obrázek 44 ukazuje, že po aplikaci cisplatin (0,5 µg/ml, 48 hodin) dochází v kontaktní zóně, tedy v zóně kmenových nádorových buněk, k přežívání buněk (červeně fluoreskující buňky), zatímco uprostřed buněčné kolonie dochází u buněk k jejich výrazné apoptóze (zeleně fluoreskující buňky). Výsledky dokládají, že stromální buňky mají výrazný vliv jak na kmenové buňky, tak i na primární rezistenci nádorových buněk [8].



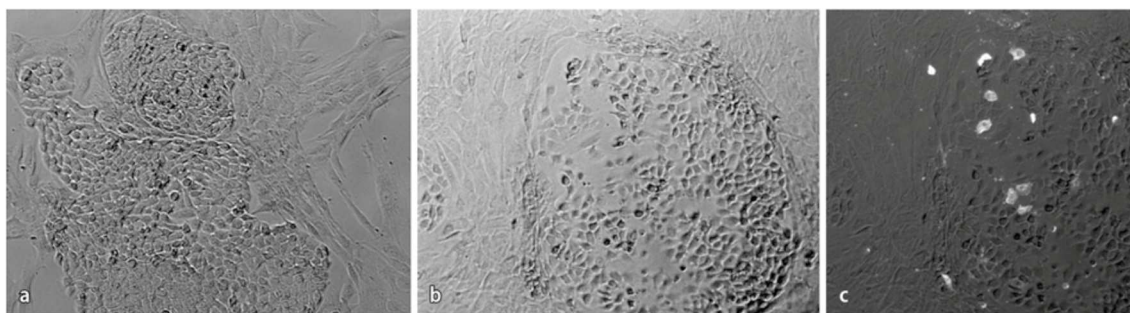
Obrázek 44 – Kokultivace BC44 + BC44Fibr ukazuje, že v kontaktní zóně dochází k výrazné rezistenci nádorových buněk na aplikované cytostatikum (cisplatina 0,5 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 48 hodin). Zatímco uvnitř buněčné kolonie dochází k apoptóze (PH – fázový kontrast, zeleně fluoreskující buňky vstupují do apoptózy, červeně fluoreskující buňky jsou intaktní), zvětšeno 4x [128]

- **BC44Fibr podporují rezistenci k ligandu indukujícím apoptózu (TRAIL – tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)**

Ligand TRAIL patří do rodiny tzv. faktorů nádorové nekrózy (TNF) se schopností aktivovat apoptózu pouze v nádorových buňkách a proto je často uvažován jako cíl protinádorové léčby. Naše pilotní analýza, která je zobrazena na obrázcích 45 a 46, ukázala, že buňky SW780 kokultivované s BC44Fibr jsou k TRAIL mnohem více rezistentní než samostatně kultivované buňky SW780. Po ošetření buněk SW780, resp. SW780 + BC44Fibr látkou TRAIL byla apoptóza hodnocena pomocí průtokového cytometru. Při koncentraci 25 ng/ml, resp 50 ng/ml byl prokázán silný chranný vliv BC44Fibr. To je jasný důkaz toho, že stromální buňky mají schopnost ochránit a podpořit nádorové kmenové buňky před indukovanou apoptózou a udržet tak kmenový fenotyp, který umožní nádoru i nadále přežít.



Obrázek 45 – Pilotní výsledky počtu buněk, u kterých TRAIL způsobil apoptózu ukazuje, že buňky SW780 kultivované společně s BC44Fibr jsou výrazně rezistentnější než samostatně kultivované SW780 (analýzy byly provedeny v rámci spolupráce s Dr. Z. Czubou z Ústavu mikrobiologie a imunologie Lékařské fakulty v Katovicích v Polsku)

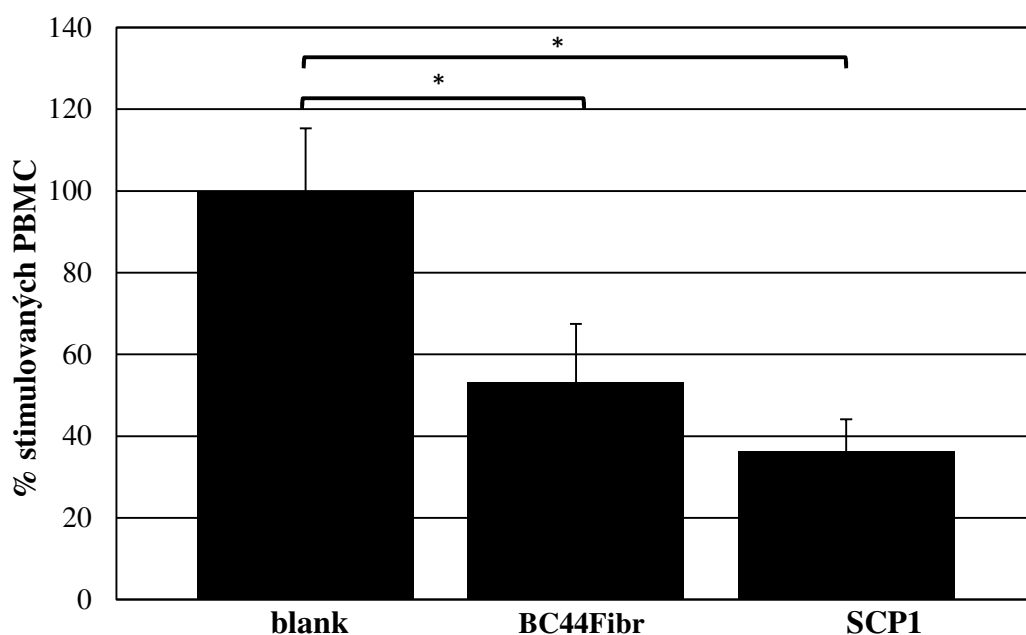


Obrázek 46 – Kokultivace SW780 a BC44Fibr ukazuje, že k TRAIL jsou rezistentní zejména ty buňky, které sousedí se stromálními BC44Fibr. Uprostřed kolonie nádorových buněk dochází k snížení hustoty buněk (apoptóze), zatímco buňky na okraji kolonie jsou buňky ovlivněné TRAIlem jen minimálně, fázový kontrast, zvětšeno 10x

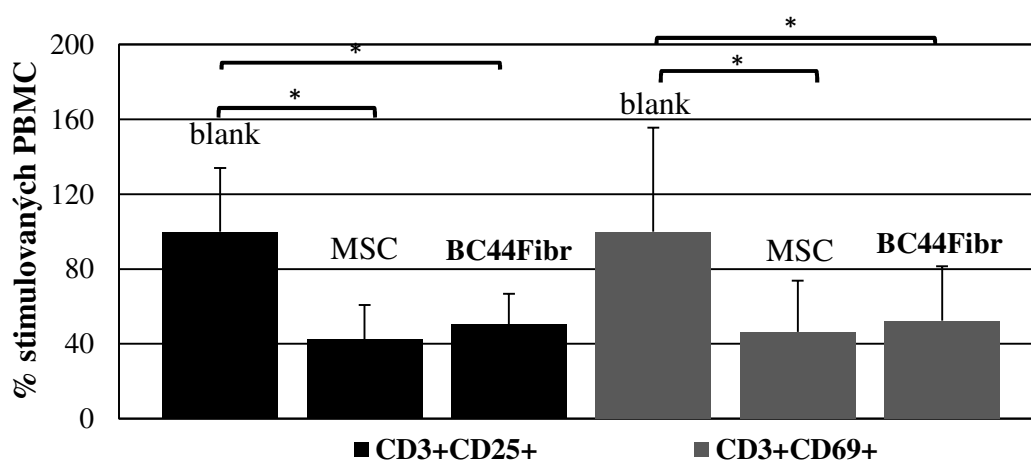
- BC44Fibr mají imunosupresivní účinek

Existují jasné důkazy o tom, že nádorově asociované fibroblasty mají podstatný vliv i na ostatní stromální buňky a to včetně imunitních. Pro zjištění imunosupresivních účinků fibroblastů bylo postupováno podle metodiky popsané v odborném článku Lysák *et al.* [193]. Naše výsledky ukazují, že imunosupresivní účinky mezenchymálních kmenových buněk (MSC a SCP1) a stromálních fibroblastů BC44Fibr se neliší a mají tedy

stejný potenciál regulovat imunitní odpověď a inhibovat aktivitu alogenně stimulovaných T-lymfocytů ($p < 0,01$). BC44Fibr výrazně snížily proliferační odpověď lymfocytů stimulovaných fytohemaglutininem o $46,8 \% \pm 14,3 \%$. Pro potvrzení zachování integrity buněk T-lymfocytů byly zvoleny dva aktivační markery – CD25⁺ a CD69⁺. Expres aktivačního markeru CD25⁺ byla snížena na hodnotu $50,3 \% \pm 16,5 \%$ a exprese CD69⁺ na $52,4 \% \pm 29,1 \%$. Obrázky 47 a 48 ukazují celkové výsledky imunosupresivního účinku fibroblastů BC44Fibr na proliferaci fytohemaglutininem stimulované PBMC.



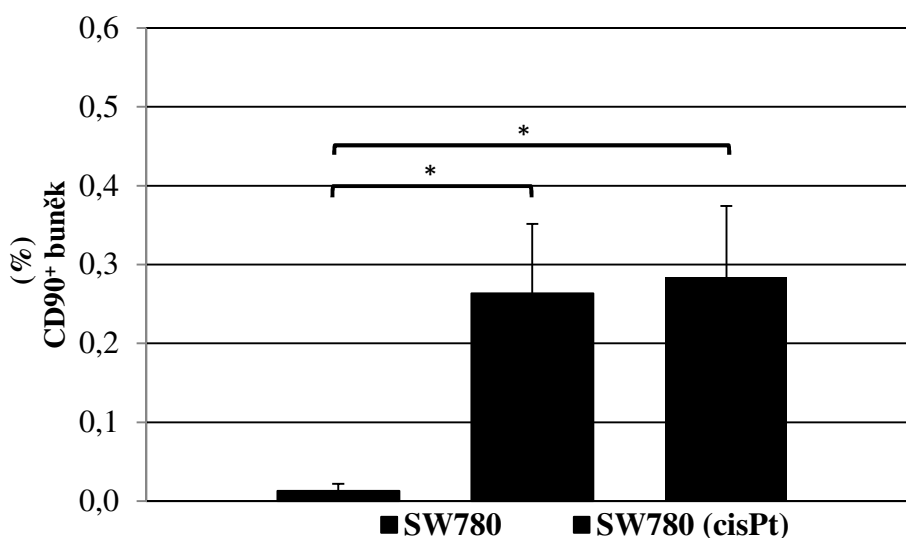
Obrázek 47 – Imunosupresivní účinek BC44Fibr a SCP1 na proliferaci PBMC stimulované fytohemaglutininem. Data byla vyhodnocena jako součet dělících se buněk v S a G2/M fázi buněčného cyklu ($n = 6$, $p = 0,037$)



Obrázek 48 – Imunosupresivní účinek BC44Fibr a MSC na expresi aktivačních markerů CD25 a CD69 u PBMC stimulovaných fytohemaglutininem ($n = 10$, $p = 0,027$)

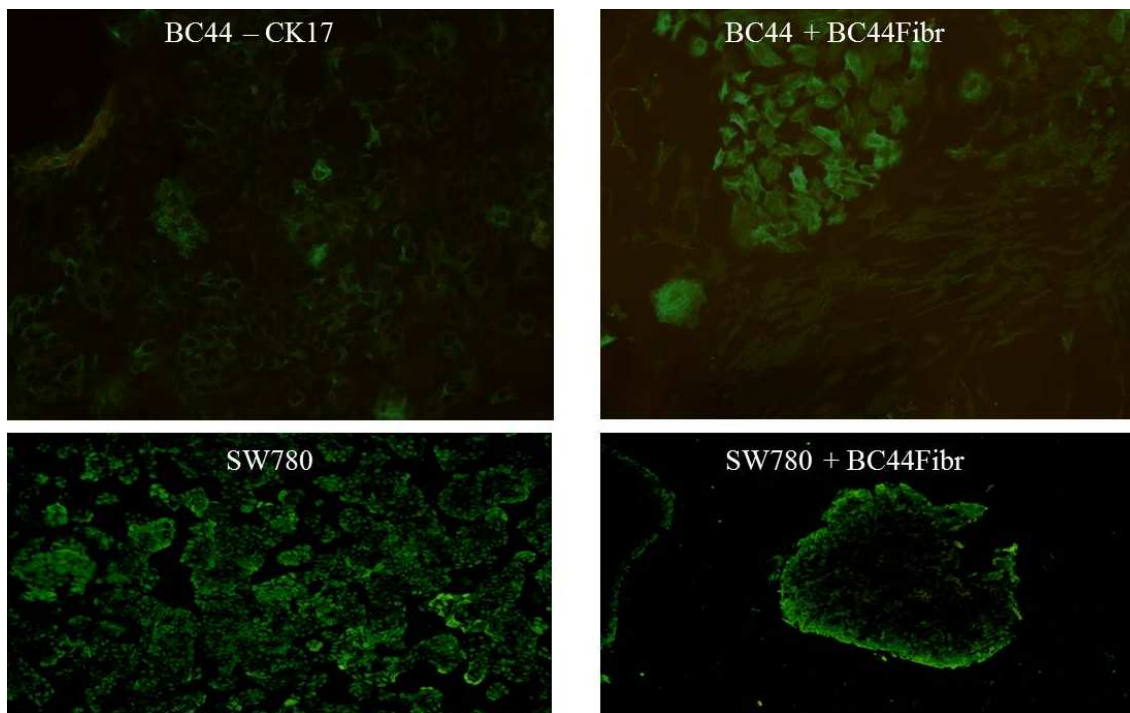
BC44Fibr aktivují u nádorových buněk kmenový fenotyp

Obrázek 49 ukazuje, že po aplikaci běžně užívaných cytostatik dochází u nádorových buněk k výraznému zvětšení subpopulace kmenových buněk. Po aplikaci cisplatiny, resp. doxorubicinu došlo k nárůstu množství kmenových buněk definovaných jako CD90⁺ z hodnoty 0,01 % ± 0,009 % na hodnotu 0,26 % ± 0,088 %, resp. 0,28 % ± 0,09 % [120]. Kmenové buňky tak ukazují další mechanismus vlastní ochrany, který velmi výrazně ovlivňuje terapeutickou rezistenci. Diferencované nádorové buňky jsou chemoterapií sice usmrceny, ale jsou okamžitě nahrazovány expanzí a diferenciací nádorových kmenových buněk. Jak jsme popsali výše, hnacím motorem pro nádorové kmenové buňky a jejich mobilizaci by mohl být prostaglandin E2, který se uvolňuje z odumírajících nádorových buněk [8]. Nádor se pak vlastně stává primárně rezistentním bez ohledu na použité chemoterapeutikum.

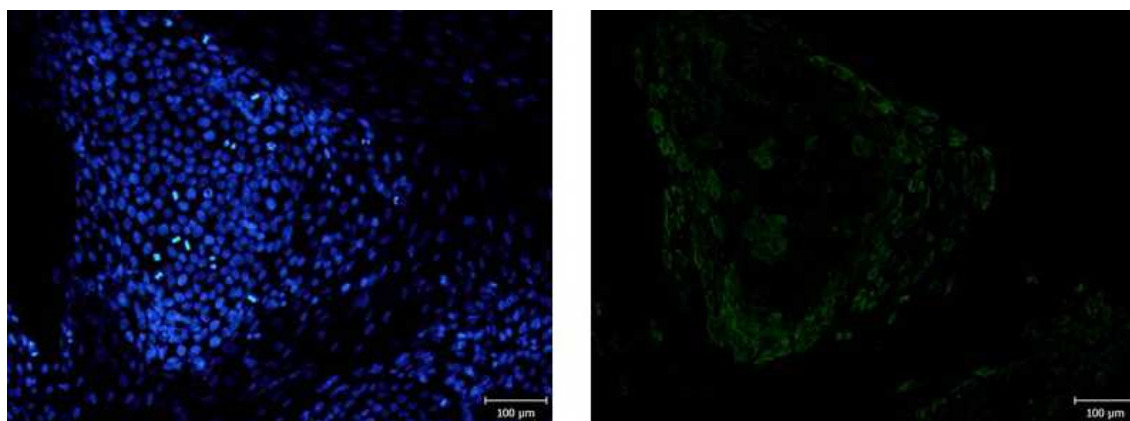


Obrázek 49 – Po aplikaci cytostatik (cisplatiny a doxorubicinu) dochází u buněčné linie SW780 k výraznému nárůstu subpopulace kmenových nádorových buněk (n = 9, p = 0,001)

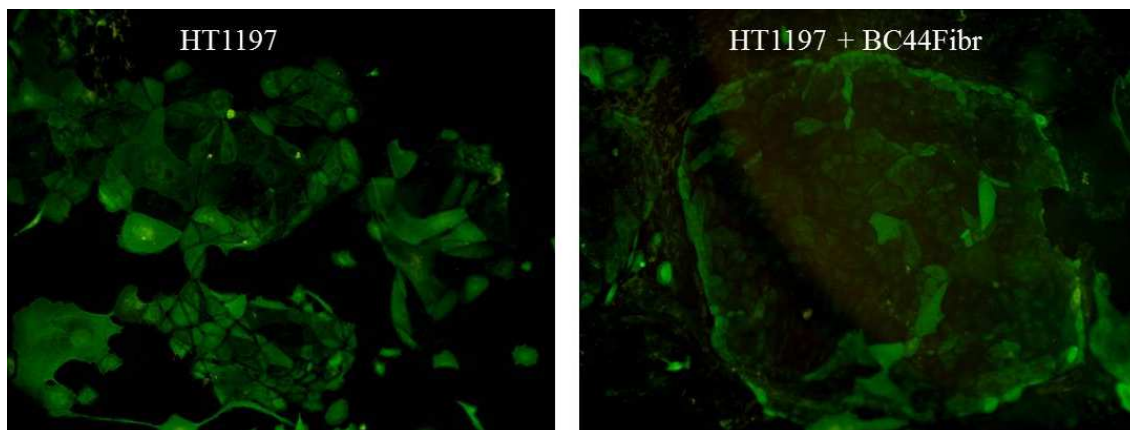
Jedním z možných vysvětlení chemo- a imunorezistentního fenotypu propůjčeného stromálními buňkami v kokultivačních systémech je právě podpora a udržení kmenového fenotypu nádorových buněk. Pro ověření této hypotézy byly stromální buňky BC44Fibr kultivovány jak příbuznými karcinomovými buňkami BC44, tak s nepříbuznými buněčnými liniemi urotheliálního karcinomu (HT1197, SW780), u kterých byly již dříve publikovány pravděpodobné markery kmenových buněk (SW780 – CK17, 67LaR, HT1197 – CD44v6) [117, 166]. Při imunofluorescenčním značení na obrázcích 50, 51 a 52 se ukázalo, že kmenové buňky byly lokalizovány na okraji kolonie epiteliálních nádorových buněk, tedy v těsném kontaktu s BC44Fibr.



Obrázek 50 – Kokultivace BC44 + BC44Fibr a SW780 + BF44Fibr odhalila vysokou expresi kmenově specifického CK17 na kontaktní zóně fibroblastů a nádorových buněk, zvětšeno 4x

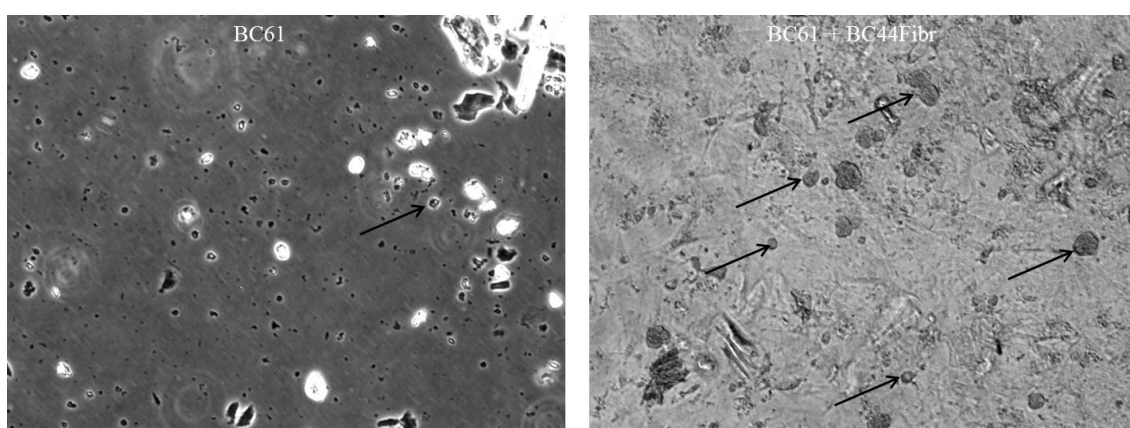


Obrázek 51 – Kokultivace SW780 + BC44Fibr odhalila vysokou expresi kmenově specifického CK17 na kontaktní zóně fibroblastů a nádorových buněk (zeleně fluoreskující buňky – CK17, modře – jádra), zvětšeno 20x



Obrázek 52 – Kokultivace HT1197 + BC44Fibr odhalila vysokou expresi kmenově specifického CD44v6 na kontaktní zóně fibroblastů a nádorových buněk (zeleně fluoreskující buňky – CD44v6), zvětšeno 10x

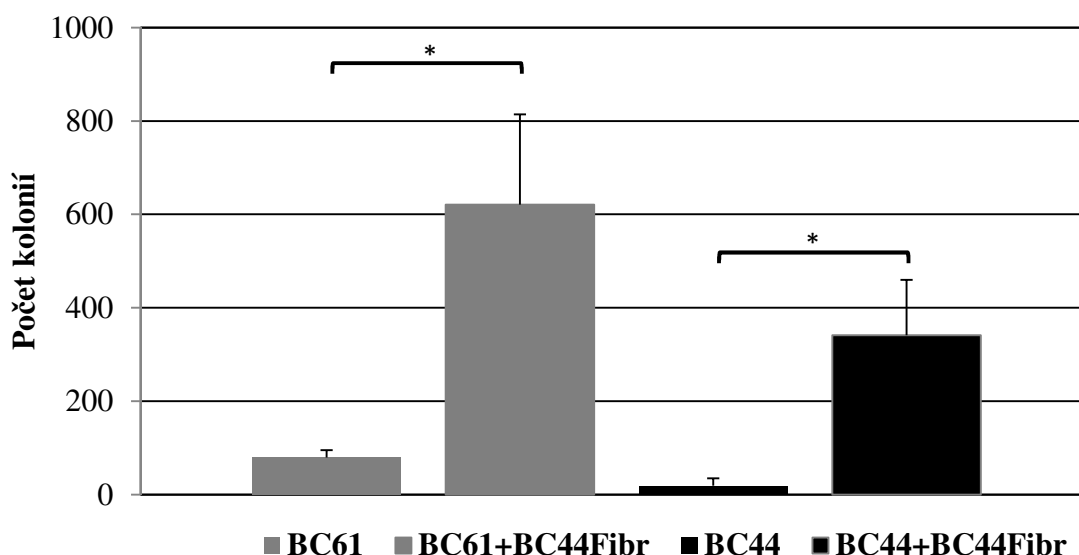
Současně stejný trend byl pozorován při růstu a tvorbě buněčných kolonií v polotekutém médiu, kde BC44Fibr ochránily nádorové buňky před apoptózou anoikis. Tento zvláštní stav dovolí buňkám přežít i bez pevného uchycení k extracelulární matrix a je zřejmě významným krokem v progresi nádorového onemocnění. Samostatně kultivovaným nádorovým buňkám BC61 resp. BC44 se při zabránění uchycení na dno kultivačního plastu podařilo založit jen omezené množství buněčných kolonií (80 ± 16 , resp. 19 ± 16), zatímco při kokultivaci (BC44 + BC44Fibr, resp. BC61 + BC44Fibr) byl pozorován silný stimulační efekt fibroblastů (697 ± 188 , resp. 3417 ± 120 kolonií). Výsledky počtu buněčných kolonií jsou uvedeny v tabulce 20 a na obrázku 53, obrázek 54 ukazuje reprezentativní fotografii vytvořených buněčných kolonií.



Obrázek 53 – Klonogenita v polotekutém médiu (vytvořené kolonie nádorovými buňkami BC61 kultivovanými samostatně a na monovrstvě BC44Fibr, šipkami jsou označené buněčné kolonie), fázový kontrast, zvětšeno 4x

Tabulka 20 – Počet buněčných kolonií vytvořených při kultivaci nádorových buněk samostatně (BC44 a BC61) a při kokultivaci (BC44 + BC44Fibr a BC61 + BC44Fibr), (n = 6, p < 0.05]

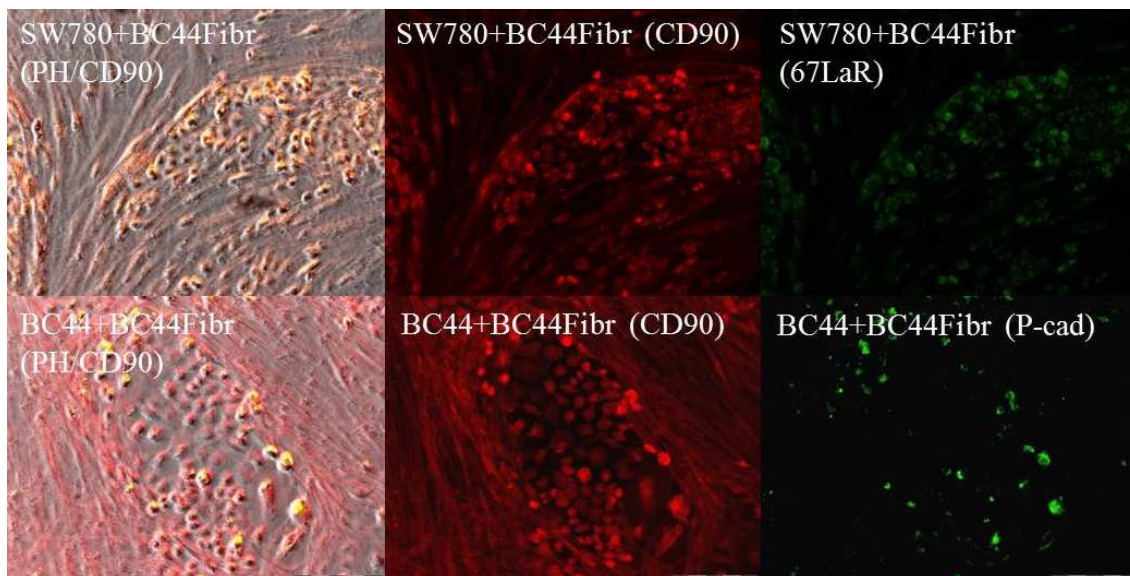
Nádorová buněčná linie	Počet buněčných kolonií
BC44	19 ± 16
BC61	80 ± 16
BC44 + BC44Fibr	341 ± 120
BC61 + BC44Fibr	697 ± 188
UMUC6 – kontrolní buněčná linie schopná tvořit kolonie	736 ± 210
DM – kontrolní buněčná linie schopná tvořit kolonie	626 ± 130



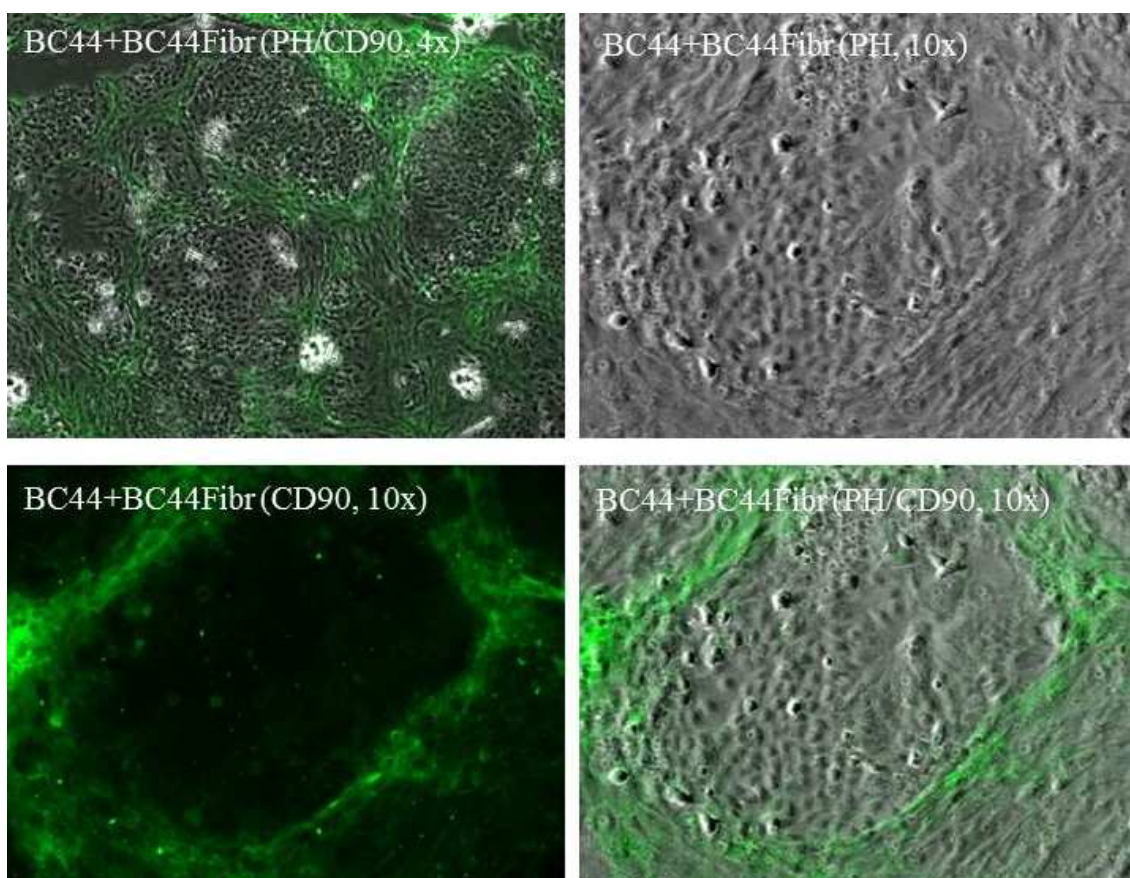
Obrázek 54 – Počet kolonií u nádorových buněk BC44 a BC61, které se vytvořily v důsledku podpory BC44Fibr (n = 6, p = 1,75.10⁻⁰⁴)

BC44Fibr aktivují expresi CD90 a dalších kmenových markerů v nádorových kmenových buňkách u buněčných linií BC44 a SW780

Při kokultivaci BC44Fibr a vybraných nádorových buněčných linií bylo ověřeno, že fibroblasty podporují kmenový fenotyp nádorových buněk. Využili jsme vlastností aktivovaných BC44Fibr a ukázali, že stromální buňky zvyšují expresi i dalších potenciálně kmenových markerů jako je CD90, 67LaR nebo P-cadherin. Obrázky 55 a 56 potvrzují, že kmenové buňky jsou opět v těsném kontaktu s fibroblasty tedy v kontaktní zóně mezi kolonií populací nádorových a stromálních buněk.

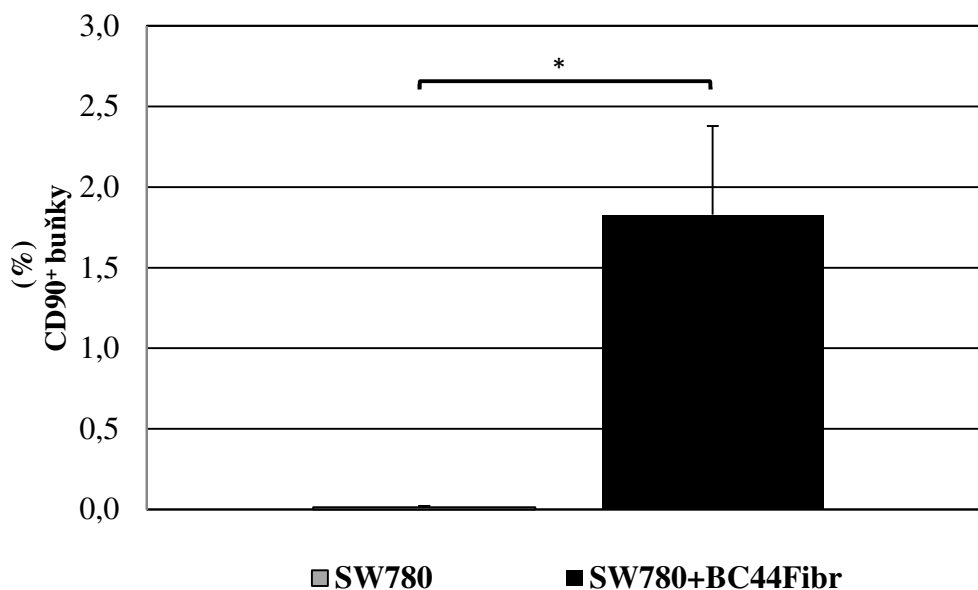


Obrázek 55 – Vizualizace kmenových nádorových buněk u buněčné linie BC44 a SW780 při kokultivaci s BC44Fibr (červeně fluoreskující buňky – CD90⁺ (BC44, SW780, BC44Fibr), zeleně fluoreskující buňky – (SW780) a P-cadherin (BC44), PH – fázový kontrast), zvětšeno 10x



Obrázek 56 – Kokultivace BC44 + BC44Fibr odhalila, že CD90⁺ buňky jsou v kontaktní zóně mezi nádorovými a stromálními buňkami (zeleně fluoreskující buňky – CD90 (BC44Fibr, kmenové nádorové buňky BC44)), zvětšeno 4x, 10x

Stejný trend byl ještě potvrzen pomocí průtokového cytometru, kdy BC44Fibr signifikantně zvyšovaly subpopulaci CD90⁺ buněk. Zatímco množství CD90⁺ u samostatně kultivovaných nádorových buněk SW780 bylo 0,1 % ± 0,001 %, při kokultivaci s BF44Fibr došlo k signifikantnímu nárůstu až na hodnotu 1,83 % ± 0,55 % (obrázek 57). Z našich celkových výsledků tedy plyne, že vliv stromálních buněk na kmenový fenotyp nádorových buněk je nesporný.



Obrázek 57 – Zvýšená exprese CD90⁺ buněk u samostatně kultivované nádorové buněčné linie SW780 a v kokultivaci SW780 + BC44Fibr (n = 9, p = 0,001)

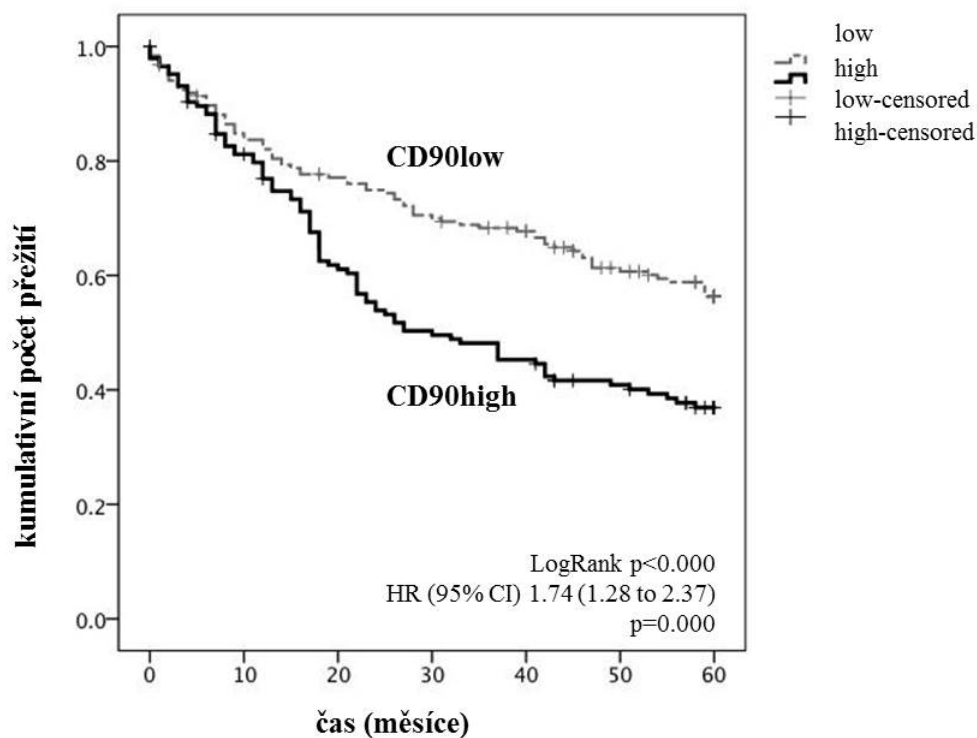
Silná pozitivita CD90 u stromálních buněk karcinomu močového měchýře jako nepříznivý faktor prognózy a progresu onemocnění

Stromální buňky mají na nádorové buňky karcinomu zcela zásadní vliv. Ukázalo se, že v případě karcinomu močového měchýře je přítomnost těchto buněk velmi negativním prognostickým faktorem. Studie, která hodnotila 344 histologických preparátů za účelem zkoumání potenciálních asociací mezi expresí CD90 u stromálních buněk a klinicko-patologických vlastností prognostického dopadu ukázala, že vyšší exprese CD90 u nádorově asociovaných fibroblastů je spojena s horší prognózou onemocnění (p < 0,001) a s významně kratším celkovým 5letým přežitím pacientů (p < 0,001). Tabulka 21 shrnuje výsledky studie exprese CD90 v souvislosti s věkem a pohlavím pacienta a patologickým hodnocením tumoru.

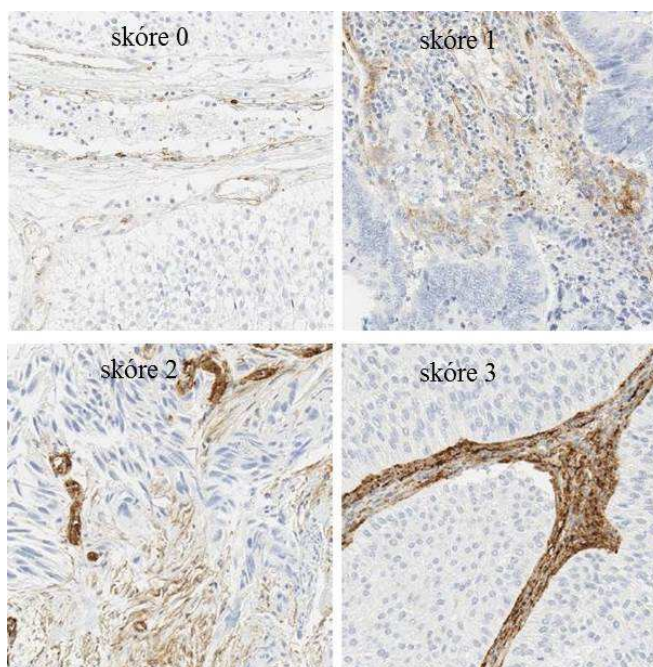
Tabulka 21 Parametry a výsledky studie, která hodnotila souvislost mezi stromální intenzitou CD90, věkem a pohlavím pacienta, stádiem TMN a gradem tumoru (studie byla provedena ve spolupráci s Dr. C. Strell z Cancer Center Karolinska ve Stockholmu)

Celkem pacientů (n)	344		
Stromální intenzita CD90	nízká	vysoká	Gamma test
n (%)	188 (56,5)	145 (43,5)	
Věk:			
≤65	56 (16,8)	28 (8,4)	
>65	132 (39,7)	117 (35,1)	0,031
Pohlaví:			
ženské	39 (11,7)	41 (12,3)	
mužské	149 (44,8)	104 (31,2)	0,122
Stádium:			
Ta	82 (24,6)	25 (7,6)	
T1	62 (18,6)	51 (15,3)	
T2, T3, T4	44 (13,2)	69 (20,7)	< 0,001
Grade:			
Low grade (1-2A)	55 (16,6)	19 (5,7)	
High grade (2B-4)	133 (39,9)	126 (37,8)	< 0,001

Výsledky kumulativního počtu přežití při vysoké pozitivitě na CD90 jsou zobrazeny na obrázku 58 a ukázky různé stromální intenzity CD90 jsou zachyceny na obrázku 59. Kromě toho se také ukázala mírná pozitivní souvislost mezi věkem pacienta a expresí CD90 ($p = 0,031$) a žádná asociace exprese CD90 a pohlavím pacienta. Studie byla provedena ve spolupráci s Dr. C. Strell z Cancer Center Karolinska ve Stockholmu.



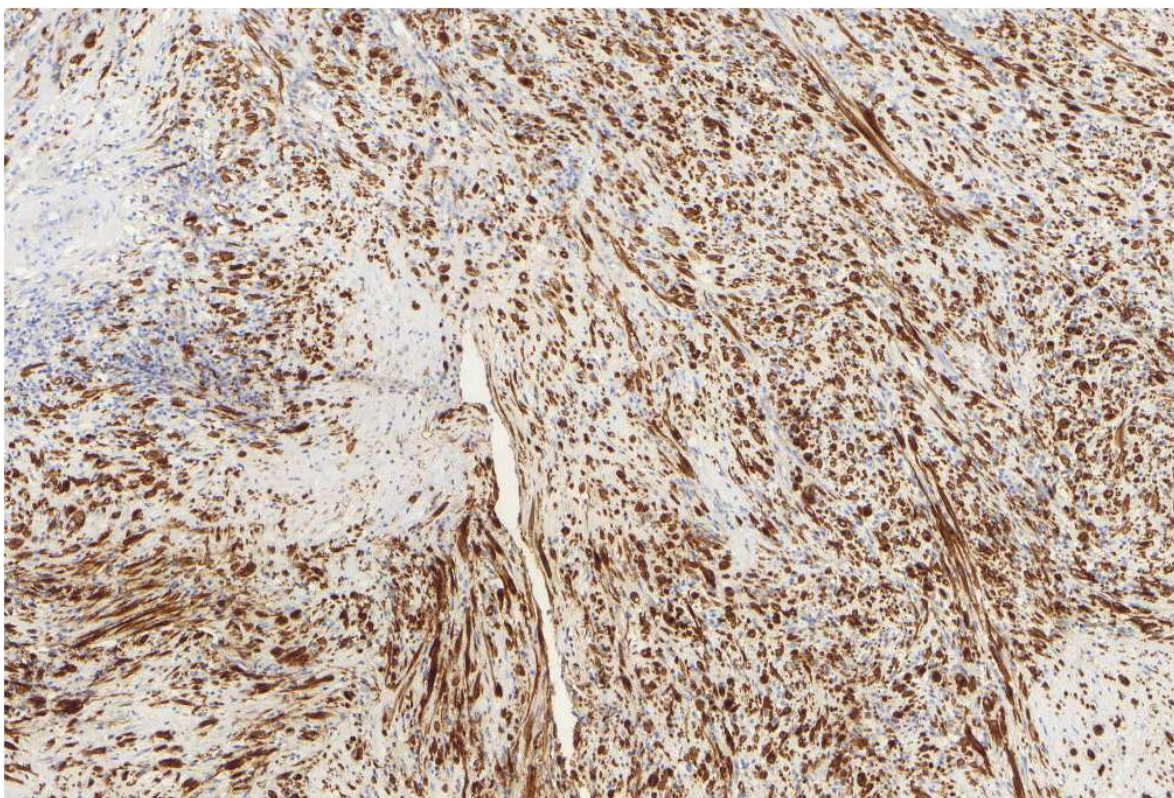
Obrázek 58 Kumulativní počet přežití při vysoké pozitivitě na CD90 (studie byla provedena ve spolupráci s Dr. C. Strell z Cancer Center Karolinska ve Stockholmu)



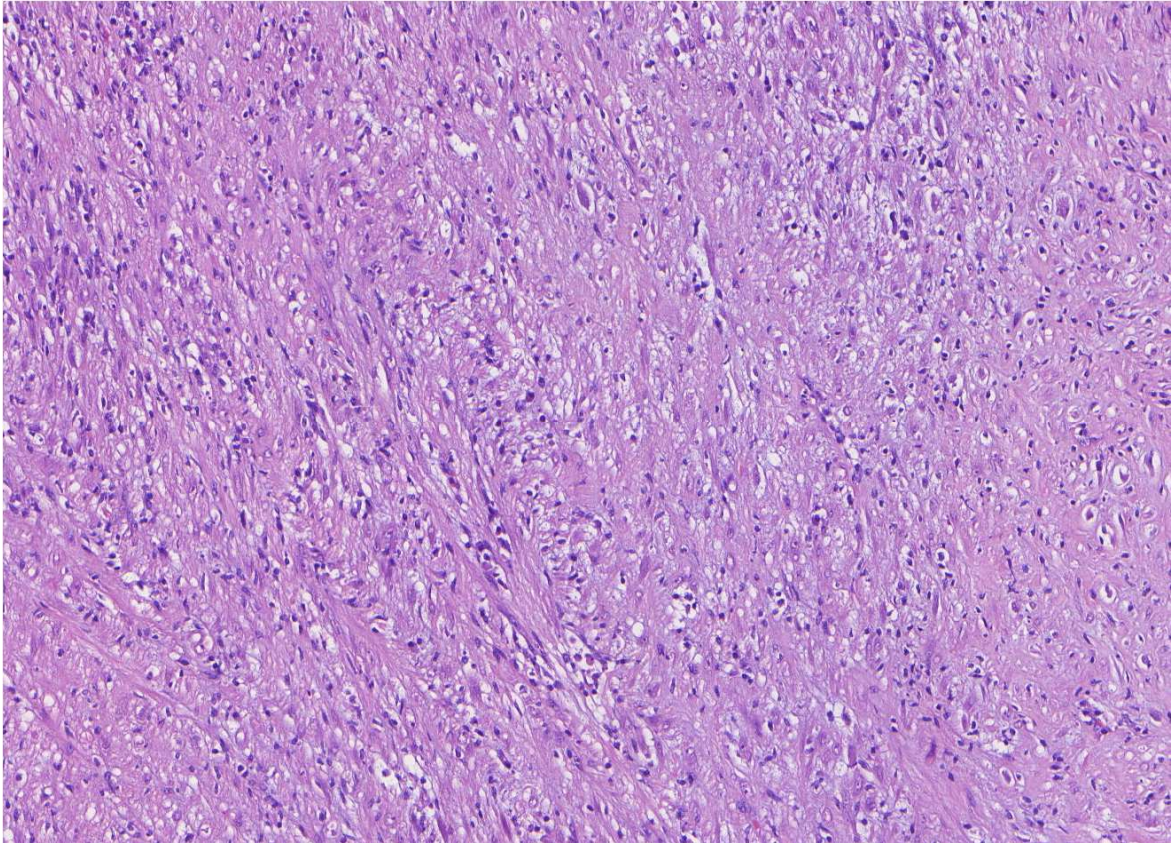
Obrázek 59 Stromální intenzita CD90 u různě pokročilých nádorů karcinomu močového měchýře, silná pozitivita byla spojena s horší prognózou pro pacienta ((studie byla provedena ve spolupráci s Dr. C. Strell z Cancer Center Karolinska ve Stockholmu)

5.2.2 Základní charakteristika a původ MBT

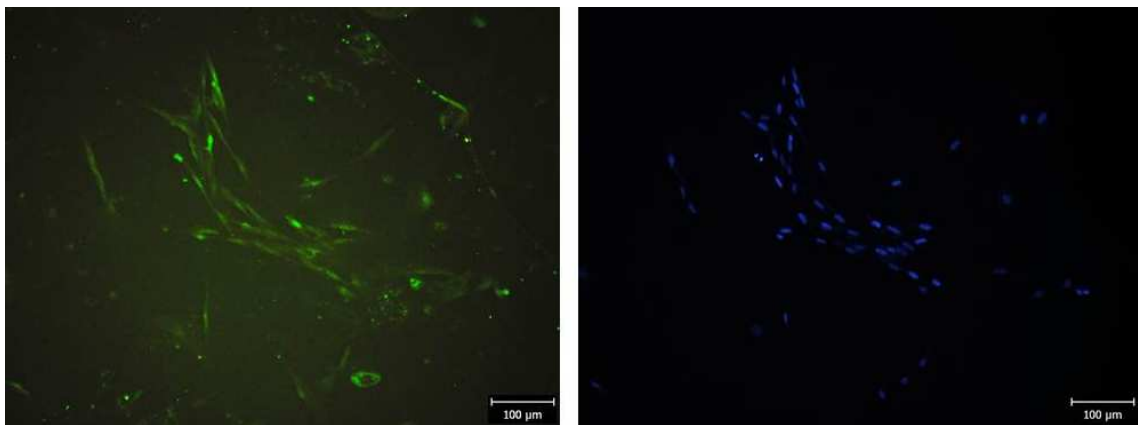
Pro potvrzení naší hypotézy, která se opírá o fakt, že stromální buňky jsou u karcinomu močového měchýře nezbytnou součástí mikroprostředí nádoru, byla využita ještě další mezenchymální buněčná linie. K odvození buněčné linie MBT byl použit vzorek tumoru, který byl získán při chirurgické resekci. Tumor byl patologem klasifikován jako poměrně raritní ALK-pozitivní myofibroblastický tumor močového měchýře, což je doloženo barvením histologického preparátu na obrázcích 60 a 61. Obrázek 62 ukazuje, že i po ustanovení permanentní buněčné linie jsou buňky i nadále ALK⁺.



Obrázek 60 – ALK-pozitivní imunohistochemické barvení řezu nádoru pacientky Urologické kliniky, z něhož byla na Ústavu Biologie odvozena buněčná linie MBT, (barvení a fotografie byly zpracovány ve spolupráci s prof. MUDr. Ondřejem Hesem ze Šiklova ústavu patologie Fakultní nemocnice v Plzni), zvětšeno 4x



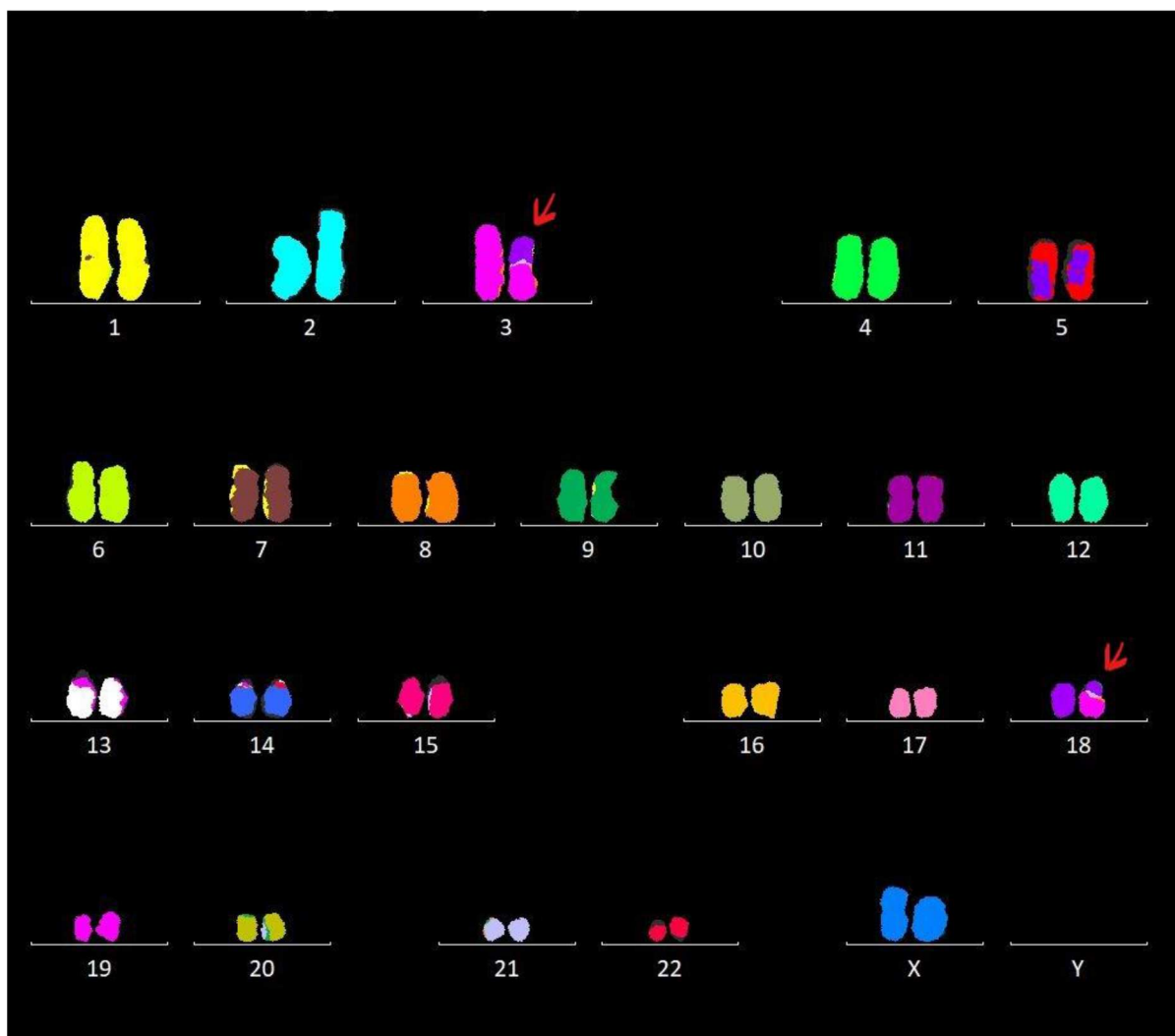
Obrázek 61 – Hematoxylinem a eosinem barvený řez nádoru pacientky Urologické kliniky, z něhož byla na Ústavu Biologie odvozena buněčná linie MBT (barvení a fotografie byly zpracovány ve spolupráci s prof. MUDr. Ondřejem Hesem ze Šiklova ústavu patologie Fakultní nemocnice v Plzni), zvětšeno 4x



Obrázek 62 – ALK-pozitivní buňky buněčné linie MBT odvozené na Ústavu biologie (zeleně fluoreskující buňky – ALK, modře – jádra), zvětšeno 20x

Mezenchymální buňky MBT vykazují dle obrázku 63 normální diploidní karyotyp. Obvykle bývá u 50 – 60 % myofibroblastických lézí močového měchýře nalézána translokace na chromozomu 2 (konkrétně 2p23) [154], v karyotypu námi odvozené buněčné linie byla nalezena translokace na krátkém raménku chromozomu 3 (konkrétně

3p18). Tato aberace nebyla doposud popsána u žádného myofibroblatického tumoru. Genetická identita původního vzorku od pacientky a buněk z následných dvou různých pasáží buněčných linií byla prokázána na základě fragmentační analýzy DNA a výsledky jsou uvedeny v tabulce 23. Zároveň se ukázalo, že získaný profil nevykazuje shodu s žádným profilem v databázi ATCC. Nejbližší profil v databázi ATCC vykazuje shodu max. 64 % a jedná se o buněčné linie Hs 611.T Hodgkin's Lymphoma Human (CRL-7373) a NCI-H661 Lung Carcinoma Human (HTB-183).



Obrázek 63 – Metoda Multicolor – FISH u buněčné linie MBT ukazuje diploidní karyotyp a translokaci na krátkém raménku chromozomu 3 (výsledky byly získány v rámci spolupráce s Ústavem lékařské genetiky Fakultní nemocnice v Plzni) [172]

Tabulka 22 – Genetická identita MBT pacientky (DNA izolovaná z leukocytů pacientky), MBT buněčných linií (DNA izolovaná z buněčné linie ve dvou různých buněčných pasážích), (analýza byla provedena společností Generi Biotech, s.r.o., Zkušební laboratoř č. 1650 akreditovaná ČIA podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005

Název genetického markeru	MBT (pasáž 1)		MBT(pacientka)		MBT (pasáž 10)	
<i>D8S1179</i>	13	14	13	14	13	14
<i>D21S11</i>	28	30	28	30	28	30
<i>D7S820</i>	10	10	10	10	10	10
<i>CSF1PO</i>	9	11	9	11	9	11
<i>D3S1358</i>	15	18	15	18	15	18
<i>TH01</i>	8	8	8	8	8	8
<i>D13S317</i>	11	12	11	12	11	12
<i>D16S539</i>	12	12	12	12	12	12
<i>D2S1338</i>	16	19	16	19	16	19
<i>VWA</i>	15	15	15	15	15	15
<i>TPOX</i>	8	8	8	8	8	8
<i>D18S51</i>	13	18	13	18	13	18
<i>AMEL</i>	X	X	X	X	X	X
<i>D5S818</i>	11	13	11	13	11	13
<i>FGA</i>	25	26	25	26	25	26
<i>D19S433</i>	14	14	14	14	14	14

Znaky aktivovaných fibroblastů

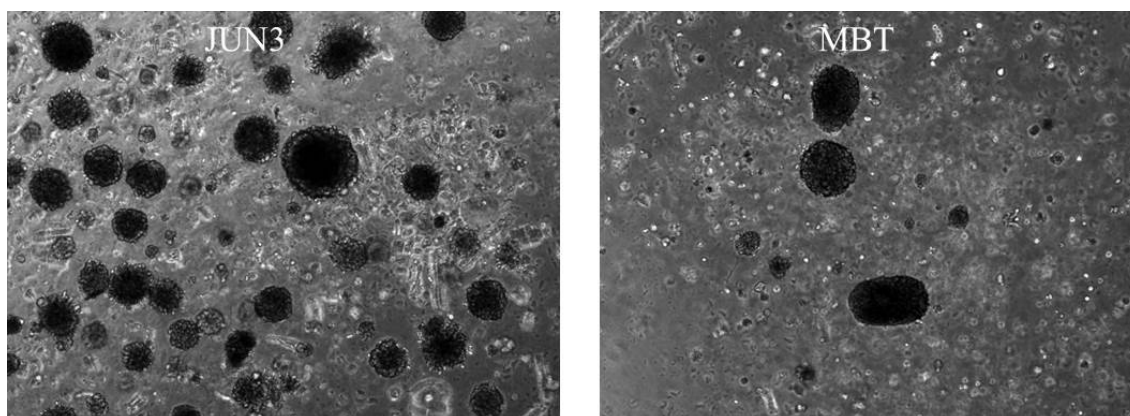
Podobně jako u BC44Fibr jsme u MBT buněk provedli základní imunofluorescenční analýzu na markerové proteiny aktivovaných myofibroblastů (CD90, vimentin a α hladkosvalový aktin) [191, 192]. Výsledky analýzy, které jsou na obrázku 64 ukázaly, že MBT buňky vykazují stejnou pozitivitu na sledované znaky jako stromální buněčná linie s karcinomem asociovaných fibroblastů BC44Fibr.



Obrázek 64 – Imunoprofil MBT potvrzuje znaky aktivovaných fibroblastů (imunofluorescenční značení na proteiny CD90, vimentin a hladkosvalový aktin), zvětšeno 10x

MBT jako další nezávislá stromální linie

Při kultivaci buněčné linie MBT v polotekutém médiu, kde je adherentním buňkám zabráněno pevnému uchycení ke kultivačnímu plastu se ukázalo, že buňky MBT nejsou schopny v tomto stavu výrazně proliferovat a podařilo se jim oproti kontrolní buněčné linii JUN3 založit jen omezené množství buněčných kolonií ($20 \pm 4,6$, resp. 1193 ± 103). Výsledky jsou přehledně doloženy v tabulce 23 a na obrázcích 65 a 66).

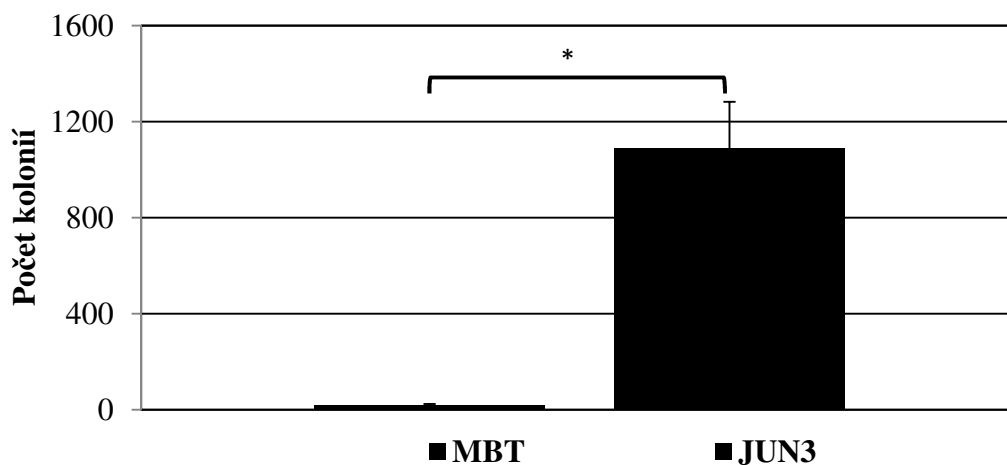


Obrázek 65 – Klonogenita v polotekutém médiu (vytvořené kolonie nádorovými buňkami JUN3 a MBT), fázový kontrast, zvětšeno 4x

Tabulka 23 – Počet buněčných kolonií vytvořených sarkomovou buněčnou linií MBT a myší fibrosarkomovou buněčnou linií JUN3 ($n = 6$, $p < 0,05$)

Buněčná nádorová linie	Počet buněčných kolonií
MBT	$20 \pm 4,6$
JUN3 – kontrolní buněčná linie schopná tvořit kolonie	1193 ± 103

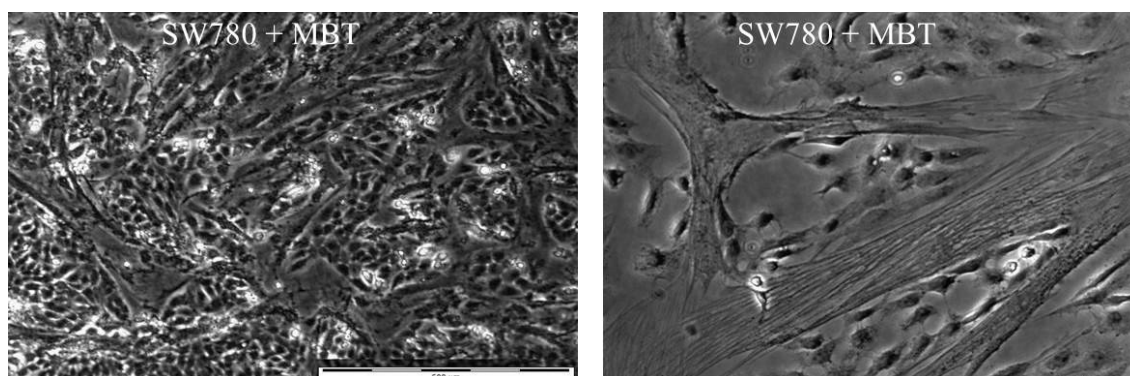
Na základě výsledků znaků aktivovaných fibroblastů a dalších analýz jako je motilita či klonogenicita v polotekutém substrátu jsme zjistili, že MBT buňky jsou málo transformované, nejsou klonogenní ani motilní (data nejsou součástí dizertační práce) a mohly by být další vhodnou alternativou nezávislé stromální buněčné linie vůči BC44Fibr.



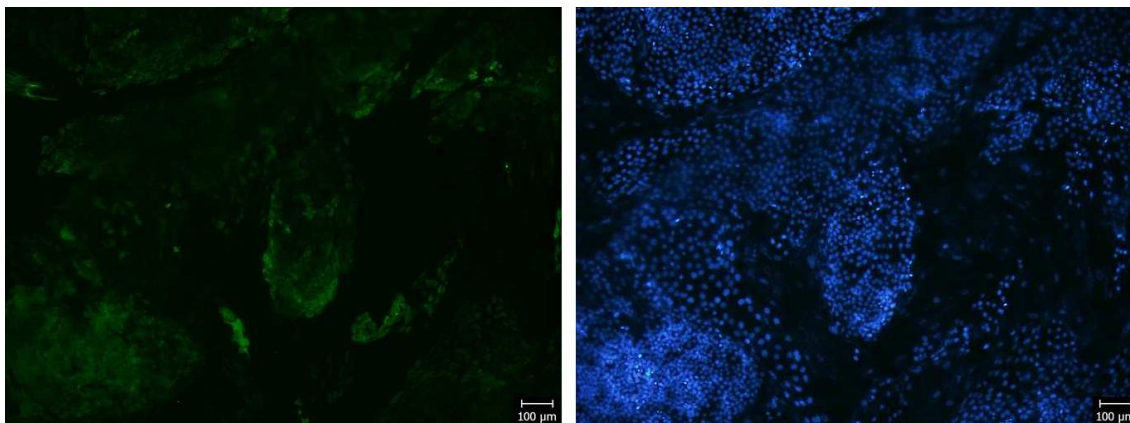
Obrázek 66 – Počet kolonií vytvořených sarkomovou buněčnou linií MBT a kontrolní fibrosarkomovou buněčnou linií JUN3 (n = 6, p = 0,05)

MBT aktivují u nádorových buněk kmenový fenotyp

Při kultivaci nádorových buněk samostatně a v kokultivaci s MBT se potvrdilo, že buňky MBT mají silný a srovnatelný vliv s BC44Fibr na podporu a udržení kmenového fenotypu nádorových buněk. Při společné kokultivaci buněk MBT s buněčnou linií SW780, která je zdokumentována na obrázcích 67 a 68 se ukázalo, že kmenové buňky jsou opět lokalizovány na okraji kolonie epiteliálních nádorových buněk, tedy v těsném kontaktu s buňkami stromálními (MBT).

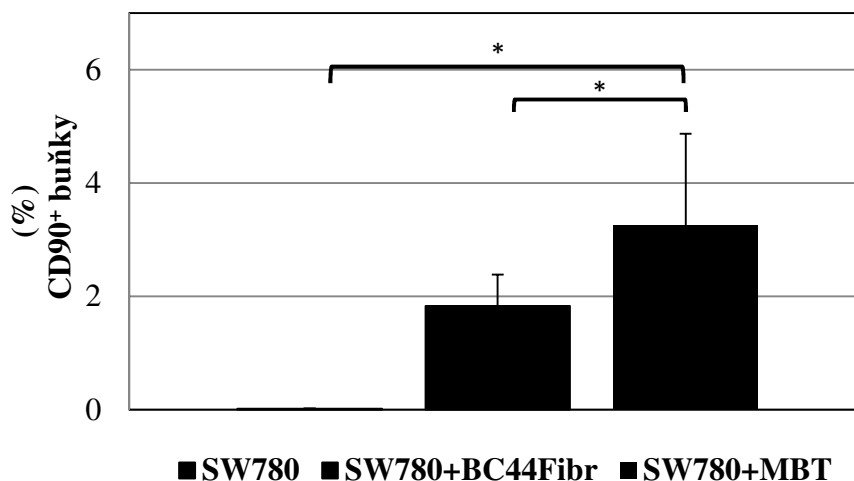


Obrázek 67 – Ukázka heterologního systému kokultivace nádorové buněčné linie SW780 a stromální buněčné linie MBT, fázový kontrast, zvětšeno 4x, 20x



Obrázek 68 – Kokultivace SW780 + MBT odhalila vysokou expresi kmenově specifického CK17 na kontaktní zóně sarkomových a nádorových buněk (zeleně fluoreskující buňky – CK17, modře – jádra), zvětšeno 10x

Stejný trend byl ještě potvrzen průtokovým cytometrem, kde MBT i BC44Fibr výrazně zvyšovaly subpopulaci CD90⁺ buněk. Zatímco množství CD90⁺ u samostatně kultivovaných nádorových buněk SW780 bylo 0,1 % ± 0,001 %, při kokultivaci s buněčnou linií MBT došlo k signifikantnímu nárůstu až na hodnotu 3,25 % ± 1,62 %. Celkové výsledky CD90⁺ buněk při různých možnostech uspořádání buněčných kultur jsou uvedeny na obrázku 69. Z našich celkových výsledků obou využitých typů stromálních buněk (BC44Fibr a MBT) plyne, že jejich vliv na kmenový fenotyp nádorových buněk je nesporný.



Obrázek 69 – Zvýšená exprese CD90⁺ buněk u samostatně kultivované nádorové buněčné linie SW780, v kokultivaci SW780 + BC44Fibr a v kokultivaci SW780 – MBT (n = 9, p = 0,001)

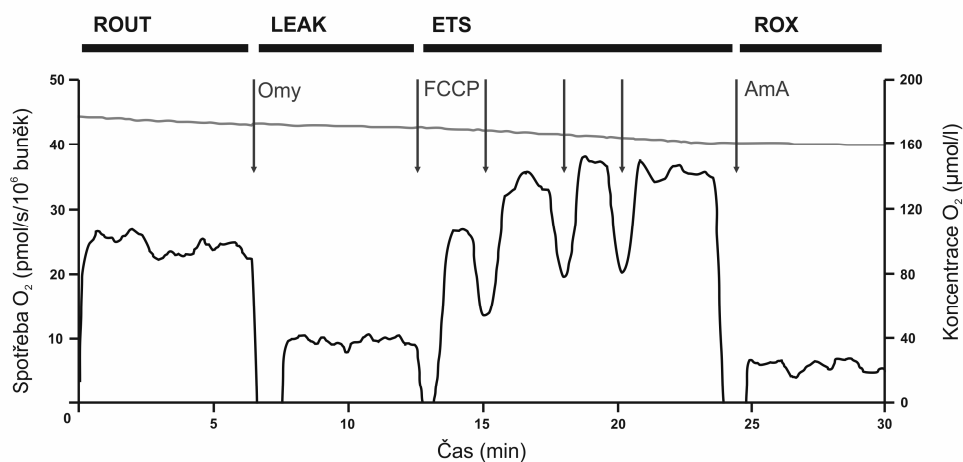
5.3 Výsledky a diskuse vztahující se k cíli 3

Cíl 3 Korelovat analyzované buněčné modely s intenzitou buněčného metabolismu

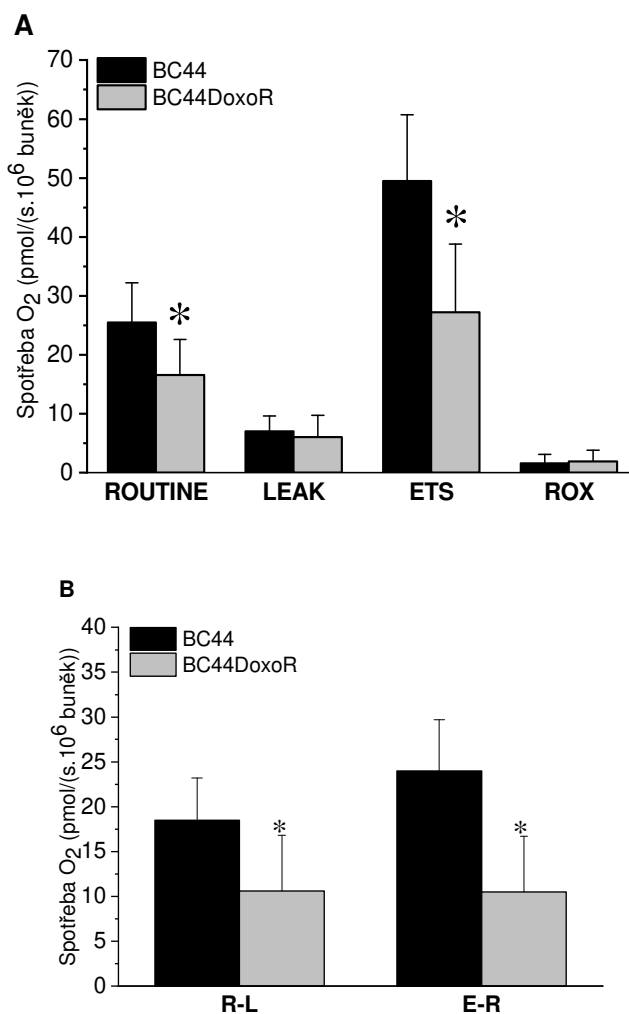
Pokusili jsme se u výše zmíněných buněčných modelů, tedy BC44 a BC44DOXOR, BC44 a BC44 + BC44Fibr analyzovat intenzitu buněčného energetického oxidativního metabolismu. Veškeré analýzy byly provedeny na intaktních buňkách pomocí oxygrafu Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Rakousko). Spotřeba kyslíku byla u všech buněk měřena stejným protokolem uvedeným na obrázku 70. Po stanovení bazální respirace (stav ROUTINE; R) byl pomocí inhibitoru ATP-syntázy – oligomycinu (Omy) navozen stav LEAK odpovídající spotřebě kyslíku nutné pro kompenzaci úniku protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Kapacita systému přenášet elektrony (ETS) byla stanovena pomocí titrace rozpřahovače trifluorkarbonylkyanidu fenylylhydrazonu (FCCP) a zbytková spotřeba kyslíku injekcí inhibitoru komplexu III antimycinu A (AmA) (ROX) [181]. Všechny respirační stavy byly korigovány na ROX.

5.3.1 Buněčný model BC44 a BC44DoxoR

Ukazuje se, že chemorezistence je úzce spojena také s metabolickým fenotypem. U buněčné linie BC44, tedy linie, která je ke zvoleným cytostatikům vysoce senzitivní, byla respirace mnohem účinnější než u rezistentní linie BC44DoxoR, což dokládají stavy bazální respirace (R), maximální možné spotřeby kyslíku (ETS) a především spotřeba kyslíku dostupná pro syntézu ATP označovaná jako volná R kapacita (R-L), které byly signifikantně nižší u chemorezistentních buněk (Obrázek 70A a B). Nižší respiraci buněk BC44DoxoR nelze vysvětlit sníženým počtem mitochondrií, neboť aktivita citrátsyntázy, která je používána jako jeden z markerů množství mitochondrií v buňkách, se mezi oběma liniemi signifikantně nelišila ($25,4 \pm 6,0$ mIU/ 10^6 buněk u linie BC44 a $22,0 \pm 8,3$ mIU/ 10^6 buněk u linie BC44DoxoR). Poměr R/E vyjadřující podíl bazální respirace na celkové kapacitě elektrontransportního systému přenášet kyslík byl statisticky významně vyšší u chemorezistentních buněk, což naznačuje možnost částečné kompenzace zvýšeného rozpřažení oxidace a fosforylace nebo zvýšenou potřebu ATP nebo zhoršení oxidační kapacity díky defektům v elektrontransportním systému. Vzhledem ke snížené absolutní hodnotě spotřeby kyslíku vztahované k tvorbě ATP (R-L) a signifikantně nezměněným indikátorům rozpřažení (poměry L/E a L/R) lze za pravděpodobnější považovat zhoršenou funkci respiračních komplexů nebo defektní oxidaci substrátů u linie BC44DoxoR. Chemosenzitivní buňky naopak vykazují větší závislost na oxidativní fosforylaci a také jejich respirace je efektivnější než je tomu u buněk rezistentních (stavy R-L a E-R). Nižší metabolická kapacita u linie BC44DoxoR by mohla být také důvodem pomalé proliferace. Veškeré vypočítané respirační poměry jsou uvedeny v tabulce 24.



Obrázek 70 – Titrační protokol v intaktních buňkách BC44, černá čára – spotřeba kyslíku vyjádřena na milion buněk a sekundu, šedá čára – koncentrace kyslíku v oxygrafické komoře



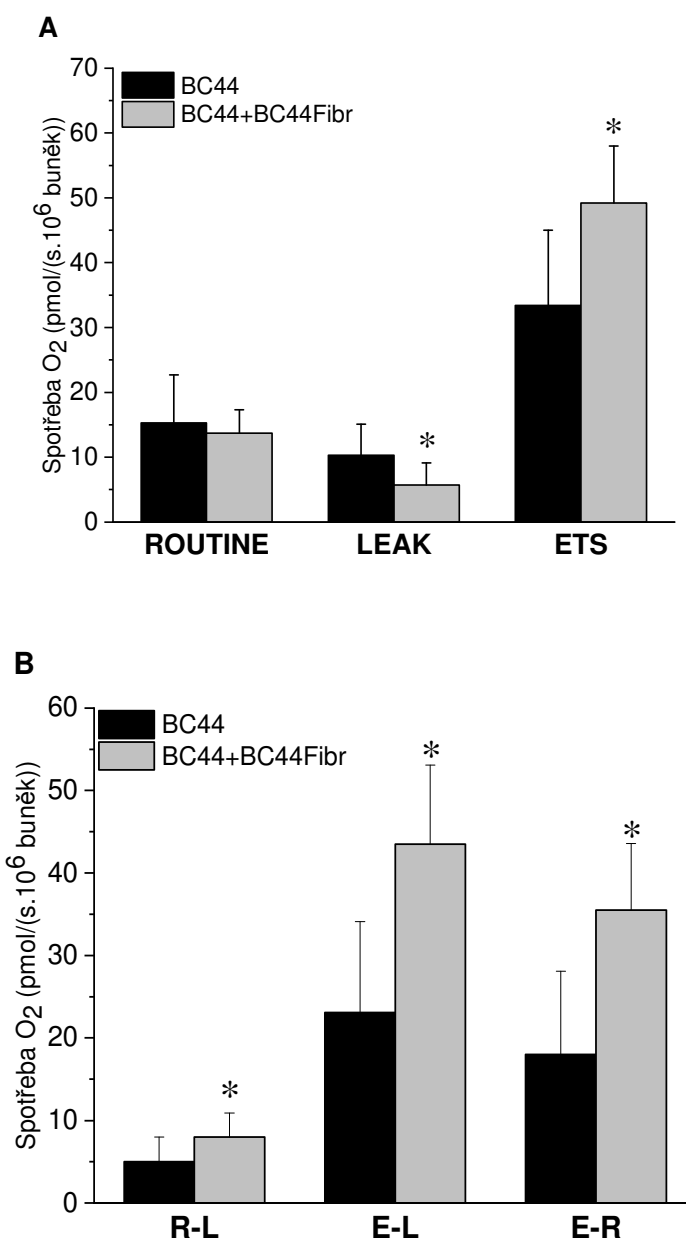
Obrázek 71 – Bazální respirace, stavy LEAK, ETS a reziduální spotřeba kyslíku (A) a spotřeba kyslíku vztažená k produkci ATP (R-L) a volná elektrontransportní kapacita (E-R) v buňkách BC44 a BC44DoxoR (B), $p < 0,05$

Tabulka 24 – Respirační poměry

	BC44	BC44DoxoR	t-test	
R/E	0,51 ± 0,07	0,62 ± 0,1	p < 0,05	kontrolní poměr R/E
L/E	0,14 ± 0,04	0,23 ± 0,15	n.s.	kontrolní poměr spřažení při stavu E
L/R	0,27 ± 0,06	0,37 ± 0,24	n.s.	kontrolní poměr spřažení při stavu R
(E-R)/E	0,49 ± 0,07	0,37 ± 0,1	p < 0,05	faktor nadbytečné kapacity ETS

5.3.2 Buněčný model BC44 a BC44 + BC44Fibr

V kapitole 5.2 se ukázalo, že stromální buňky jsou podstatnou součástí nádorů a velmi významně modulují některé vlastnosti nádorových buněk. Pokusili jsme se zhodnotit, jaký vliv mají BC44Fibr na intenzitu buněčného metabolismu nádorových buněk. Ukázalo se, že bazální spotřeba kyslíku buňkami BC44 ($13,7 \pm 3,6$ nmol/(s. 10^6 buněk)) se nelišila od bazální respirace buněk BC44 kokultivovaných s BC44Fibr ($15,3 \pm 7,4$ nmol/(s. 10^6 buněk)). Naproti tomu stav LEAK byl u buněk BC44 v kokultivaci s BC44Fibr významně nižší a stav ETS vyšší než v buňkách BC44 kultivovaných samostatně (Obrázek 71A a B). Stav odrážející syntézu ATP za bazálních podmínek, tj. volná R kapacita (R-L) se kokultivací nádorových buněk BC44 s fibroblasty BC44Fibr signifikantně zvýšila, stejně jako volná ETS kapacita (E-L) a nadbytečná ETS kapacita (E-R), což ukazuje na zvýšení oxidativního metabolismu v kokultivovaných buňkách.



Obrázek 72 – Míra spotřeby kyslíku ve stavech R (ROUTINE), L (LEAK) a E (kapacita ETS) (A), R-L (volná R kapacita), E-L (volná ETS kapacita) a E-R (nadbytečná ETS kapacita) měřené v buňkách BC44 a BC44 + BC44Fibr a vyjádřené na milion buněk a sekundu (B), kyslíkové toky byly korigovány na zbytkovou spotřebu kyslíku, $p < 0,05$

Také kontrolní respirační poměry vztažené na obě respirační rychlosti R a E (tj. L/R a L/E) byly významně nižší u buněk BC44 kokultivovaných s BC44Fibr, což potvrzuje vyšší stupeň spřažení oxidace a fosforylace u těchto buněk. Lepší účinnost produkce energie a přenosu elektronů v kokultivaci obou typů buněk je patrná také z rozdílů hodnot (R-L)/R a (E-L)/E, které odrážejí efektivitu spřažení obou procesů. [181]. Rovněž poměr R/E (podíl bazální respirace na celkové kapacitě elektrontransportního systému přenášet

kyslík) byl statisticky významně nižší u kokultivovaných buněk BC44, což opět naznačuje možnost účinnějšího spřažení oxidace a fosforylace a potvrzuje celkové zvýšení oxidační kapacity uvedených buněk. Výsledky respiračních poměrů shrnuje tabulka 25.

Tabulka 25 – Respirační poměry

	BC44	BC44 + BC44Fibr	t-test	
L/E	0,32 ± 0,15	0,12 ± 0,08	p < 0,005	kontrolní poměr spřažení při stavu E
L/R	0,69 ± 0,11	0,40 ± 0,20	p < 0,001	kontrolní poměr spřažení při stavu R
R/E	0,47 ± 0,21	0,28 ± 0,07	p < 0,05	poměr spřažené respirace a ETS kapacity
(R-L)/R	0,31 ± 0,11	0,6 ± 0,2	p < 0,001	faktor spřažení při stavu R
(E-R)/E	0,53 ± 0,2	0,72 ± 0,07	p < 0,05	faktor nadbytečné ETS kapacity
(E-L)/E	0,68 ± 0,15	0,88 ± 0,08	p < 0,005	faktor spřažení při stavu E

6 Závěrečné shrnutí

Terapeutická rezistence nádorů představuje závažný klinický problém. Rozlišujeme primární rezistenci, kdy nádor vůbec nereaguje na aplikovanou terapii a rezistenci získanou neboli sekundární, kdy po počáteční klinické odpovědi terapie přestávají působit a nádor se stává chemo či radiorezistentní. Samotná koncepce kombinační chemoterapie byla zavedena proto, aby co nejvíce minimalizovala vývoj terapeutické rezistence nádorů. Původně se uvažovalo tak, že aplikace každého jednotlivého cytostatika vždy vede k selekci nádorových buněk, jejichž genetické a epigenetické změny vylučují klinickou účinnost daného cytostatika. Použití chemoterapeutické kombinace různých cytostatik s různým mechanismem účinku by mělo tuto možnost dramaticky snižovat, jelikož se předpokládá, že klon buněk, jehož genom a regulace jednotlivých genů a proteinů zakládá rezistenci vůči jednomu cytostatiku, bude citlivý vůči jinému [194, 195]. Bohužel klinická zkušenost ukazuje, že nádory jsou v konečném stádiu vývoje a progresu rezistentní současně vůči všem pro daný typ nádoru určených cytostatikům a tudíž chemoterapeuticky neléčitelné.

Mnohočetná léková rezistence nádorů je definována jako fenotyp, kdy expozice určitému cytostatiku indukuje vznik rezistence nejen proti tomuto cytostatiku, ale rovněž proti strukturně a mechanismem účinku nepříbuzným cytostatikům, kterým daná populace nádorových buněk nebyla nikdy vystavena [196, 197]. Hlavním praktickým přínosem molekulární analýzy progresivních sérií nádorových buněčných linií založených na selekci dceřiných chemorezistentních buněčných linií, je možnost nalezení vhodných kandidátů pro biomarkery chemorezistence či přímo cílové molekuly, jejichž terapeutická inhibice či jiná modifikace by mohla chemorezistenci zvrátit [36, 198]. V naší práci jsme chtěli využít získaný buněčný model chemorezistence RT112 a RT112D2. Výsledky karyotypů RT112 rodiny však doložily, že dceřiná buněčná linie RT112D21 není odvozená, jak bylo původně publikováno [165], z buněčné linie RT112, ale pravděpodobně již z více transformované sublinie, kterou jsme nazvali RT112Heidelberg. Počáteční analýzy buněčné linie RT112Heidelberg ukázaly, že linie je polyklonální, klonogenní a spontánně aktivuje program epiteliálně-mezenchymální tranzice jako odpověď na podmínky buněčné kultivace v různém stupni buněčné denzity, přičemž dochází ke snížení povrchové exprese E-cadherinu se současným zvýšením exprese vimentinu a indukcí buněčné motility. Tento se stav ukázal reverzibilní – opětovné převedení do subkonfluentní kultury obnovilo epiteliální charakter buněk (mezenchymálně-epiteliální tranzice), spojený se ztrátou motility a markerů epiteliálně-mezenchymální tranzice a aktivací nádorových kmenových buněk. Tyto v podstatě náhodně zjištěné výsledky by sice mohly poskytnout vysvětlení pro procesy invazivity a metastazování uroteliálního karcinomu, kdy zvýšení buněčné denzity na bazální membráně papilárně rostoucího uroteliálního karcinomu by tak mohlo spustit proces epiteliálně-mezenchymální tranzice za cenu dočasné ztráty kmenovosti [186, 187, 199], ovšem pro studium chemorezistence se model ukázal jako nestabilní a pro další analýzy tímto směrem zcela nevhodný.

Z výše popsaných důvodů jsme se pokusili ustanovit si model vlastní, který se skládal ze dvou klonálně příbuzných buněčných linií – BC44 a od ní odvozené dceřiné

chemorezistentní linie BC44DoxoR [36, 162]. Tento model nejen že dokonale splňuje kritéria chemorezistence, ale podle veškerých dostupných literárních údajů se jedná o první buněčnou linii karcinomu močového měchýře s fenotypem mnohočetné lékové rezistence a navíc s chemorezistencí vůči všem standardně používaným chemoterapeutikům pro systémovou chemoterapii uroteliálního karcinomu. Existuje několik biologických vysvětlení mechanismu mnohočetné lékové rezistence. Prvním z nich je vysvětlení na základě aktivity efluxních pump tzv. rodiny ATP-binding cassette (ABC) [37, 175, 176]. Exprese některých ABC pump může sice zapříčinit rezistenci vůči jedné skupině cytostatik, ale zároveň zprostředkuje senzitivitu vůči skupině jiné. Příkladem jsou P-glykoprotein (ABCB1) nebo multidrug resistance protein 1 (ABCC1), které pravděpodobně zvyšují citlivost buněk vůči gemcitabinu [201]. To vede k tomu, že je velmi obtížné najít jakékoliv jednoduché vysvětlení fenotypu mnohočetné lékové rezistence u BC44DoxoR buněk v rámci zvýšené exprese efluxních pump ABC. Současná rezistence vůči “klasickým“ substrátům (doxorubicin, vinblastin, metotrexát) a současně cisplatině a gemcitabinu by vyžadovala, jestliže by jejím základem měl být zvýšený eflux cytostatik, komplexní změny v expresi řady transportérů rodiny ABC. Další možný mechanismus mnohočetné lékové rezistence je celkové snížení apoptotické kompetence, ať už v důsledku nadměrné exprese některého z mnoha inhibitorů apoptózy (*Bcl-2*, *Bcl-XL*, *XIAP* aj.) nebo naopak mutačním vyřazením apoptotických aktivátorů zejména na signální dráze tumor-supresorového genu *TP53* [196]. V úvahu také přichází možnost buněk obejití či oddálení buněčné smrti prostřednictvím tzv. autofagie, zejména její specifické varianty, tzv. mitofagie, při níž se buňky selektivně zbavují mitochondrií a celá iniciace vnitřní apoptotické dráhy je tak vyřazena [201]. Je docela pravděpodobné, že některý z těchto mechanismů bude ve hře rovněž u BC44DoxoR buněk. V předešlé práci Kocha *et al.* bylo prokázáno, že původní mateřská nádorová buněčná linie BC44 neexprimuje funkční p53 protein [161]. Tato okolnost mohla přispět ke vzniku chemorezistentního klonu, sama o sobě ovšem neposkytuje žádné vysvětlení mechanismu chemorezistence, neboť tato mutační změna je již přítomna v mateřské buněčné linii, která je chemosenzitivní. Bohužel se však ukazuje, že veškeré klinické i experimentální případy chemorezistence, zejména mnohočetné lékové rezistence, které byly analyzovány dostatečně podrobně, odhalily multifaktoriální charakter tohoto fenotypu, jehož podstatou byla současná aktivita několika různých mechanismů chemorezistence [36]. Je velmi pravděpodobné, že mnohočetná léková rezistence u buněčné linie BC44DoxoR bude mít rovněž komplexní základ. Je ovšem důležité upozornit, že se jedná pouze o experimentální model multilékové rezistence uroteliálního karcinomu, a teprve jeho další analýzy ukáží, nakolik jsou mechanismy chemorezistence u BC44DoxoR buněk klinicky relevantní. Vzhledem k tomu, že v současné době již existují podobné modely mnohočetné lékové rezistence u karcinomu močového měchýře, bylo by výhodné tyto systémy porovnat a eventuálně podrobit dalším molekulárním analýzám, zejména se zaměřením na diferencially exprimované geny, popř. proteiny. I kdyby se zjištěné molekulární mechanismy daly aplikovat pouze na část chemorezistentních klinických nádorů, pro tuto část pacientů by mohly být získané poznatky velmi podstatné pro vypracování léčebných postupů pro

zmírnění či překonání chemorezistentního fenotypu, a tím i odpovídající zlepšení léčebné odpovědi.

Zcela jiným mechanismem terapeutické rezistence jsou komplexní procesy v nádorovém mikroprostředí, zejména interakce s nádorovým stromatem. Podstatný příspěvek nádorového stromatu ke všem klíčovým znakům karcinomů je v současné době nesporný, přesto je klinické využití těchto poznatků mnohem problematičtější, než by se mohlo zdát. Jedním z důvodů je vysoká heterogenita složení a funkce stromálního prostředí, a to nejen u jednotlivých typů karcinomů, ale dokonce i mezi jednotlivými pacienty s podobným typem nádoru. Například u karcinomu pankreatu se ukazuje, že fibroblasty výrazně potlačují růst nádorových buněk a přispívají tím ke zlepšení terapeutické odezvy [202]. Naproti tomu ale růst a progresse karcinomu močového měchýře jsou podporovány právě nádorově asociovanými fibroblasty [90], což potvrzuje i klinický nález vysoké stromální exprese CD90 jako negativního prognostického faktoru. Stromální buněčná populace je u karcinomů vždy heterogenní a zahrnuje nejen normální a nádorově asociované fibroblasty, ale také různé další populace mesenchymálních buněk, jako jsou rekrutované mesenchymální kmenové buňky, fibrocyty, endotelové buňky, buňky hladkého svalstva včetně pericytů a imunitní buňky. Tato rozsáhlá a složitá buněčná heterogenita je z velké části zachována pouze v primární kultuře a může tak představovat velmi vážnou překážku pro jakékoli podrobné pochopení interakce mezi samotným nádorem a stromatem.

Pro bližší analýzu této složité interakce byla odvozena buněčná linie stromálních fibroblastů BC44Fibr, která vykazuje vysoký stupeň homogenity. Podrobná charakterizace BC44Fibr ukázala, že uniformní stromální buňky se podílejí na mnoha transformovaných vlastnostech nádorových buněk zejména během vzniku, vývoje i progresse karcinomu. Naše analýzy ukázaly, že tyto prominentní stromální buňky mají výrazné vlastnosti podporující nádor jako je stimulace proliferace, motility, kmenového fenotypu či podpora terapeutické rezistence. Dokonce se ukazuje, že i protinádorová imunitní odpověď je značně modulována komplexním mikroprostředím nádorů, neboť námi analyzované stromální fibroblasty BC44Fibr jsou aktivní imunosupresivní nádorovou populací.

Námi vytvořený experimentální systém BC44 + BC44Fibr se zdá být velmi výhodný i z jiného pohledu. Původní klinický nádor byl patologicky klasifikován jako pT4 G3 [161] a velmi pravděpodobně představuje relativně menšinový případ původně papilárního nádoru. Je zřejmé, že původně roste jako papilární nádor, který je velmi chudý na stromální buňky. Tyto typy nádorů však při průniku přes bazální membránu postupem času získávají přístup k suburotelovým fibroblastům [173, 174, 203], které rapidně podpoří jejich progresi. Podstatnou roli v celé situaci hrají pravděpodobně i hustota primární nádorové kultury, kdy se díky náhodně zjištěným výsledkům u RT112Heidelberg přikláníme k názoru, že epiteliálně-mezenchymální tranzice je spíše inhibujícím faktorem pro rozvoj kmenového fenotypu nádorových buněk [204, 205]. Tím by náš experimentální systém mohl poskytnout cenný pohled na současně nejméně zkoumanou dráhu progresse urotheliálního karcinomu močového měchýře, jmenovitě vývoj původně papilárních povrchových nádorů na invazivní typy uroteliálních karcinomů.

Současná kokultivace nádorových fibroblastů s nádorovými buněčnými liniemi senzitivními vůči určitému chemoterapeutiku poskytuje užitečný model komplexní terapeutické rezistence. V tomto uspořádání dochází po aplikaci chemoterapeutik k výraznému zvětšení subpopulace kmenových buněk. Diferencované buňky jsou chemoterapií usmrceny, ale díky chemorezistenci kmenových nádorových buněk jsou okamžitě nahrazovány dalšími postupně diferencujícími buňkami. Vysvětlením by mohl být prostaglandin E2, který se uvolňuje z odumírajících nádorových buněk a zpětně stimuluje subpopulaci nádorových kmenových buněk [8]. Nádor se pak vlastně stává primárně rezistentním bez ohledu na použité chemoterapeutikum. Další příklad chemorezistence se ukázal při kokultivaci nádorové buněčné linie SW780 společně s BC44Fibr. Zatímco etablovaná buněčná linie SW780 je sama o sobě senzitivní vůči TRAIL, jakožto k látce, která je považována za slibný terapeutický prostředek, protože je schopna selektivně aktivovat apoptózu pouze v nádorových buňkách, při kokultivaci s BC44Fibr svoji senzitivitu ztrácí [163]. Současně s tím dochází opět k aktivaci fenotypových charakteristik nádorových kmenových buněk, považovanou za inherentně rezistentní buněčnou subpopulaci. Apoptóza byla relativně dlouhou dobu považována za imunologicky tichý typ buněčné smrti. Nedávné studie však dokládají, že některé způsoby ošetření nádorových buněk jako je například ionizující záření či aplikace některých chemoterapeutik běžně užívaných i v léčbě karcinomu močového měchýře (doxorubicin, gemcitabin, cisplatina, vinblastin) mají imunomodulační efekt a mohou tak v některých případech indukovat imunogenní buněčnou apoptózu [206, 207]. Imunologická buněčná smrt je pak doprovázena stimulací imunitního systému zejména dendritických buněk pomocí specifických molekul označovaných jako DAMP (danger associated molecular pattern). Z toho vyplývá, že typ buněčné smrti neurčuje, zda jde o imunogenní smrt, ale rozhodující je typ podnětu, který buněčnou smrt zahájil [102, 208, 209]. Z tohoto důvodu se nyní uznává, že určité typy chemoterapie mohou podpořit imunitní mechanismy, zvýšit imunogenicitu nádorových buněk a přispívat tak k eliminaci nebo alespoň kontrole růstu nádoru i v jeho pokročilých stádiích [209, 210]. V případě poškození buněčné DNA chemoterapií dochází k aktivaci proteinu p53, jehož hlavní funkcí je zastavení buněčného cyklu a navození apoptózy. Nádorové buňky mají ale většinou porušenou apoptózu a stávají se tak nejen výrazně chemorezistentní ale zároveň i imunorezistentní. K imunorezistenci do jisté míry přispívají i stromální buňky, které jsou podporovány nádorovými buňkami, kterým je pak díky stromálním buňkám zpětně poskytnuta částečná ochrana před buňkami imunitního systému. My jsme v naší práci ukázali, že BC44Fibr mají na alogenně stimulované T-lymfocyty výrazný imunopresivní vliv, což ukazuje na potenciální možnost těchto buněk negativně regulovat imunitní odpověď u karcinomu močového měchýře. Kromě toho se na myším modelu ukázalo, že CD8⁺ T-lymfocyty a pravděpodobně asi i NK buňky výrazně secernují TRAIL, který pak senzibilizuje nádorové buňky k apoptóze. Stromální buňky, které výrazně inhibují aktivitu T-lymfocytů, by mohly chránit nádorové buňky před apoptózou indukovanou TRAILem [211]. Imunoterapie cílená nejen na nádorové buňky samotné, ale i na nádorově asociované fibroblasty by mohla zlepšit potenciál imunoterapie jako takové a v kombinaci s chemoterapií představuje další možný přístup v léčbě nádorových onemocnění. Všechny

tyto mechanismy komplexní terapeutické rezistence, původně definované na základě jediného buněčného modelu (BC44Fibr), mají univerzální platnost, jak dokládá nejen jejich reprodukování na heterologním buněčném modelu MBT (myofibroblastická buněčná linie) ale i dostupné klinické výsledky.

Výsledky získané pomocí respirometrie ukazují, že mitochondriální spotřeba kyslíku buněk BC44 byla ovlivněna fibroblasty jak na kvalitativní tak kvantitativní úrovni. Buňky kultivované společně se stromálními buňkami vykazovaly významně vyšší spotřebu kyslíku související s produkcí ATP (R-L), což nebylo dosaženo zvýšením fyziologické spotřeby kyslíku (stav ROUTINE), ale spíše snížením spotřeby kyslíku ve stavu LEAK. Kromě toho byla nadbytečná kapacita E-R významně zvýšena pomocí fibroblastů, což naznačuje silnější kontrolu vyvíjenou fosforylačním systémem nad fyziologickou respirací. V současné době existují nejméně dvě hypotézy, které by mohly vysvětlovat změny v metabolismu nádorových buněk, které jsou v kontaktu s fibroblasty. V první teorii, tzv. teorii metabolického parazitismu, používají nádorové buňky cílený oxidační stres proto, aby získaly živiny ze sousedních fibroblastů, čímž pak následně zvyšují vlastní, mitochondriální funkce včetně oxidační fosforylace a mitochondriální biogeneze [212, 213]. Druhá teorie předpokládá horizontální přenos mitochondrií ze stromálních buněk do buněk nádorových s cílem navýšit oxidační procesy v nádorové buňce [214, 215]. Na základě našich výsledků, tj. nezměněné bazální respirace, zvýšené kapacity elektrotransportního systému a snížené respirace ve stavu LEAK (souvisí efektivitou produkce ATP) u BC44 kokultivovaných se stromálními buňkami BC44Fibr, lze říci, že možným vysvětlením je získání vhodných substrátů ze sousedních fibroblastů nebo humorální komunikace mezi fibroblasty a nádorovými buňkami, která zvyšuje účinnost energetického metabolismu vlastních nádorových buněk a zlepšuje tak dostupnost ATP.

7 Závěr

Chemorezistence a relaps nádorů jsou běžnými problémy, které je třeba řešit ke zlepšení kvality života a délky života pacientů. Špatná terapeutická odezva a prognóza jsou důsledkem mnoha složitých molekulárních událostí, mezi které patří mimo jiné: i) interakce mezi karcinomovými a stromálními buňkami, které vedou k obohacení nádoru o kmenové buňky, přeprogramování migračního a metabolického potenciálu, ii) indukce heterogenity nádorové populace, kdy některé buňky zvyšují svůj migrační potenciál, zatímco jiné mění svůj fenotyp blíže ke kmenovému, iii) účinky závislé na hustotě buněk v nádorové mase, které mohou indukovat epiteliálně-mezenchymální přechod, měnit funkčnost a účinnost mitochondrií, což v konečném důsledku ovlivňuje apoptózu a chemosenzitivitu.

Práce byla zaměřena na důkladnou a komplexní analýzu jedinečného experimentálního modelu nádor – stromální interakce karcinomu močového měchýře, který se skládal z buněčné linie nádorové asociovaných fibroblastů BC44Fibr a nádorové buněčné linie BC44 pocházející ze stejného nádoru jedné pacientky s karcinomem močového měchýře. Byly charakterizovány komplexní účinky na buněčnou proliferaci a motilitu a zároveň i imunomodulační vlastnosti fibroblastů BC44Fibr. Zároveň bylo možné se díky tomuto vhodnému modelu podrobně zaměřit na účinky na chemorezistenci a na buněčný metabolismus. Při srovnání oxidativní fosforylace buněk BC44 kultivovaných samotně nebo v společně s fibroblasty BC44Fibr, bylo v kokultivaci dvou typů buněk zjištěno významné zvýšení všech naměřených mitochondriálních respiračních parametrů. Tato data podporují názor, že stromální buňky mají na nádorové kmenové buňky silný podpůrný vliv a jsou v souladu s výsledky recentních publikací, které uvádí, že metabolismus některých typů kmenových nádorových buněk zásadně závisí na oxidativní fosforylaci [216–218]. Přestože se v analýze genů nepotvrdil žádný výrazný efekt stromálních buněk na expresi „kmenových“ genů, ostatní metody zaměřené na identifikaci kmenových buněk prokázaly jednoznačný vliv fibroblastů [90].

Dalším unikátním modelem, který byl při zpracování dizertační práce použit, byla chemorezistentní buněčná linie BC44DoxoR, která byla odvozena dlouhodobou kultivací ve vzrůstající koncentraci cytostatika [36, 162]. Výhodu tohoto námi odvozeného modelu vidíme v možnosti dále jej podrobně biologicky a molekulárně charakterizovat a odhalit tak biologické mechanismy, které za pozorovanou chemorezistencí stojí. Tyto diferenciálně exprimované geny by následně mohly získat klinický význam, ať už jako prognostické a prediktivní markery, tak i popř. jako terapeutické cíle za účelem zvrácení klinické chemorezistence nádorů.

8 Seznam použité literatury

- [1] BALSARA, Z. R. a X. LI. Sleeping beauty: awakening urothelium from its slumber. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* [online]. 2017, **312**(4), F732–F743. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00337.2016
- [2] WANG, C., WT. ROSS a I. U. MYSOREKAR. Urothelial generation and regeneration in development, injury, and cancer. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* [online]. 2017, **246**(4), 336–343. ISSN 1097-0177. Dostupné z: doi:10.1002/dvdy.24487
- [3] CASTILLO-MARTIN, M., J. DOMINGO-DOMENECH, O. KARNI-SCHMIDT, T. MATOS a C. CORDON-CARDO. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urologic Oncology* [online]. 2010, **28**(4), 401–408. ISSN 1873-2496. Dostupné z: doi:10.1016/j.urolonc.2009.04.019
- [4] LÜLLMANN-RAUCH, R. *Histologie* [online]. 3. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4. Dostupné z: <https://www.grada.cz/histologie-6589/>
- [5] MCKENNEY, J. K., S. DESAI, C. COHEN a M. B. AMIN. Discriminatory immunohistochemical staining of urothelial carcinoma in situ and non-neoplastic urothelium: an analysis of cytokeratin 20, p53, and CD44 antigens. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2001, **25**(8), 1074–1078. ISSN 0147-5185.
- [6] MILLER, R. T. Immunohistochemistry in Urothelial Dysplasia. *Immunohistochemistry Newsletter* [online]. 2003. Dostupné z: http://www.ihcworld.com/_newsletter/newsletter.htm
- [7] HATINA, J. a W. A. SCHULZ. Stem cells in the biology of normal urothelium and urothelial carcinoma. *Neoplasma* [online]. 2012, **59**(6), 728–736. ISSN 0028-2685. Dostupné z: doi:10.4149/neo_2012_089
- [8] KRIPNEROVA, M., H. S. PARMAR, M. PESTA, M. KOHOUTOVA, J. KUNCOVA, K. DRBAL, M. RAJTMAJEROVA a J. HATINA. Urothelial Cancer Stem Cell Heterogeneity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 2019, **1139**, 127–151. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-14366-4_8
- [9] TORRE, L. A., F. BRAY, R. L. SIEGEL, J. FERLAY, J. LORTET-TIEULENT a A. JEMAL. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal For Clinicians* [online]. 2015, **65**(2), 87–108. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21262
- [10] ANTONI, S., J. FERLAY, I. SOERJOMATARAM, A. ZNAOR, A. JEMAL a F. BRAY. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *European Urology* [online]. 2017, **71**(1), 96–108. ISSN 1873-7560. Dostupné z: doi:10.1016/j.eururo.2016.06.010
- [11] BURGER, M., J. W. F. CATTO, G. DALBAGNI, H. B. GROSSMAN, H. HERR, P. KARAKIEWICZ, W. KASSOUF, L. A. KIEMENEY, C. LA VECCHIA, S. SHARIAT a Y. LOTAN. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology* [online]. 2013, **63**(2), 234–241. ISSN 1873-7560. Dostupné z: doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033

- [12] DUŠEK, L., T. PAVLÍK, O. MAJEK, T. BÜCHLER, J. MUŽIK, D. MALUSKOVA, J. KOPTIKOVA, Z. BORTLICEK a J. ABRAHAMOVA. Estimating cancer incidence, prevalence, and the number of cancer patients treated with antitumor therapy in 2015 and 2020 - analysis of the Czech National Cancer Registry. *Klinická Onkologie: Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti*. 2015, **28**(1), 30–43. ISSN 0862-495X.
- [13] DUŠEK, L., J. MUŽIK, D. MALUSKOVA, O. MAJEK, T. PAVLÍK, J. KOPTIKOVÁ, B. MELICHAR, T. BÜCHLER, J. FINEK, D. CIBULA, M. BABJUK, M. SVOBODA, R. VYZULA, A. RYSKA, M. RYSKA, J. PETERA a J. ABRAHAMOVÁ. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klinická Onkologie: Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti*. 2014, **27**(6), 406–423. ISSN 0862-495X.
- [14] VAŘECHOVÁ, K., J. POVOVÁ a V. JANOUT. Epidemiologie karcinomu močového měchýře. *Urologie pro praxi*. 2013, **14**(3), 104–107. ISSN 12131768, 18035299.
- [15] SKÁLA, B. *Obecné preventivní a vyhledávací postupy u nádorových onemocnění v primární péči: doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2005. ISBN 978-80-86998-02-2.
- [16] SALEM, S., R. E. MITCHELL, A. EL-ALIM EL-DOREY, J. A. SMITH a D. A. BAROCAS. Successful control of schistosomiasis and the changing epidemiology of bladder cancer in Egypt. *BJU international* [online]. 2011, **107**(2), 206–211. ISSN 1464-410X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09622.x
- [17] BABJUK, M., M. MATOUŠKOVÁ, J. FÍNEK, a L. PETRUŽELKA. *Konsenzuální doporučené postupy v uroonkologii* [online]. Praha: Galén, 2009 [vid. 2018-05-24]. ISBN 978-80-7262-639-7. Dostupné z: [http://www.galen.cz/idistrik/vydav/?PHPSESSID=4f49271c6d87c75ad57b9f9e44472bdf&module=katalog&page\[book\]=4142&page\[specsel\]=29](http://www.galen.cz/idistrik/vydav/?PHPSESSID=4f49271c6d87c75ad57b9f9e44472bdf&module=katalog&page[book]=4142&page[specsel]=29)
- [18] BABJUK, M. *Konsenzuální doporučené postupy v uroonkologii*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-639-7.
- [19] KATOLICKÁ, J. a D. HRUBÁ. Faktory ovlivňující vznik karcinomu močového měchýře. *Urologie pro praxi*. 2005, **4**(4), 142–144. ISSN 12131768, 18035299.
- [20] SOUKUP, V. a M. PEŠL. Karcinom močového měchýře. *Postraguální medicína*. 2001, **13**(1), 42–47.
- [21] PEŠL, M., V. SOUKUP, M. BABJUK, P. DUNDR, O. CAPOUN a Z. VALOVÁ. Hodnocení významu klinicko-patologických prognostických faktorů u nádorů močového měchýře nefiltrujících svalovinu. *Česká urologie*. 2011, **15**(4), 222–228. ISSN 12118729, 12118729.
- [22] RAGHAVAN, MD., J. P. STEIN, D. COTE a J.S. JONES. Bladder Cancer. In: *Holland-Frei Cancer Medicine*. 8. vyd. USA: PMPH & BC Decker, 2009, s. 1219–1227.

- [23] KAMAT, A. M., N. M. HAHN, J. A. EFSTATHIOU, S. P. LERNER, PU. MALMSTRÖM, W. CHOI, C. C. GUO, Y. LOTAN a W. KASSOUF. Bladder cancer. *The Lancet* [online]. 2016, **388**(10061), 2796–2810. ISSN 0140-6736, 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(16)30512-8
- [24] CHOI, W., A. OCHOA, D. J. MCCONKEY, M. AINE, M. HÖGLUND, W. Y. KIM, F. X. REAL, A. E. KILTIE, I. MILSOM, L. DYRSKJØT a S. P. LERNER. Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *European Urology* [online]. 2017, **72**(3), 354–365. ISSN 1873-7560. Dostupné z: doi:10.1016/j.eururo.2017.03.010
- [25] BABJUK M, a V. SOUKUP. Intravezikální léčba povrchových nádorů močového měchýře. *Urologie pro praxi*. 2009, **3**, 116–120.
- [26] KRÁL, M., Z. MUCHA a V. ŠTUDENT. Imunoterapie karcinomu močového měchýře. *Onkologie*. 2013, **7**(1), 30–34.
- [27] KYSELOVÁ, M. BCG imunoterapie nádorů močového měchýře. *Urologie pro praxi*. 2009, **10**(5), 302–304.
- [28] O'DONNELL, M. A., J. KROHN a W. C. DEWOLF. Salvage intravesical therapy with interferon-alpha 2b plus low dose bacillus Calmette-Guerin is effective in patients with superficial bladder cancer in whom bacillus Calmette-Guerin alone previously failed. *The Journal of Urology*. 2001, **166**(4), 1300–1304, discussion 1304-1305. ISSN 0022-5347.
- [29] BABJUK, M. Transuretrální resekce v léčbě neinvazivních a povrchově invazivních (Ta, T1) nádorů močového měchýře. *Endoskopie*. 2009, **18**(4), 167–171.
- [30] SOBIN, L. H. a CH. WITTEKIND. *UICC - International Union Against Cancer, TNM klasifikace zhoubných novotvarů* [online]. 11. Praha: ÚZIS ČR, 2011 [vid. 2018-05-24]. ISBN 978-80-904259-6-5. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/publikace/tnm-klasifikace-zhoubnych-novotvaru-7-vydani-original-2011>
- [31] DVOŘÁČEK, J a M. BABJUK. *Onkourologie*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1108-2.
- [32] VYZULA, R. *Modrá kniha České onkologické společnosti*. 24. aktualizace. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2018. ISBN 978-80-86793-44-3.
- [33] VÍT, V. Neinvazivní karcinom močového měchýře – kdy je indikována adjuvantní intravezikální instilační léčba a co dělat při jejím selhání? *Urologické listy*. 2008, **6**(2), 16–24.
- [34] PŘIBYLOVÁ, M., M. DVOŘÁKOVÁ, M. a T. VANĚK. DERIVÁTY PAKLITAXELU PRO CÍLENÝ TRANSPORT CYTOSTATIKA. *Chemické listy*. 2010, **104**, 2013–2028.
- [35] SEIFERTOVA, M. a M. ŘEZÁČOVÁ. *Molekulární mechanismy účinku cisplatinu*. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/molekularni-mechanismy-ucinku-cisplatinu-455575>
- [36] KRIPNEROVÁ, M. a J. HATINA. Buněčné modely chemorezistence uroteliálního karcinomu. *Česká urologie*. 2015, **19**(4), 270–280.

- [37] HOLČÁKOVÁ, J. M. NEKULOVÁ, P. ORZOL, a B. VOJTĚŠEK. Mechanizmy lékové rezistence a nádorové kmenové buňky. *Klinická onkologie*. 2014, **27 (Suppl 1)**, S34–S41. ISSN ISSN 0862-495X.
- [38] KACHALAKI, S., M. EBRAHIMI, L. MOHAMED KHOSROSHAHI, S. MOHAMMADINEJAD a B. BARADARAN. Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* [online]. 2016, **89**, 20–30. ISSN 1879-0720. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2016.03.025
- [39] STORDAL, B., M. HAMON, V. MCENEANEY, S. ROCHE, JP. GILLET, J. J. O'LEARY, M. GOTTESMAN a M. CLYNES. Resistance to Paclitaxel in a Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cell Line Is Mediated by P-Glycoprotein. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7(7)** [vid. 2019-03-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0040717
- [40] BREIER, A., L. GIBALOVA, M. SERES, M. BARANCIK a Z. SULOVA. New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2013, **13(1)**, 159–170. ISSN 1875-5992.
- [41] VALLO, S., M. MICHAELIS, F. ROTHWEILER, G. BARTSCH, K. M. GUST, D. M. LIMBART, F. RÖDEL, F. WEZEL, A. HAFERKAMP a J. CINATL. Drug-Resistant Urothelial Cancer Cell Lines Display Diverse Sensitivity Profiles to Potential Second-Line Therapeutics. *Translational Oncology* [online]. 2015, **8(3)**, 210–216. ISSN 1936-5233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tranon.2015.04.002
- [42] MICHAELIS, M., M. WASS a J. CINATL. The Resistant Cancer Cell Line (RCCL) collection. *European Journal of Cancer* [online]. 2016, **61**, S120. ISSN 0959-8049, 1879-0852. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-8049(16)61426-0
- [43] HATINA, J., M. KRIPNEROVÁ, a H. MATOUŠKOVÁ. *Orgánové, organotypické a trojrozměrné kultury. Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni* [online]. 2015. Dostupné z: <http://mefanet.lfp.cuni.cz/clanky.php?aid=441>
- [44] HATINA, J. a M. KRIPNEROVÁ. *Obecné základy kultivace buněk v tkáňové kultuře. Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni* [online]. 2014. Dostupné z: <http://mefanet.lfp.cuni.cz/clanky.php?aid=332>
- [45] SARKAR, S., K. P. JÜLICHER, M. S. BURGER, V. DELLA VALLE, C. J. LARSEN, T. R. YEAGER, T. B. GROSSMAN, R. W. NICKELLS, C. PROTZEL, D. F. JARRARD a C. A. REZNIKOFF. Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancers. *Cancer Research*. 2000, **60(14)**, 3862–3871. ISSN 0008-5472.
- [46] HATINA, J., W. HUCKENBECK, H. RIEDER, H.H. SEIFERT a W. A. SCHULZ. [Bladder carcinoma cell lines as models of the pathobiology of bladder cancer. Review of the literature and establishment of a new progression series]. *Der Urologe. Ausg. A* [online]. 2008, **47(6)**, 724–734. ISSN 0340-2592. Dostupné z: doi:10.1007/s00120-008-1687-4
- [47] MAKRIDAKIS, M., S. GAGOS, A. PETROLEKAS, M. G. ROUBELAKIS, V. BITSIKA, K. STRAVODIMOS, K. PAVLAKIS, N. P. ANAGNOU, J. COLEMAN a A. VLAHOU. Chromosomal and

proteome analysis of a new T24-based cell line model for aggressive bladder cancer. *Proteomics* [online]. 2009, **9**(2), 287–298. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200800121

[48] GILDEA, J. J., W. L. GOLDEN, M. A. HARDING a D. THEODORESCU. Genetic and phenotypic changes associated with the acquisition of tumorigenicity in human bladder cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* [online]. 2000, **27**(3), 252–263. ISSN 1098-2264. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1098-2264(200003)27:3<252::AID-GCC5>3.0.CO;2-9

[49] WILLIAMS, S. V., J. ADAMS, J. COULTER, B. M. SUMMERSGILL, J. SHIPLEY a M. A. KNOWLES. Assessment by M-FISH of karyotypic complexity and cytogenetic evolution in bladder cancer in vitro. *Genes, Chromosomes & Cancer* [online]. 2005, **43**(4), 315–328. ISSN 1045-2257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc.20166

[50] CHENG, L., S. ZHANG, G. T. MACLENNAN, S. R. WILLIAMSON, A. LOPEZ-BELTRAN a R. MONTIRONI. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Human Pathology* [online]. 2011, **42**(4), 455–481. ISSN 1532-8392. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2010.07.007

[51] LUIS, N. M., E. LÓPEZ-KNOWLES a F. X. REAL. Molecular biology of bladder cancer. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2007, **9**(1), 5–12. ISSN 1699-048X.

[52] MCCONKEY, D. J., W. CHOI a C. P. N. DINNEY. Genetic subtypes of invasive bladder cancer. *Current Opinion in Urology* [online]. 2015, **25**(5), 449–458. ISSN 1473-6586. Dostupné z: doi:10.1097/MOU.0000000000000200

[53] VAISH, M., A. MANDHANI, R. D. MITTAL a B. MITTAL. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumors: a clinical significance. *BMC urology* [online]. 2005, **5**, 2. ISSN 1471-2490. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2490-5-2

[54] AHMAD, I., O. J. SANSOM a H. Y. LEUNG. Exploring molecular genetics of bladder cancer: lessons learned from mouse models. *Disease Models & Mechanisms* [online]. 2012, **5**(3), 323–332. ISSN 1754-8403, 1754-8411. Dostupné z: doi:10.1242/dmm.008888

[55] ZHAO, M., XL. HE a XD. TENG. Understanding the molecular pathogenesis and prognostics of bladder cancer: an overview. *Chinese Journal of Cancer Research* [online]. 2016, **28**(1), 92–98. ISSN 1000-9604. Dostupné z: doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.05

[56] WANG, HC. R. a S. CHOUDHARY. Reactive oxygen species-mediated therapeutic control of bladder cancer. *Nature Reviews. Urology* [online]. 2011, **8**(11), 608–616. ISSN 1759-4820. Dostupné z: doi:10.1038/nrurol.2011.135

[57] NETTO, G. J. Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet? *Nature Reviews. Urology* [online]. 2011, **9**(1), 41–51. ISSN 1759-4820. Dostupné z: doi:10.1038/nrurol.2011.193

- [58] KNOWLES, M. A. a C. D. HURST. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews. Cancer* [online]. 2015, **15**(1), 25–41. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc3817
- [59] LI, HT., C. E. DUYMICH, D. J. WEISENBERGER a G. LIANG. Genetic and Epigenetic Alterations in Bladder Cancer. *International Neurourology Journal* [online]. 2016, **20**(Suppl 2), S84-94. ISSN 2093-4777. Dostupné z: doi:10.5213/inj.1632752.376
- [60] JURACEK, J., B. PELTANOVA, J. DOLEZEL, M. FEDORKO, D. PACIK, L. RADOVA, P. VESELA, M. SVOBODA, O. SLABY a M. STANIK. Genome-wide identification of urinary cell-free microRNAs for non-invasive detection of bladder cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2018, **22**(3), 2033–2038. ISSN 1582-1838. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.13487
- [61] XIE, Y., X. MA, L. CHEN, H. LI, L. GU, Y. GAO, Y. ZHANG, X. LI, Y. FAN, J. CHEN a X. ZHANG. MicroRNAs with prognostic significance in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 5619. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05801-3
- [62] ENOKIDA, H., H. YOSHINO, R. MATSUSHITA a M. NAKAGAWA. The role of microRNAs in bladder cancer. *Investigative and Clinical Urology* [online]. 2016, **57**(Suppl 1), S60. ISSN 2466-0493, 2466-054X. Dostupné z: doi:10.4111/icu.2016.57.S1.S60
- [63] YUAN, D., S. ZHENG, L. WANG, J. LI, J. YANG, B. WANG, X. CHEN a X. ZHANG. MiR-200c inhibits bladder cancer progression by targeting lactate dehydrogenase A. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(40), 67663–67669. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.18801
- [64] MLCOCHOVA, H., R. HEZOVA, A. C. MELI a O. SLABY. Urinary microRNAs as a new class of noninvasive biomarkers in oncology, nephrology, and cardiology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2015, **1218**, 439–463. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-1538-5_26
- [65] ZHANG, H. I, F. QI, YH. CAO, XB. ZU a MF. CHEN. Expression and clinical significance of microRNA-21, maspin and vascular endothelial growth factor-C in bladder cancer. *Oncology Letters* [online]. 2015, **10**(4), 2610–2616. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2015.3540
- [66] JAYE, M., J. SCHLESSINGER a C. A. DIONNE. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1992, **1135**(2), 185–199. ISSN 0006-3002.
- [67] TOMÁŠEK, J. a J. BERKOVCOVÁ. Onkogeny RAS – prediktivní molekulární marker u kolorektálního karcinomu | Klinická onkologie - proLékaře.cz. *Klinická onkologie*. 2013, **26**(5), 366–367.
- [68] MITRA, A. P., H. LIN, R. H. DATAR a R. J. COTE. Molecular biology of bladder cancer: prognostic and clinical implications. *Clinical Genitourinary Cancer* [online]. 2006, **5**(1), 67–77. ISSN 1558-7673. Dostupné z: doi:10.3816/CGC.2006.n.020

- [69] TOPALIAN, S. L., C. G. DRAKE a D. M. PARDOLL. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2012, **24**(2), 207–212. ISSN 1879-0372. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2011.12.009
- [70] MOSNER, J., T. MUMMENBRAUER, C. BAUER, G. SCZAKIEL, F. GROSSE a W. DEPERT. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *The EMBO Journal*. 1995, **14**(18), 4442–4449. ISSN 0261-4189.
- [71] GHOSH, A., D. STEWART a G. MATLASHEWSKI. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2004, **24**(18), 7987–7997. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.24.18.7987-7997.2004
- [72] OLIVIER, M., R. EELES, M. HOLLSTEIN, M. A. KHAN, C. C. HARRIS a P. HAINAUT. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutation* [online]. 2002, **19**(6), 607–614. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:10.1002/humu.10081
- [73] BLAGOSKLONNY, M. V. p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. 2000, **14**(13), 1901–1907. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.99-1078rev
- [74] SIGAL, A. a V. ROTTER. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Research*. 2000, **60**(24), 6788–6793. ISSN 0008-5472.
- [75] OREN, M. a V. ROTTER. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010, **2**(2), a001107. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a001107
- [76] SOMASUNDARAM, K. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 2000, **5**, D424-437. ISSN 1093-9946.
- [77] ROMAGOSA, C., S. SIMONETTI, L. LÓPEZ-VICENTE, A. MAZO, M. E. LLEONART, J. CASTELLVI a S. RAMON Y CAJAL. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* [online]. 2011, **30**(18), 2087–2097. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2010.614
- [78] VAUPEL, P., K. SCHLENGER, C. KNOOP a M. HÖCKEL. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Research*. 1991, **51**(12), 3316–3322. ISSN 0008-5472.
- [79] WANG, G. L. a G. L. SEMENZA. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(3), 1230–1237. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.3.1230
- [80] IOACHIM, E., M. MICHAEL, M. SALMAS, M. M. MICHAEL, N. E. STAVROPOULOS a V. MALAMOU-MITSI. Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α expression in bladder cancer and their associations with other angiogenesis-related proteins. *Urologia Internationalis* [online]. 2006, **77**(3), 255–263. ISSN 0042-1138. Dostupné z: doi:10.1159/000094819

- [81] SONVEAUX, P., F. VÉGRAN, T. SCHROEDER, M. C. WERGIN, J. VERRAX, Z. N. RABBANI, Ch. J. DE SAEDELEER, K. M. KENNEDY, C. DIEPART, B. F. JORDAN, M. J. KELLEY, B. GALLETZ, M. L. WAHL, O. FERON a M. W. DEWHIRST. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2008, **118**(12), 3930–3942. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI36843
- [82] ADAMS, D. J., M. L. WAHL, J. L. FLOWERS, B. SEN, M. COLVIN, M. W. DEWHIRST, G. MANIKUMAR a M. C. WANI. Camptothecin analogs with enhanced activity against human breast cancer cells. II. Impact of the tumor pH gradient. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2006, **57**(2), 145–154. ISSN 0344-5704. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-005-0008-5
- [83] CHLAPEK, P., S. CHOVANOVÁ, V. SLAVIKOVA a R. VESELSKA. [Tumor Microenvironment - Possibilities of the Research Under In Vitro Conditions.]. *Klinická onkologie: časopis Česke a Slovenske onkologicke společnosti* [online]. 2014, **27**, 48–52. Dostupné z: doi:10.14735/amko20141548
- [84] RAGHUNAND, N. a R. J. GILLIES. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* [online]. 2000, **3**(1), 39–47. ISSN 1532-2084. Dostupné z: doi:10.1054/drup.2000.0119
- [85] SUZUKI, A., T. MAEDA, Y. BABA, K. SHIMAMURA a Y. KATO. Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. *Cancer Cell International* [online]. 2014, **14**, 129. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:10.1186/s12935-014-0129-1
- [86] SMALLBONE, K., R. A. GATENBY, R. J. GILLIES, P. K. MAINI a D. J. GAVAGHAN. Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasiveness. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 2007, **244**(4), 703–713. ISSN 0022-5193. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtbi.2006.09.010
- [87] BUSSARD, K. M., L. MUTKUS, K. STUMPF, C. GOMEZ-MANZANO a F. C. MARINI. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research: BCR* [online]. 2016, **18** [vid. 2018-05-22]. ISSN 1465-5411. Dostupné z: doi:10.1186/s13058-016-0740-2
- [88] KLENER, P. *Klinická onkologie* [online]. Praha: GALÉN - KAROLINUM, 2002 [vid. 2018-06-08]. ISBN 80-246-0468-X.
Dostupné z: [http://www.galen.cz/idistrik/vydav/?PHPSESSID=7f71cba9a455a2809ac6c511e35dc9df&module=katalog&page\[backbook\]=202&page\[book\]=44&page\[search\]\[2\]=%23Pavel+Klener](http://www.galen.cz/idistrik/vydav/?PHPSESSID=7f71cba9a455a2809ac6c511e35dc9df&module=katalog&page[backbook]=202&page[book]=44&page[search][2]=%23Pavel+Klener)
- [89] KLENER, P. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii* [online]. Praha: Grada, 2009 [vid. 2019-03-28]. ISBN 978-80-247-2808-7.
Dostupné z: <https://www.grada.cz/Produkty/Zdravotnictvi/Lekarske-obory/Onkologie/Nova-protinadorova-leciva-a-lecebne-strategie-v-on>
- [90] HATINA, J., M. KRIPNEROVÁ, J. TUKOVÁ, J. ŠRÁMEK, P. DVOŘÁK, M. PEŠTA, J. DOBRÁ, V. BABUŠKA, J. RACEK, M. SOBOL, A. PHILIMONENKO, P. HOZÁK, Z. CZUBA, W. A. SCHULZ,

- C. STRELL, S. GRIMM, S. JENNEK a K. H. FRIEDRICH. [Tumour-stroma interactions in urothelial cancer]. *Der Urologe. Ausg. A* [online]. 2015, **54**(4), 516–525. ISSN 1433-0563. Dostupné z: doi:10.1007/s00120-014-3754-3
- [91] KAKARLA, S., XT. SONG a S. GOTTSCHALK. Cancer-associated fibroblasts as targets for immunotherapy. *Immunotherapy* [online]. 2012, **4**(11), 1129–1138. ISSN 1750-7448. Dostupné z: doi:10.2217/imt.12.112
- [92] KALLURI, R. a M. ZEISBERG. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2006, **6**(5), 392–401. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1877
- [93] HAVIV, I., K. POLYAK, W. QIU, M. HU a I. CAMPBELL. Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle* [online]. 2009, **8**(4), 589–595. ISSN 1538-4101. Dostupné z: doi:10.4161/cc.8.4.7669
- [94] XING, F. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)*. [online]. 2010, **15**(1), 166-79 [vid. 2019-03-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036813>
- [95] POLANSKA, U. M. a A. ORIMO. Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2013, **228**(8), 1651–1657. ISSN 1097-4652. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.24347
- [96] CIRRI, P. a P. CHIARUGI. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *American Journal of Cancer Research*. 2011, **1**(4), 482–497. ISSN 2156-6976.
- [97] RODRIGUEZ FABÁ, O., J. PALOU-REDORTA, J. M. FERNÁNDEZ-GÓMEZ, F. ALGABA, N. EIRÓ, H. VILLAVICENCIO a F. J. VIZOSO. Matrix Metalloproteinases and Bladder Cancer: What is New? *International Scholarly Research Notices* [online]. 2012 [vid. 2018-05-22]. Dostupné z: doi:10.5402/2012/581539
- [98] SZARVAS, T., H. REIS, G. KRAMER, S. F. SHARIAT, F. V. DORP, S. TSCHIRDEWAHN, K. W. SCHMID, I. KOVALSZKY a H. RÜBBEN. Enhanced stromal syndecan-1 expression is an independent risk factor for poor survival in bladder cancer. *Human Pathology* [online]. 2014, **45**(4), 674–682. ISSN 0046-8177. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2013.10.036
- [99] HATINA, J., M. I. FERNANDES, M. J. HOFFMANN a A. G. ZEIMET. Cancer Stem Cells – Basic Biological Properties and Experimental Approaches. In: *ELS* [online]. Chichester, UK.: John Wiley & Sons, Ltd., 2013 [vid. 2018-05-22]. ISBN 978-0-470-01590-2. Dostupné z: doi:10.1002/9780470015902.a0021164.pub2
- [100] KRESO, A. a J. E. DICK. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* [online]. 2014, **14**(3), 275–291. ISSN 1875-9777. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2014.02.006
- [101] ADAM, Z., J. VORLÍČEK a J. KOPTÍKOVÁ. *Obecná onkologie a podpůrná léčba* [online]. Praha: Grada, 2003 [vid. 2019-03-28]. ISBN 80-247-0677-6. Dostupné z: <https://www.martinus.cz/?ultem=15010>

- [102] GARG, M. Urothelial cancer stem cells and epithelial plasticity: current concepts and therapeutic implications in bladder cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* [online]. 2015, **34**(4), 691–701. ISSN 0167-7659, 1573-7233. Dostupné z: doi:10.1007/s10555-015-9589-6
- [103] SHIN, K., J. LEE, N. GUO, J. KIM, A. LIM, L. QU, I. U. MYSOREKAR a P. A. BEACHY. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* [online]. 2011, **472**(7341), 110–114. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature09851
- [104] VAN BATAVIA, J., T. YAMANY, A. MOLOTKOV, H. DAN, M. MANSUKHANI, E. BATOURINA, K. SCHNEIDER, D. OYON, M. DUNLOP, XR. WU, C. CORDON-CARDO a C. MENDELSON. Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nature Cell Biology* [online]. 2014, **16**(10), 982–991, 1–5. ISSN 1476-4679. Dostupné z: doi:10.1038/ncb3038
- [105] PAPAFOOTI, G., V. PARASKEVOPOULOU, E. VASILAKI, Z. KANAKI, N. PASCHALIDIS a A. KLINAKIS. KRT14 marks a subpopulation of bladder basal cells with pivotal role in regeneration and tumorigenesis. *Nature Communications* [online]. 2016, **7**., 11914. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms11914
- [106] PARASKEVOPOULOU, V., G. PAPAFOOTI a A. KLINAKIS. KRT14 marks bladder progenitors. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* [online]. 2016, **15**(23), 3161–3162. ISSN 1551-4005. Dostupné z: doi:10.1080/15384101.2016.1220722
- [107] HO, P. L., A. KURTOVA a K. S. CHAN. Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. *Nature Reviews. Urology* [online]. 2012, **9**(10), 583–594. ISSN 1759-4820. Dostupné z: doi:10.1038/nrurol.2012.142
- [108] SHIN, K., A. LIM, J. I. ODEGAARD, J. D. HONEYCUTT, S. KAWANO, M. H. HSIEH a P. A. BEACHY. Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nature Cell Biology* [online]. 2014, **16**(5), 469–478. ISSN 1476-4679. Dostupné z: doi:10.1038/ncb2956
- [109] SUGINO, T., H. GORHAM, K. YOSHIDA, J. BOLODEOKU, V. NARGUND, D. CRANSTON, S. GOODISON a D. TARIN. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *The American Journal of Pathology*. 1996, **149**(3), 873–882. ISSN 0002-9440.
- [110] CHOI, W., S. PORTEN, S. KIM, D. WILLIS, E. R. PLIMACK, J. HOFFMAN-CENSITS, B. ROTH, T. CHENG, M. TRAN, IL. LEE, J. MELQUIST, J. BONDARUK, T. MAJEWSKI, S. ZHANG, S. PRETZSCH, K. BAGGERLY, A. SIEFKER-RADTKE, B. CZERNIAK, C. P. N. DINNEY a D. J. MCCONKEY. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* [online]. 2014, **25**(2), 152–165. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2014.01.009
- [111] HEDEGAARD, J., P. LAMY, I. NORDENTOFT, F. ALGABA, S. HØYER, B. PARM ULHØI, S. VANG, T. REINERT, G. G. HERMANN, K. MOGENSEN, M. B. H. THOMSEN, M. M. NIELSEN, M. MARQUEZ, U. SEGERSTEN, M. AINE, M. HÖGLUND, K. BIRKENKAMP-DEMTRÖDER, N. FRISTRUP, M. BORRE, A. HARTMANN, R. STÖHR, S. WACH, B. KECK, A. K. SEITZ, R. NAWROTH, T. MAURER, C. TULIC,

T. SIMIC, K. JUNKER, M. HORSTMANN, N. HARVING, A. C. PETERSEN, M. L. CALLE, E. W. STEYERBERG, W. BEUKERS, K. E. M. VAN KESSEL, J. B. JENSEN, J. S. PEDERSEN, P. U. MALMSTRÖM, N. MALATS, F. X. REAL, E. C. ZWARTHOFF, T. Falck ØRNTOFT a L. DYRSKJØT. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* [online]. 2016, **30**(1), 27–42. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2016.05.004

[112] MYSOREKAR, I. U., M. ISAACSON-SCHMID, J. N. WALKER, J. C. MILLS a S. J. HULTGREN. Bone morphogenetic protein 4 signaling regulates epithelial renewal in the urinary tract in response to uropathogenic infection. *Cell Host & Microbe* [online]. 2009, **5**(5), 463–475. ISSN 1934-6069. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2009.04.005

[113] FEI, D. L., H. LI, C. D. KOZUL, K. E. BLACK, S. SINGH, J. A. GOSSE, J. DIRENZO, K. A. MARTIN, B. WANG, J. W. HAMILTON, M. R. KARAGAS a D. J. ROBBINS. Activation of Hedgehog Signaling by the Environmental Toxicant Arsenic May Contribute to the Etiology of Arsenic-Induced Tumors. *Cancer Research* [online]. 2010, 0008-5472.CAN-09–2898. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2898

[114] YANG, Y. M. a J. W. CHANG. Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMA-CD44v6+ subset: novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells. *Cancer Investigation* [online]. 2008, **26**(7), 725–733. ISSN 1532-4192. Dostupné z: doi:10.1080/07357900801941845

[115] SHE, J. J., P. G. ZHANG, Z. M. WANG, W. M. GAN a X. M. CHE. Identification of side population cells from bladder cancer cells by DyeCycle Violet staining. *Cancer Biology & Therapy* [online]. 2008, **7**(10), 1663–1668. ISSN 1538-4047. Dostupné z: doi:10.4161/cbt.7.10.6637

[116] NING, Z. F., Y. J. HUANG, T. X. LIN, Y. X. ZHOU, C. JIANG, K.W. XU, H. HUANG, X. B. YIN a J. HUANG. Subpopulations of Stem-like Cells in Side Population Cells from the Human Bladder Transitional Cell Cancer Cell Line T24. *Journal of International Medical Research* [online]. 2009, **37**(3), 621–630. ISSN 0300-0605. Dostupné z: doi:10.1177/147323000903700304

[117] HE, X., L. MARCHIONNI, D. E. HANSEL, W. YU, A. SOOD, J. YANG, G. PARMIGIANI, W. MATSUI a D. M. BERMAN. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2009, **27**(7), 1487–1495. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.92

[118] CHAN, K. S., I. ESPINOSA, M. CHAO, D. WONG, L. AILLES, M. DIEHN, H. GILL, J. PRESTI, H. Y. CHANG, M. VAN DE RIJN, L. SHORTLIFFE a I. L. WEISSMAN. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2009, **106**(33), 14016–14021. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0906549106

[119] SU, Y., Q. QIU, X. ZHANG, Z. JIANG, Q. LENG, Z. LIU, S. A. STASS a F. JIANG. Aldehyde Dehydrogenase 1 A1–Positive Cell Population Is Enriched in Tumor-Initiating Cells and Associated with Progression of Bladder Cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* [online]. 2010, **19**(2), 327–337. ISSN 1055-9965, 1538-7755. Dostupné z: doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0865

- [120] VOLKMER, JP., D. SAHOO, R. K. CHIN, P. L. HO, C. TANG, A. V. KURTOVA, S. B. WILLINGHAM, S. K. PAZHANISAMY, H. CONTRERAS-TRUJILLO, T. A. STORM, Y. LOTAN, A. H. BECK, B. I. CHUNG, A. A. ALIZADEH, G. GODOY, S. P. LERNER, M. VAN DE RIJN, L. D. SHORTLIFFE, I. L. WEISSMAN a K. S. CHAN. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, **109**(6), 2078–2083. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1120605109
- [121] HOFNER, T., S. MACHER-GOEPFINGER, C. KLEIN, A. SCHILLERT, C. EISEN, S. WAGNER, T. RIGO-WATERMEIER, I. BACCELLI, V. VOGEL, A. TRUMPP a M. R. SPRICK. Expression and prognostic significance of cancer stem cell markers CD24 and CD44 in urothelial bladder cancer xenografts and patients undergoing radical cystectomy. *Urologic Oncology* [online]. 2014, **32**(5), 678–686. ISSN 1873-2496. Dostupné z: doi:10.1016/j.urolonc.2014.01.001
- [122] OJHA, R., V. JHA, S. K. SINGH a S. BHATTACHARYYA. Autophagy inhibition suppresses the tumorigenic potential of cancer stem cell enriched side population in bladder cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2014, **1842**(11), 2073–2086. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.007
- [123] OOKI, A., A. BEGUM, L. MARCHIONNI, C. J. VANDENBUSSCHE, S. MAO, M. KATES a M. O. HOQUE. Arsenic promotes the COX2/PGE2-SOX2 axis to increase the malignant stemness properties of urothelial cells. *International Journal of Cancer* [online]. 2018, **143**(1), 113–126. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.31290
- [124] SHIN, K., A. LIM, Ch. ZHAO, D. SAHOO, Y. PAN, E. SPIEKERKOEETTER, J. C. LIAO a P. A. BEACHY. Hedgehog signaling restrains bladder cancer progression by eliciting stromal production of urothelial differentiation factors. *Cancer Cell* [online]. 2014, **26**(4), 521–533. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2014.09.001
- [125] GANDHI, D., A. MOLOTKOV, E. BATOURINA, K. SCHNEIDER, H. DAN, M. REILEY, E. LAUFER, D. METZGER, F. LIANG, Y. LIAO, TT. SUN, B. ARONOW, R. ROSEN, J. MAUNEY, R. ADAM, C. ROSSELOT, J. VAN BATAVIA, A. MCMAHON, J. MCMAHON, JJ. GUO a C. MENDELSON. Retinoid signaling in progenitors controls specification and regeneration of the urothelium. *Developmental Cell* [online]. 2013, **26**(5), 469–482. ISSN 1878-1551. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2013.07.017
- [126] SCHÄFER, FM., K. ALGARRAHI, A. SAVARINO, X. YANG, C. SEAGER, D. FRANCK, K. COSTA, S. LIU, T. LOGVINENKO, R. ADAM aj. R. MAUNEY. Mode of Surgical Injury Influences the Source of Urothelial Progenitors during Bladder Defect Repair. *Stem Cell Reports* [online]. 2017, **9**(6), 2005–2017. ISSN 2213-6711. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2017.10.025
- [127] SUTHERLAND, R. M., H. A. EDDY, B. BAREHAM, K. REICH a D. VANANTWERP. Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1979, **5**(8), 1225–1230. ISSN 0360-3016.
- [128] HATINA, J., H. S. PARMAR, M. KRIPNEROVA, A. HEPBURN a R. HEER. Urothelial Carcinoma Stem Cells: Current Concepts, Controversies, and Methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton,*

N.J.) [online]. 2018, **1655**, 121–136. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7234-0_10

[129] TRÉDAN, O., C. M. GALMARINI, K. PATEL a I. F. TANNOCK. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* [online]. 2007, **99**(19), 1441–1454. ISSN 1460-2105. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/djm135

[130] SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer* [online]. 2003, **3**(10), 721–732. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1187

[131] CHOI, Y. J., J. K. RHO, S. J. LEE, W. S. JANG, S. S. LEE, Ch. H. KIM a J. C. LEE. HIF-1 α modulation by topoisomerase inhibitors in non-small cell lung cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 2009, **135**(8), 1047–1053. ISSN 1432-1335. Dostupné z: doi:10.1007/s00432-009-0543-2

[132] WIRTHNER, R., S. WRANN, K. BALAMURUGAN, R. H. WENGER a D. P. STIEHL. Impaired DNA double-strand break repair contributes to chemoresistance in HIF-1 α -deficient mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* [online]. 2008, **29**(12), 2306–2316. ISSN 1460-2180. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/bgn231

[133] HATINA, J., M. BOESCH, S. SOPPER, M. KRIPNEROVA, D. WOLF, D. REIMER, C. MARTH a A. G. ZEIMET. Ovarian Cancer Stem Cell Heterogeneity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 2019, **1139**, 201–221. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-14366-4_12

[134] KURTOVA, A. V., J. XIAO, Q. MO, S. PAZHANISAMY, R. KRASNOW, S. P. LERNER, F. CHEN, T. T. ROH, E. LAY, P. L. HO a K. S. CHAN. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature* [online]. 2015, **517**(7533), 209–213. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature14034

[135] SLANINOVÁ, V. a A. KREJČÍ. Rakovinná buňka a změny jejího metabolismu: cesta k přežití i nástroj k destrukci. *Živa*. 2013, **6**, 202–205.

[136] WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*. 1956, **124**(3215), 269–270. ISSN 0036-8075.

[137] WARBURG, O., F. WIND a E. NEGELEIN. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*. 1927, **8**(6), 519–530. ISSN 0022-1295.

[138] MARROQUIN, L. D., J. HYNES, J. A. DYKENS, J. D. JAMIESON a Y. WILL. Circumventing the Crabtree Effect: Replacing Media Glucose with Galactose Increases Susceptibility of HepG2 Cells to Mitochondrial Toxicants. *Toxicological Sciences* [online]. 2007, **97**(2), 539–547. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfm052

[139] HELMLINGER, G., A. SCKELL, M. DELLIAN, N. S. FORBES a R. K. JAIN. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2002, **8**(4), 1284–1291. ISSN 1078-0432.

- [140] COUNILLON, L., Y. BOURET, I. MARCHIQ a. POUYSSÉGUR. Na(+)/H(+) antiporter (NHE1) and lactate/H(+) symporters (MCTs) in pH homeostasis and cancer metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2016, **1863**(10), 2465–2480. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2016.02.018
- [141] PÉREZ-ESCUREDO, J., V. F. VAN HÉE, M. SBOARINA, J. FALCES, V. L. PAYEN, L. PELLERIN a P. SONVEAUX. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 2016, **1863**(10), 2481–2497. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2016.03.013
- [142] LE FLOCH, R., J. CHICHE, I. MARCHIQ, T. NAIKEN, T. NAÏKEN, K. ILC, K. ILK, C. M. MURRAY, S. E. CRITCHLOW, D. ROUX, MP. SIMON a J POUYSSÉGUR. CD147 subunit of lactate/H+ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2011, **108**(40), 16663–16668. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1106123108
- [143] CHICHE, J., Y. LE FUR, C. VILMEN, F. FRASSINETI, L. DANIEL, A. P. HALESTRAP, P. J. COZZONE, J. POUYSSÉGUR a N. W. LUTZ. In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH. *International Journal of Cancer* [online]. 2012, **130**(7), 1511–1520. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.26125
- [144] MARCHIQ, I., R. LE FLOCH, D. ROUX, MP. SIMON a J. POUYSSEGUR. Genetic disruption of lactate/H+ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Research* [online]. 2015, **75**(1), 171–180. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2260
- [145] AFONSO, J., L. L. SANTOS, V. MIRANDA-GONÇALVES, A. MORAIS, T. AMARO, A. LONGATTO-FILHO a F. BALTAZAR. CD147 and MCT1-potential partners in bladder cancer aggressiveness and cisplatin resistance. *Molecular Carcinogenesis* [online]. 2015, **54**(11), 1451–1466. ISSN 1098-2744. Dostupné z: doi:10.1002/mc.22222
- [146] COFFIN, C. M., P. A. HUMPHREY a L. P. DEHNER. Extrapulmonary inflammatory myofibroblastic tumor: a clinical and pathological survey. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1998, **15**(2), 85–101. ISSN 0740-2570.
- [147] HARIK, L. R., C. MERINO, JM. COINDRE, M. B. AMIN, F. PEDEUTOUR a S. W. WEISS. Pseudosarcomatous myofibroblastic proliferations of the bladder: a clinicopathologic study of 42 cases. *The American Journal of Surgical Pathology* [online]. 2006, **30**(7), 787–794. ISSN 0147-5185. Dostupné z: doi:10.1097/01.pas.0000208903.46354.6f
- [148] ARBER, D. A., L. M. WEISS a K. L. CHANG. Detection of Epstein-Barr Virus in inflammatory pseudotumor. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1998, **15**(2), 155–160. ISSN 0740-2570.
- [149] KOJIMA, M., S. NAKAMURA, H. ITOH, T. SUCHI a N. MASAWA. Inflammatory pseudotumor of the submandibular gland: report of a case presenting with autoimmune disease-like clinical

manifestations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [online]. 2001, **125**(8), 1095–1097. ISSN 0003-9985. Dostupné z: doi:10.1043/0003-9985(2001)125<1095:IPOTSG>2.0.CO;2

[150] GOFRIT, O. N., D. PODE, A. SHAPIRO, K. C. ZORN a G. PIZOV. Significance of inflammatory pseudotumors in patients with a history of bladder cancer. *Urology* [online]. 2007, **69**(6), 1064–1067. ISSN 1527-9995. Dostupné z: doi:10.1016/j.urology.2007.01.101

[151] CHENG, L., S. R. FOSTER, G. T. MACLENNAN, A. LOPEZ-BELTRAN, S. ZHANG a R. MONTIRONI. Inflammatory myofibroblastic tumors of the genitourinary tract--single entity or continuum? *The Journal of Urology* [online]. 2008, **180**(4), 1235–1240. ISSN 1527-3792. Dostupné z: doi:10.1016/j.juro.2008.06.049

[152] EMERSON, R. E. a L. CHENG. Immunohistochemical markers in the evaluation of tumors of the urinary bladder: a review. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. 2005, **27**(6), 301–316.

[153] PATEL, A. S., K. M. MURPHY, A. L. HAWKINS, J. S. COHEN, P. P. LONG, E. J. PERLMAN a C. A. GRIFFIN. RANBP2 and CLTC are involved in ALK rearrangements in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics* [online]. 2007, **176**(2), 107–114. ISSN 0165-4608. Dostupné z: doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.04.004

[154] CHENG, L., S. R. FOSTER, G. T. MACLENNAN, A. LOPEZ-BELTRAN, S. ZHANG a R. MONTIRONI. Inflammatory myofibroblastic tumors of the genitourinary tract--single entity or continuum? *The Journal of Urology* [online]. 2008, **180**(4), 1235–1240. ISSN 1527-3792. Dostupné z: doi:10.1016/j.juro.2008.06.049

[155] DEBIEC-RYCHTER, M., P. MARYNEN, A. HAGEMEIJER a P. PAUWELS. ALK-AT1C fusion in urinary bladder inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes, Chromosomes & Cancer* [online]. 2003, **38**(2), 187–190. ISSN 1045-2257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc.10267

[156] INAMURA, K., M. KOBAYASHI, H. NAGANO, Y. SUGIURA, M. OGAWA, H. MASUDA, J. YONESE a Y. ISHIKAWA. A novel fusion of HNRNPA1-ALK in inflammatory myofibroblastic tumor of urinary bladder. *Human pathology* [online]. 2017, **69**, 96–100. ISSN 0046-8177. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2017.04.022

[157] TEOH, J. Y. C., NH. CHAN, HY. CHEUNG, S. S. M. HOU a CF. NG. Inflammatory myofibroblastic tumors of the urinary bladder: a systematic review. *Urology* [online]. 2014, **84**(3), 503–508. ISSN 1527-9995. Dostupné z: doi:10.1016/j.urology.2014.05.039

[158] YOUNG, R. H. Spindle cell lesions of the urinary bladder. *Histology and Histopathology*. 1990, **5**(4), 505–512. ISSN 0213-3911.

[159] KATO, M., S. MASUI, H. KANDA, K. ARIMA, T. SHIRAIISHI a Y. SUGIMURA. Successful Preservation of the Bladder in a Case of Inflammatory Myofibroblastic Tumor with the Diagnostic Efficacy of ALK/p80 Immunohistochemistry and FISH Analysis: Case Report and Review of the Literature. *Urology Case Reports* [online]. 2017, **11**, 19–21. ISSN 2214-4420. Dostupné z: doi:10.1016/j.eucr.2016.11.018

- [160] SEIFERT, H. H., A. MEYER, M. V. CRONAUER, J. HATINA, M. MÜLLER, H. RIEDER, M. J. HOFFMANN, R. ACKERMANN a W. A. SCHULZ. A new and reliable culture system for superficial low-grade urothelial carcinoma of the bladder. *World Journal of Urology* [online]. 2007, **25**(3), 297–302. ISSN 0724-4983. Dostupné z: doi:10.1007/s00345-007-0166-7
- [161] KOCH, A., J. HATINA, H. RIEDER, HH. SEIFERT, W. HUCKENBECK, F. JANKOWIAK, A. R. FLORL, R. STOEHR a W. A. SCHULZ. Discovery of TP53 splice variants in two novel papillary urothelial cancer cell lines. *Cellular Oncology (Dordrecht)* [online]. 2012, **35**(4), 243–257. ISSN 2211-3436. Dostupné z: doi:10.1007/s13402-012-0082-8
- [162] KRIPNEROVA, M., P. DVORAK, M. PESTA, J. KUNCOVA, T. VLAS, M. LEBA, L. HOLUBEC a J. HATINA. Odvozeni a charakterizace bunecneho modelu multilekove rezistence urotelialniho karcinomu. *Czech urology*. 2015, **19**(4), 281–290. ISSN 12118729.
- [163] SZLISZKA, E., B. MAZUR, G. ZYDOWICZ, Z. P. CZUBA a W. KRÓL. TRAIL-induced apoptosis and expression of death receptor TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in bladder cancer cells. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* [online]. 2009, **47**(4), 579–585. ISSN 1897-5631. Dostupné z: doi:10.2478/v10042-009-0111-2
- [164] GREIFE, A., Jitka T., C. STEINHOFF, S. D. SCOTT, W. A. SCHULZ a J. HATINA. Establishment and characterization of a bladder cancer cell line with enhanced doxorubicin resistance by mevalonate pathway activation. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* [online]. 2015, **36**(5), 3293–3300. ISSN 1423-0380. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-014-2959-9
- [165] SEEMANN, O., M. MUSCHECK, M. SIEGSMUND, H. PILCH, C. T. NEBE, J. RASSWEILER a P. ALKEN. Establishment and characterization of a multidrug-resistant human bladder carcinoma cell line RT112/D21. *Urological Research*. 1995, **22**(6), 353–360. ISSN 0300-5623.
- [166] KUNCOVÁ, J., Z. KOSTROUCH, M. VIALE, R. REVOLTELLA a V. MANDYS. Expression of CD44v6 correlates with cell proliferation and cellular atypia in urothelial carcinoma cell lines 5637 and HT1197. *Folia Biologica*. 2005, **51**(1), 3–11. ISSN 0015-5500.
- [167] BÖCKER, W., Z. YIN, I. DROSSE, F. HAASTERS, O. ROSSMANN, M. WIERER, C. POPOV, M. LOCHER, W. MUTSCHLER, D. DOCHEVA a M. SCHIEKER. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2008, **12**(4), 1347–1359. ISSN 1582-1838. Dostupné z: doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00299.x
- [168] SCHULTE, J., M. WEIDIG, P. BALZER, P. RICHTER, M. FRANZ, K. JUNKER, M. GAJDA, K. FRIEDRICH, H. WUNDERLICH, A. ÖSTMAN, I. PETERSEN a A. BERNDT. Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 2012, **138**(6), 847–860. ISSN 1432-119X. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-012-0998-0

- [169] GRIMM, S., S. JENNEK, R. SINGH, A. ENKELMANN, K. JUNKER, N. RIPPAUS, A. BERNDT a K. FRIEDRICH. Malignancy of bladder cancer cells is enhanced by tumor-associated fibroblasts through a multifaceted cytokine-chemokine loop. *Experimental Cell Research* [online]. 2015, **335**(1), 1–11. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2015.04.001
- [170] ROONEY, D. E. a B. H. CZEPULKOWSKI. *Human Cytogenetics: A Practical Approach: Volume II: Malignancy and Acquired Abnormalities*. Second. New York: Oxford University Press, 1992. ISBN 978-0-19-963289-3.
- [171] SHAFFER, L. G., J. MCGOWAN-JORDAN a M. SCHMID. *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013)*. 1 edition. Basel: S. Karger, 2012. ISBN 978-3-318-02253-7.
- [172] VOHRADSKÁ, P., J. HATINA, P. DVOŘÁK, M. KRIPNEROVÁ, M. ŠTĚNOVÁ, K. TESAŘOVÁ, L. WEBEROVÁ, L. JAKOLOVÁ a I. ŠUBRT. Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza progresivní série buněčných linií odvozených z uroteliálního karcinomu. In: *50. výroční cytogenetická konference*. 2019.
- [173] FRY, C. H., G. P. SUI, A. J. KANAI a C. WU. The function of suburothelial myofibroblasts in the bladder. *Neurourology and Urodynamics* [online]. 2007, **26**(6 Suppl), 914–919. ISSN 0733-2467. Dostupné z: doi:10.1002/nau.20483
- [174] NEUHAUS, J., M. HEINRICH, N. SCHLICHTING, A. OBERBACH, G. FITZL, T. SCHWALENBERG, L. C. HORN a J. U. STOLZENBURG. [Structure and function of suburothelial myofibroblasts in the human urinary bladder under normal and pathological conditions]. *Der Urologe. Ausg. A*. 2007, **46**, 1197–202.
- [175] ENKELMANN, A., J. HEINZELMANN, F. VON EGGELING, M. WALTER, A. BERNDT, H. WUNDERLICH a K. JUNKER. Specific protein and miRNA patterns characterise tumour-associated fibroblasts in bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 2011, **137**(5), 751–759. ISSN 1432-1335. Dostupné z: doi:10.1007/s00432-010-0932-6
- [176] EYDEN, B. The Myofibroblast: An Assessment of Controversial Issues and a Definition Useful in Diagnosis and Research. *Ultrastructural Pathology* [online]. 2001, **25**(1), 39–50. ISSN 0191-3123. Dostupné z: doi:10.1080/019131201300004672
- [177] EYDEN, B. The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. Part 1--normal and reactive cells. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. 2005, **37**(2), 109–204. ISSN 1122-9497.
- [178] EMING, SA. Biology of wound healing. In: *Dermatology*: [online]. 3. vyd., Elsevier, 2012 [vid. 2019-04-03], s. 2313–2325. 9780702051821. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/dermatology-2-volume-set/bologna/978-0-7234-3571-6>
- [179] MORI, S., J. T. CHANG, E. R. ANDRECHEK, N. MATSUMURA, T. BABA, G. YAO, J. W. KIM, M. GATZA, S. MURPHY a J. R. NEVINS. Anchorage-independent cell growth signature identifies

tumors with metastatic potential. *Oncogene* [online]. 2009, **28**(31), 2796–2805. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2009.139

[180] BOMAN, K., A. H. LARSSON, U. SEGERSTEN, E. KUTEEVA, H. JOHANNESSON, B. NODIN, J. EBERHARD, M. UHLÉN, P. U. MALMSTRÖM a K. JIRSTRÖM. Membranous expression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in urothelial bladder cancer. *British Journal of Cancer* [online]. 2013, **108**(11), 2321–2328. ISSN 1532-1827. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.2013.215

[181] GNAIGER, E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control* [online]. Austria: Oroboros Instruments Corp, 2014. ISBN 978-3-9502399-8-0.

Dostupné z: http://www.bioblast.at/index.php/Gnaiger_2014_MitoPathways

[182] PESTA, D. a E. GNAIGER. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2012, **810**, 25–58. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-382-0_3

[183] MARSHALL, C. J., L. M. FRANKS a A. W. CARBONELL. Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977, **58**(6), 1743–1751. ISSN 0027-8874.

[184] O'CONNOR, R. The Pharmacology of Cancer Resistance. *Anticancer Research*. 2007, **27**(3A), 1267-1272.

[185] RAJTMAJEROVÁ, M. *Expresse CD47 a jeho topologie na povrchu primárních buněk karcinomu močového měchýře při interakci s makrofágy*. Praha, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.

[186] MANI, S. A., W. GUO, MJ. LIAO, EN. EATON, A. AYYANAN, A. Y. ZHOU, M. BROOKS, F. REINHARD, Ch. Cheng ZHANG, M. SHIPITSIN, L. L. CAMPBELL, K. POLYAK, C. BRISKEN, J. YANG a R. A. WEINBERG. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* [online]. 2008, **133**(4), 704–715. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2008.03.027

[187] CELIÀ-TERRASSA, T., Ó. MECA-CORTÉS, F. MATEO, A. M. de PAZ, N. RUBIO, A. ARNAL-ESTAPÉ, B. J. ELL, R. BERMUDO, A. DÍAZ, M. GUERRA-REBOLLO, J. J. LOZANO, C. ESTARÁS, C. ULLOA, D. PLVAREZ-SIMÓN, J. MILÀ, R. VILELLA, R. PACIUCCI, M. MARTÍNEZ-BALBÁS, A. G. de HERREROS, R. R. GOMIS, Y. KANG, J. BLANCO, P. L. FERNÁNDEZ a T. M. THOMSON. *Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells* [online]. 1. květen 2012 [vid. 2018-06-08]. Dostupné z: doi:10.1172/JCI59218

[188] ALEXA, A., F. BADERCA, R. LIGHEZAN a D. IZVERNARIU. Myofibroblasts reaction in urothelial carcinomas. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*. 2009, **50**(4), 639–643. ISSN 1220-0522.

[189] WANG, P., MA. NISHITANI, S. TANIMOTO, T. KISHIMOTO, T. FUKUMORI, M. TAKAHASHI a HO. KANAYAMA. Bladder cancer cell invasion is enhanced by cross-talk with fibroblasts through

hepatocyte growth factor. *Urology* [online]. 2007, **69**(4), 780–784. ISSN 1527-9995. Dostupné z: doi:10.1016/j.urology.2007.01.063

[190] ZHANG, J, L. MIAO, S. GUO, Y. ZHANG, L. ZHANG, A. SATTERLEE, W. Y. KIM a L. HUANG. Synergistic anti-tumor effects of combined gemcitabine and cisplatin nanoparticles in a stroma-rich bladder carcinoma model. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* [online]. 2014, **182**, 90–96. ISSN 1873-4995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.016

[191] PIETRAS, K. a A. OSTMAN. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research* [online]. 2010, **316**(8), 1324–1331. ISSN 1090-2422. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2010.02.045

[192] STRELL, C., H. RUNDQVIST a A. OSTMAN. Fibroblasts--a key host cell type in tumor initiation, progression, and metastasis. *Upsala Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, **117**(2), 187–195. ISSN 2000-1967. Dostupné z: doi:10.3109/03009734.2012.654859

[193] LYSAK, D., T. VLAS, M. HOLUBOVA, M. MIKLIKOVA a J. PAVEL. In vitro testing of immunosuppressive effects of mesenchymal stromal cells on lymphocytes stimulated with alloantigens. *Biomedical Papers* [online]. 2015, **159**(2), 215–219. ISSN ,. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2013.072

[194] PRITCHARD, J. R., D. A. LAUFFENBURGER a M. T. HEMANN. Understanding Resistance to Combination Chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* [online]. 2012, **15**(0), 249–257. ISSN 1368-7646. Dostupné z: doi:10.1016/j.drug.2012.10.003

[195] CHABNER B. A. a L. D. LONGO. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. Fifth edition. Philadelphia: LWW, 2010. ISBN 978-1-60547-431-1.

[196] MOSCOW, J. A., K. H. COWAN a B. I. SIKIC. Drug Resistance and its Clinical Circumvention. In: R. C. BAST, W. N. HAIT, D. W. KUFEL, R. R. WEICHELBAUM, J. F. HOLLAND, C. M. CROCE, M. PICCART-GEBART, H. WANG, W. K. HONG a R. E. POLLOCK. *Holland-Frei Cancer Medicine* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017 [vid. 2018-05-23], s. 1–7. ISBN 978-1-118-93469-2. Dostupné z: doi:10.1002/9781119000822.hfcm063

[197] BAGULEY, B. C. Multidrug Resistance in Cancer. In: *Multi-Drug Resistance in Cancer* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2010 [vid. 2018-05-23], Methods in Molecular Biology, s. 1–14. ISBN 978-1-60761-415-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-416-6_1

[198] LONGLEY, D. B. a P. G. JOHNSTON. Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology* [online]. 2005, **205**(2), 275–292. ISSN 0022-3417. Dostupné z: doi:10.1002/path.1706

[199] TSAI, J. H., J. L. DONAHER, D. A. MURPHY, S. CHAU a J. YANG. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* [online]. 2012, **22**(6), 725–736. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2012.09.022

- [200] PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. *Nature Biotechnology* [online]. 1999, **17**(1), 94–95. ISSN 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/5289
- [201] MOHELNÍKOVÁ-DUCHONOVÁ, B. a P. SOUCEK. [The role of membrane transporters in cellular resistance of pancreatic carcinoma to gemcitabine]. *Klinická Onkologie: Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti*. 2010, **23**(5), 306–310. ISSN 0862-495X.
- [202] ÖZDEMİR, B. C., T. PENTCHEVA-HOANG, J. L. CARSTENS, X. ZHENG, CC. WU, T. R. SIMPSON, H. LAKLAI, H. SUGIMOTO, C. KAHLERT, S. V. NOVITSKIY, A. DE JESUS-ACOSTA, P. SHARMA, P. HEIDARI, U.r MAHMOOD, L. CHIN, H. L. MOSES, V. M. WEAVER, A. MAITRA, J. P. ALLISON, V. S. LEBLEU a R. KALLURI. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* [online]. 2014, **25**(6), 719–734. ISSN 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005
- [203] SIU, M. K. Y., E. S. Y. WONG, D. S. H. KONG, H. Y. CHAN, L. JIANG, O. G. W. WONG, E. W. F. LAM, K. K. L. CHAN, H. Y. S. NGAN, X.-F. LE a A. N. CHEUNG. Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of E-cadherin and FoxJ1 and contributes to adverse clinical outcome in ovarian cancers. *Oncogene* [online]. 2013, **32**(30), 3500–3509. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2012.363
- [204] SHIMASAKI, N., N. KURODA, E. MIYAZAKI, Y. HAYASHI, M. TOI, M. HIROI, H. ENZAN a T. SHUIN. The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness. *Histology and Histopathology* [online]. 2006, **21**(4), 349–353. ISSN 1699-5848. Dostupné z: doi:10.14670/HH-21.347
- [205] KURODA, T., Y. HIROHASHI, T. TORIGOE, K. YASUDA, A. TAKAHASHI, H. ASANUMA, R. MORITA, T. MARIYA, T. ASANO, M. MIZUUCHI, T. SAITO a N. SATO. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PLoS One* [online]. 2013, **8**(6), e65158. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0065158
- [206] EMENS, L. A. Chemoimmunotherapy. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* [online]. 2010, **16**(4), 295–303. ISSN 1528-9117. Dostupné z: doi:10.1097/PPO.0b013e3181eb5066
- [207] APETOH, L., S. LADOIRE, G. COUKOS a F. GHIRINGHELLI. Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure? *Annals of Oncology* [online]. 2015, **26**(9), 1813–1823. ISSN 0923-7534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdv209
- [208] FUCIKOVA, J., P. KRALIKOVA, A. FIALOVA, T. BRTNICKY, L. ROB, J. BARTUNKOVA a R. SPÍSEK. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Research* [online]. 2011, **71**(14), 4821–4833. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0950
- [209] FUČÍKOVÁ, J., J. BARTŮŇKOVÁ a R. ŠPÍŠEK. The Concept of Immunogenic Cell Death in Antitumor Immunity. *Klinická onkologie* [online]. 2015, **28**(Suppl 4), 4S48-4S55. ISSN 0862495X, 18025307. Dostupné z: doi:10.14735/amko20154S48

- [210] EMENS, L. A. a G. MIDDLETON. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. *Cancer immunology research* [online]. 2015, **3**(5), 436–443. ISSN 2326-6066. Dostupné z: doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0064
- [211] VAN DER MOST, R. G., A. J. CURRIE, A. L. CLEAVER, J. SALMONS, A. K. NOWAK, S. MAHENDRAN, I. LARMA, A. PROSSER, B. W. S. ROBINSON, M. J. SMYTH, A. A. SCALZO, M. A. DEGLI-ESPOSTI a R. A. LAKE. Cyclophosphamide Chemotherapy Sensitizes Tumor Cells to TRAIL-Dependent CD8 T Cell-Mediated Immune Attack Resulting in Suppression of Tumor Growth. *PLoS ONE* [online]. 2009, **4**(9) [vid. 2019-05-23]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0006982
- [212] LAMB, R., B. OZSVARI, C. L. LISANTI, H. B. TANOWITZ, A. HOWELL, U. E. MARTINEZ-OUTSCHOORN, F. SOTGIA a M. P. LISANTI. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget* [online]. 2015, **6**(7), 4569–4584. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.3174
- [213] MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E., Z. LIN, D. WHITAKER-MENEZES, A. HOWELL, M. P. LISANTI a F. SOTGIA. Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism. *Cell Cycle* [online]. 2012, **11**(21), 3956–3963. ISSN 1538-4101. Dostupné z: doi:10.4161/cc.22136
- [214] SPEES, J. L., S. D. OLSON, M. J. WHITNEY a D. J. PROCKOP. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2006, **103**(5), 1283–1288. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0510511103
- [215] DONG, LF., J. KOVAROVA, M. BAJZIKOVA, A. BEZAWORK-GELETA, D. SVEC, B. ENDAYA, K. SACHAPHIBULKIJ, A. R. COELHO, N. SEBKOVA, A. RUZICKOVA, A. S. TAN, K. KLUCKOVA, K. JUDASOVA, K. ZAMECNIKOVA, Z. RYCHTARCIKOVA, Vi. GOPALAN, L. ANDERA, M. SOBOL, B. YAN, B. PATTAI, N. BHATRAJU, J. TRUKSA, P. STOPKA, P. HOZAK, A. K. LAM, R. SEDLACEK, P. J. OLIVEIRA, M. KUBISTA, A. AGRAWAL, K. DVORAKOVA-HORTOVA, J. ROHLENA, M. V. BERRIDGE a NEUZIL. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *eLife* [online]. 2017, **6**. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.22187
- [216] LAGADINO, EI. D., A. SACH, K. CALLAHAN, R. M. ROSSI, S. J. NEERING, M. MINHAJUDDIN, J. M. ASHTON, S. PEI, V. GROSE, K. M. O'DWYER, J. L. LIESVELD, P. S. BROOKES, M. W. BECKER a C. T. JORDAN. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell stem cell* [online]. 2013, **12**(3), 329. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2012.12.013
- [217] VLASHI, E., C. LAGADEC, L. VERGNES, K. REUE, P. FROHNEN, M. CHAN, Y. ALHIYARI, M. B. DRATVER a F. PAJONK. Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2014, **146**(3), 525–534. ISSN 1573-7217. Dostupné z: doi:10.1007/s10549-014-3051-2

[218] VLASHI, E., C. LAGADEC, L. VERGNES, T. MATSUTANI, K. MASUI, M. POULOU, R. POPESCU, L. DELLA DONNA, P. EVERS, C. DEKMEZIAN, K. REUE, H. CHRISTOFK, P. S. MISCHÉL a F. PAJONK. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2011, **108**(38), 16062–16067. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1106704108

9 Přehled publikační činnosti

9.1 Odborné publikace vztahují se k tématu dizertační práce

KRIPNEROVÁ, M. a J. HATINA. Buněčné modely chemorezistence uroteliálního karcinomu. *Česká urologie*. 2015, **19**(4), 270–280. (recenzovaný časopis)

KRIPNEROVA, M., P. DVORAK, M. PESTA, J. KUNCOVA, T. VLAS, M. LEBA, L. HOLUBEC a J. HATINA. Odvození a charakterizace bunecneho modelu multilekove rezistence urotelialniho karcinomu. *Czech urology*. 2015, **19**(4), 281–290. ISSN 12118729. (recenzovaný časopis)

HATINA, J., M. KRIPNEROVÁ, J. TUKOVÁ, J. ŠRÁMEK, P. DVOŘÁK, M. PEŠTA, J. DOBRÁ, V. BABUŠKA, J. RACEK, M. SOBOL, A. PHILIMONENKO, P. HOZÁK, Z. CZUBA, W. A. SCHULZ, C. STRELL, S. GRIMM, S. JENNEK a K. H. FRIEDRICH. [Tumour-stroma interactions in urothelial cancer]. *Der Urologe. Ausg. A* [online]. 2015, **54**(4), 516–525. ISSN 1433-0563. Dostupné z: doi:10.1007/s00120-014-3754-3 (IF 0,522)

HATINA, J., H. S. PARMAR, M. KRIPNEROVA, A. HEPBURN a R. HEER. Urothelial Carcinoma Stem Cells: Current Concepts, Controversies, and Methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2018, **1655**, 121–136. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7234-0_10 (IF 0,38)

KRIPNEROVA, M., H. S. PARMAR, M. PESTA, M. KOHOUTOVA, J. KUNCOVA, K. DRBAL, M. RAJTMAJEROVA a J. HATINA. Urothelial Cancer Stem Cell Heterogeneity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 2019, **1139**, 127–151. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-14366-4_8 (IF 1,76)

9.2 Ostatní odborné publikace

Odborné články

DVOŘÁKOVÁ J., M. KRIPNEROVÁ., M. ČEDÍKOVÁ, V. BABUŠKA., V. KULDA, M. PEŠTA, M. KRÁLÍČKOVÁ, D. MÜLLEROVÁ. Vliv perzistentních organických polutantů na mitochondriální funkce a vznik metabolického syndromu. *Chem. Listy*. 2015, **109**(6), 418-423, ISSN 1213-7103. (IF 0,279)

KRIPNEROVÁ M. Novinky z oblasti sarkomů měkkých tkání-18th ECCO-40th ESMO Evropský onkologický kongres 2015. *Plzeňský lékařský sborník*. 2016, **82** s. 151-158, ISSN 0551-1038. (recenzovaný časopis)

BABUŠKA V., J. DOBRÁ, V. KULDA, M. KRIPNEROVÁ, A. MOZTARZADEH, L. BOLEK., J. LAHODA, D. HRUŠÁK. Comparison of fibroblast and osteoblast response to cultivation on titanium implants with different grain sizes. *Journal of Nanomaterials*. 2015, Article ID 920893, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2015/>. (IF 1,85)

KULDA V., O. TOPOLČAN, R. KUČERA, **M. KRIPNEROVÁ**, K. SRBECKÁ, M. HORA, O. HES, J. KLEČKA, V. BABUŠKA, M. ROUŠAROVÁ, V. BENSON, M. PEŠTA. Prognostic Significance of TMPRSS2-ERG Fusion Gene in Prostate Cancer. *Anticancer Research*. 2016, **36**(9), s. 4787-4793, ISSN 0250-7005. (IF 1,937)

ČEDÍKOVÁ M., **M. KRIPNEROVÁ**, J. DVOŘÁKOVÁ, P. PITULE, M. GRUNDMANOVÁ, V. BABUŠKA, D. MÜLLEROVÁ, J. KUNCOVÁ Mitochondria in White, Brown and Beige Adipocytes. *Stem Cells International*. 2016, ISSN 1687-966X. (IF 3,54)

MÜLLEROVÁ D., M. PEŠTA, M. ČEDÍKOVÁ, J. DVOŘÁKOVÁ, V. KULDA, K. SRBECKÁ, L. MÜLLER, P. DVOŘÁK, **M. KRIPNEROVÁ**, M. KRÁLÍČKOVÁ, V. BABUŠKA, J. KUNCOVÁ. DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium. *Journal of Applied Biomedicine*. 2016, **14**, s. 113-117, ISSN 1214-021X. (IF 1,433)

ČEDÍKOVÁ M., P. PITULE, **M. KRIPNEROVÁ**, M. MARKOVÁ, J. KUNCOVÁ Multiple Roles of Mitochondria in Aging Processes. *Physiol. Res*. 2016, **65**(Suppl.5), S519-S531, ISSN 1802-9973. (IF 1,461)

ČEDÍKOVÁ M., **M. KRIPNEROVÁ**, P. PITULE, M. MARKOVÁ, J. KUNCOVÁ. Is aging reversible? - Beneficial effects of exercise. *Plzeňský lékařský sborník*. 2016, **82**, s. 9-15, ISSN 0551-1038. (recenzovaný časopis)

DEJMEK J., M. KOHOUTOVÁ, **M. KRIPNEROVÁ M.**, M. ČEDÍKOVÁ, Z. TŮMA, V. BABUŠKA, L. BOLEK, J. KUNCOVÁ. Repeated exposure to hyperbaric hyperoxia affects mitochondrial functions of the lung fibroblasts. *Physiol Res*. 2018, **67**(Suppl.4), S633-S643, ISSN 1802-9973. (IF 1,324)

J. HATINA, **M. KRIPNEROVA**, K. HOUFKOVA, M. PESTA, J. KUNCOVA, J. SANA, O. SLABY, R. RODRÍGUEZ. Sarcoma Stem Cell Heterogeneity. In: Birbrair A. (eds) Stem Cells Heterogeneity - Novel Concepts. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019, **1123**. Springer, Cham, ISBN 978-3-030-11096-3. (IF 0,9)

HATINA, J., M. BOESCH, S. SOPPER, **M. KRIPNEROVA**, D. WOLF, D. REIMER, C. M. A. ALAIN G. ZEIMET. Ovarian Cancer Stem Cell Heterogeneity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 2019, vol. 1139, s. 201–221, ISSN 0065-2598. (IF 0,9)

KLADNICKÁ I., M. ČEDÍKOVÁ, **M. KRIPNEROVÁ**, J. DVOŘÁKOVÁ, M. KOHOUTOVÁ, Z. TŮMA, D. MÜLLEROVÁ, J. KUNCOVÁ. Mitochondrial respiration of adipocytes differentiating from human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Physiol Res*. 2019 (IF 1,697, v tisku).

HATINA J., M. KRIPNEROVA, N. KHAZOV, MS. KRIMPENI, K. DRBAL, S. SCHWARZ. Molecules of Life & Mutations – a new course of advanced pathophysiology combining 1 several modern didactic approaches. *Advances in Physiology Education*. 2019 (v připomínkovém recenzním řízení)

Recenzovaná výuková díla

HATINA J., M. KRIPNEROVÁ, E. MATOUŠKOVÁ. Orgánové, organotypické a trojrozměrné kultury. *Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni* [online] 28.1.2015, poslední aktualizace 9.3.2015 [cit. 2019-05-13] Dostupný z WWW: <<http://mefanet.lfp.cuni.cz/clanky.php?aid=441>>. ISSN 1804-4409. (recenzované dílo)

HATINA J., M. KRIPNEROVÁ. Obecné základy kultivace buněk v tkáňové kultuře. *Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni* [online] 28.3.2014, poslední aktualizace 9.9.2014 [cit. 2019-05-13] Dostupný z WWW: <<http://mefanet.lfp.cuni.cz/clanky.php?aid=332>>. ISSN 1804-4409. (recenzované dílo)

9.3 Prezentace výsledků na odborných setkáních a konferencích

2014

DOBRA J., J. HATINA, M. KRIPNEROVA, Z. P. CZUBA, D. JAWORSKA, V. BABUSKA, J. RACEK. BC44 carcinoma-associated fibroblasts increase the stem cell character of cancer cells in coculture. *EMBO Conference - Cellular signalling and cancer therapy*, May 23-27, 2014, Cavtat, Croatia.

TUKOVÁ J, M. KRIPNEROVÁ, J. ŠRÁMEK, M. ČEDÍKOVÁ, J. KUNCOVÁ, J. HATINA. Molekulární charakteristiky mnohočetné lékové rezistence u buněk uroteliálního karcinomu. *54. SVK LF v Plzni*, 2014, Plzeň, Česká republika.

MÜLLEROVÁ D., M. PEŠTA, V. KULDA, J. DVOŘÁKOVÁ, M. ČEDÍKOVÁ, M. KRIPNEROVÁ, V. BABUŠKA, M. KRÁLÍČKOVÁ. Preparation and characterization of adipocyte model for studying of persistent organic pollutants exposition. *21th European Congress on Obesity (ECO2014)*, May 28-31, 2014, Sofia, Bulgaria.

HATINA J., M. KRIPNEROVA, J. TUKOVA, J. SRAMEK, J. DOBRA, V. BABUSKA. Carcinoma-associated fibroblasts promote stemness of urothelial carcinoma cells in coculture. *5th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation*, July 8–11, 2014 • Dresden, Germany.

DOBRA J., J. HATINA, M. KRIPNEROVA, Z. P. CZUBA, D. JAWORSKA, V. BABUSKA, J. RACEK. BC44 carcinoma-associated fibroblasts promote stemness of

urothelial carcinoma cells in coculture. *FEBS EMBO*, August 30-September 4, 2014, Paris, France.

KRIPNEROVÁ M., J. TUKOVÁ, M. PEŠTA, M. ČERVINKA, E. RUDOLF, J. HATINA. Time-lapsed videomicroscopy in cancer biology. *IMC-2014 18th International Microscopy Congress*, September 7-12, 2014, Prague, Czech Republic.

HATINA J., **M. KRIPNEROVÁ**, J. TUKOVÁ, J. ŠRÁMEK, P. DVOŘÁK, M. PEŠTA, J. DOBRÁ, M. SOBOL, A. KOCH, WO. A. SCHULZ. Experimentální modely terapeutické rezistence urotheliálního karcinomu. *XXI. Biologické dny*, 4.-5. 9.2014, Masarykova univerzita Univerzitní kampus Brno-Bohunice, Česká republika.

2015

KRIPNEROVÁ M., J. TUKOVÁ, M. GRUNDMANOVÁ, J. KUNCOVÁ, J. HATINA. Vztah mezi nádorovou transformací a intenzitou buněčného metabolismu u sarkomových buněčných linií, 55. *SVK LF v Plzni*, 2015, Plzeň, Česká republika.

MÜLLEROVÁ D., M. PEŠTA, J. DVOŘÁKOVÁ, P. DVOŘÁK, M. ČEDÍKOVÁ, V. KULDA, **M. KRIPNEROVÁ**, V. BABUŠKA, M. KRÁLÍČKOVÁ. Effect of the Exposition of Persistent Organic Pollutants on in vitro Model of Adipocytes in Relation to a Higher Risk of Diabetes Mellitus type II. *22nd European Congress on Obesity (ECO 2015)*, May 6-9, 2015, Prague, Czech Republic.

KRIPNEROVÁ M., J. TUKOVÁ, J. ŠRÁMEK, Z. HOUDEK, M. PEŠTA, M. GRUNDMANOVÁ, J. KUNCOVÁ AND J.HATINA. A progression series of murine fibrosarcoma separates proliferative and invasive transformation characteristics. *European Cancer Congress 2015 (ECC 2015)*, September 25-29, 2015, Vienna, Austria.

2016

KRIPNEROVÁ M., J. TUKOVÁ, Z. HOUDEK, M. GRUNDMANOVÁ, HS.PARMAR, K. ŠIMÁKOVÁ, P. DVOŘÁK, M. PEŠTA, J. KUNCOV, J. HATINA. Buněčné modely progresu sarkomu. *Biomedicínský večer LF v Plzni*, 3. února 2016, Plzeň, Česká republika.

KRIPNEROVÁ M., M. GRUNDMANOVÁ, O. SLABÝ, J. KUNCOVÁ, J. HATINA. Nové geny a genové soubory v implikované v procesu sarkomogeneze. 56. *SVK LF v Plzni*, 2016, Plzeň, Česká republika.

KRIPNEROVÁ M., H. S. PARMAR, M. PEŠTA, J. KUNCOVÁ, J. HATINA. new cell culture models of urothelial carcinoma links mitochondrial physiology to multidrug resistance. *The 12th International Congress of Cell Biology*, July 21-25, 2016, Prague, Czech Republic.

HATINA J., M. KRIPNEROVÁ, H. S. Parmar, P. DVOŘÁK, M. PEŠTA, M. DOLEJŠOVÁ, L. VIŠTEJNOVÁ, P. VOHRADSKÁ, T. VLAS, M. MARKOVÁ, J. KUNCOVÁ, J. JURÁČEK, O. SLABÝ, S. JENNEK, K. H. FRIEDRICH, C. STRELL, W. SCHULZ. Analýza interakce karcinomových a stromálních buněk nádorů močového měchýře. *Biomedicínský večer LF v Plzni*, 2016, Plzeň, Česká republika.

KRIPNEROVÁ M., H. BERÁNKOVÁ, K. DRBAL, M. REITMAYEROVÁ H. S. PARMAR, J. KUNCOVÁ, J. HATINA. Relationship between stemness and emt related traits in urothelial carcinoma. *57. SVK LF v Plzni*, 2017, Plzeň, Česká republika.

KRIPNEROVA M., T. VLAS, P. PANZNER, M. LEBA, D. LYSAK, M. PESTA, J. HATINA. Carcinoma-associated fibroblasts exert strong immunosuppressive effect in a novel co-culture model of urothelial carcinoma. *CITIM 2017 Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring*, April 24-27, 2017, Prague, Czech Republic.

KRIPNEROVÁ M., H. S. PARMAR, M. LEBA, J. KUNCOVÁ, J. ŠÁNA, O. SLABÝ, J. HATINA. Identification of candidate genes responsible for soft tissue sarcoma progression using a progression series of murine fibrosarcoma cell lines. *XXII. Biologické dni s podtitulom "Biomedicína v súčasnosti: od základného výskumu po klinickú aplikáciu"*, 22.-26. října, 2017, Smolenice, Slovensko.

KRIPNEROVÁ M., M. MARKOVÁ, M. J. HATINA, J. KUNCOVÁ. A new cell culture models of urothelial carcinoma links mitochondrial physiology to multidrug resistance. *Konference Mip201/MitoEAGLE*, 15.-18. listopadu, 2017, Hradec Králové, Česká republika.

Jiří Hatina, **Michaela Kripnerová**, Hamendra Singh Parmar, Jitka Kuncová, Martin Leba, Jiří Šána, Ondřej Slabý, Martin Pešta. Identification of candidate genes underlying soft tissue sarcoma progression using a progression series of murine fibrosarcoma cell lines. *XV. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Conference*, November 25-27, 2017, Olomouc, Czech Republic.

2018

MARKOVÁ, M., J. DEJMEK, M. KRIPNEROVÁ, M. ČEDÍKOVÁ, V. BABUŠKA, L. BOLEK, J. KUNCOVÁ. Opakovaná krátkodobá expozice hyperoxii snižuje respiraci plicních fibroblastů *in vitro*. *94. Fyziologické dny*, 6.-8. února 2018, Plzeň, Česká republika.

1. místo v soutěži o nejlepší studentské práce

ONDRUJ M., E. KOSOVÁ, K. HOUFKOVÁ, M. KRIPNEROVÁ, Z. HOUDEK, M. PEŠTA A J. HATINA.

Molekulární podstata motility sarkomových buněk. *58. SVK LF v Plzni*, 2018, Plzeň, Česká republika.

3. místo v soutěži o nejlepší práci v pregraduální sekci

MARKOVÁ, M., J. DEJMEK, M. **KRIPNEROVÁ**, M. ČEDÍKOVÁ, V. BABUŠKA, L. BOLEK, J. KUNCOVÁ. Vliv opakované expozice hyperbarické hyperoxii na mitochondriální respiraci plicních fibroblastů. 58. SVK LF v Plzni, 2018, Plzeň, Česká republika.

1. místo v soutěži o nejlepší práci v postgraduální sekci

DEJMEK J., M. MARKOVÁ, M. **KRIPNEROVÁ**, M. ČEDÍKOVÁ, V. BABUŠKA, L. BOLEK, J. KUNCOVÁ. Opakovaná krátkodobá expozice hyperoxii snižuje respiraci plicních fibroblastů *in vitro*. *Mezinárodní konference 41. Dni lékařské biofyziky*, 30.5.-1.6. 2018, Martin, Slovensko.

3. místo v soutěži o nejlepší studentkou práci

HATINA J., M. **KRIPNEROVA**, H. S. PARMAR, Z. HOUDEK, P. DVORAK, K. HOUFKOVA, M. PEŠTA, J. KUNCOVÁ, J. ŠÁNA, O. SLABÝ. Identification of candidate genes underlying soft tissue sarcoma progression using a progression series of murine fibrosarcoma cell lines. *25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research*, 30 June - 3 July, 2018, Amsterdam, Nizozemí.

HATINA J., M. **KRIPNEROVÁ**, H. S. PARMAR, Z. HOUDEK, P. DVOŘÁK, K. HOUFKOVÁ, M. PEŠTA, J. KUNCOVÁ, J. ŠÁNA, O. SLABÝ. Identification of candidate genes underlying soft tissue sarcoma progression using a progression series of murine fibrosarcoma cell lines. *The 43rd FEBS Congress Prague*, July 7-12, 2018, Prague, Czech Republic.

DEJMEK J., M. **KRIPNEROVA**, M. MARKOVA, M. CEDIKOVA, V. BABUSKA, L. BOLEK, J. KUNCOVA. Opakovaná krátkodobá expozice hyperoxii snižuje respiraci plicních fibroblastů *in vitro*. *20th European Bioenergetics Conference (EBEC2018)*, August 25-30, 2018, Budapest, Hungary.

KRIPNEROVÁ M., M. LEBA, J. KUNCOVÁ, M. PEŠTA, J. HATINA. Progression series of murine fibrosarcoma separates proliferative and invasive transformation characteristics. *20th European Bioenergetics Conference (EBEC2018)*, August 25-30, 2018, Budapest, Hungary.

KRIPNEROVA M., J. HATINA, H. S. PARMAR, Z. HOUDEK, K. HOUFKOVA, M. PESTA, J. KUNCOVA, J. SANA, O. SLABY. Complex autocrine and paracrine metabolic interactions in a series of single-background murine fibrosarcoma cell lines. *International Society of Cancer Metabolism ISCaM 2018*, October 17-20, 2018, Bratislava, Slovakia.

HATINA J., M. **KRIPNEROVÁ**, M. PEŠTA S. SOPPER, J. ŠÁNA, J. SLABÝ. Liposarcoma stem cell specific gene expression profile derived from murine sarcoma

progression cell line series. *7. ročník konference Stem Cells and Cell Therapy: From Research to Modern Clinical Applications*, 11.-12. října, 2018, Černá Hora, Czech Republic.

KLADNICKÁ I., M. CEDIKOVA, M. **KRIPNEROVA**, J. DVORAKOVA, D. MULLEROVA, J. KUNCOVA, M. PESTA. Vliv DDE na diferenciaci adipocytů z mezenchymálních kmenových buněk. *7. ročník konference Stem Cells and Cell Therapy: From Research to Modern Clinical Applications*, 11.-12. října, 2018, Černá Hora, Czech Republic.

HATINA J., M. **KRIPNEROVA**, H. S. PARMAR, Z. HOUDEK, P. DVORAK, K. HOUFKOVA, M. PESTA, J. KUNCOVA, J. SANA, O. SLABY. Complex autocrine and paracrine interactions in a series of single-background murine fibrosarcoma cell lines. *23rd Annual CTOS Meeting*, November 14-17, 2018, Rome Cavalieri Hotel, Rome, Italy.

2019

VOHRADSKÁ P., J. HATINA, P. DVOŘÁK, M. **KRIPNEROVÁ**, M. ŠTĚNOVÁ, K. TESAŘOVÁ, L. WEBEROVÁ, R. JAKLOVÁ, I. ŠUBRT. Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza progresivní série buněčných linií odvozených z uroteliálního karcinomu. *Biomedicínský večer LF v Plzni*, 2019, Plzeň, Česká republika.

KRIPNEROVÁ M., M. PEŠTA, J. KUNCOVÁ, J. HATINA. Vztah mezi nádorovou transformací a intenzitou buněčného metabolismu u sarkomových buněčných linií. *95. Fyziologické dny*, 5.-7. únor, 2019, Praha, Česká republika.

HATINA J., M. **KRIPNEROVA**, H. S. PARMAR, Z. HOUDEK, P. DVORAK, K. HOUFKOVA, M. PEŠTA, J. KUNCOVÁ, S. SOPPER, L. RADOVÁ, J. ŠÁNA, O. SLABÝ. Insight into biology from sarcoma cell line progression series. *2nd International Conference on Cancer Science and Pediatrics*, February 19-20, 2019, Prague, Czech Republic.

HATINA J., M. **KRIPNEROVÁ**, H. S. PARMAR, Z. HOUDEK, P. DVOŘÁK, K. HOUFKOVÁ, M. PEŠTA, J. KUNCOVÁ, S. SOPPER, L. RADOVÁ, J. ŠÁNA, O. SLABÝ. Insight into sarcoma biology from sarcoma cell line progression series. *The 39th Plenary meeting & 40 years Jubilee meeting of the Scandinavian Sarcoma Group, The 11th meeting of the Scandinavian Sarcoma Group for Nurses & Physiotherapists*, May 8-10, 2019, Bergen, Norway.

10 Přílohy

Příloha 1

KRIPNEROVA, M., H. S. PARMAR, M. PESTA, M. KOHOUTOVA, J. KUNCOVA, K. DRBAL, M. RAJTMAJEROVA a J. HATINA. Urothelial Cancer Stem Cell Heterogeneity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 2019, **1139**, 127–151. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-14366-4_8 (**IF 1,76**)

Příloha 2

HATINA, J., H. S. PARMAR, M. KRIPNEROVA, A. HEPBURN a R. HEER. Urothelial Carcinoma Stem Cells: Current Concepts, Controversies, and Methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2018, **1655**, 121–136. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7234-0_10 (**IF 0,38**)

Příloha 3

HATINA, J., M. KRIPNEROVÁ, J. TUKOVÁ, J. ŠRÁMEK, P. DVOŘÁK, M. PEŠTA, J. DOBRÁ, V. BABUŠKA, J. RACEK, M. SOBOL, A. PHILIMONENKO, P. HOZÁK, Z. CZUBA, W. A. SCHULZ, C. STRELL, S. GRIMM, S. JENNEK a K. H. FRIEDRICH. [Tumour-stroma interactions in urothelial cancer]. *Der Urologe. Ausg. A* [online]. 2015, **54**(4), 516–525. ISSN 1433-0563. Dostupné z: doi:10.1007/s00120-014-3754-3 (**IF 0,522**)

Příloha 4

KRIPNEROVA, M., P. DVORAK, M. PESTA, J. KUNCOVA, T. VLAS, M. LEBA, L. HOLUBEC a J. HATINA. Odvození a charakterizace bunecneho modelu multilekove rezistence urotelialniho karcinomu. *Czech urology*. 2015, **19**(4), 281–290. ISSN 12118729. (**recenzovaný časopis**)

Příloha 5

KRIPNEROVÁ, M. a J. HATINA. Buněčné modely chemorezistence uroteliálního karcinomu. *Česká urologie*. 2015, **19**(4), 270–280. (**recenzovaný časopis**)