

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Fenotyp melanocytů za fyziologických a patologických
podmínek

Phenotype of melanocytes under physiological and
pathological conditions

Karolína Strnadová

2022

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Školící pracoviště: Anatomický ústav 1. LF UK

Školitel: MUDr. Lukáš Lacina, Ph.D.

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

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1 Úvod	8
2 Cíle práce	10
3 Materiál a metodika	11
4 Výsledky a diskuse	13
4.1 Tematický okruh: Stárnutí kůže a jeho vztah ke zvýšené incidenci melanomu	13
4.2 Tematický okruh: Zlepšení časně detekce maligního melanomu	14
4.3 Tematický okruh: Modelování nádorového mikroprostředí	18
4.4 Tematický okruh: Mezibuněčná komunikace	22
5 Závěry	24
6 Použitá literatura	26
Seznam publikací	27

Abstrakt

Neopomenutelnými reprezentanty buněčných populací kůže, kromě dominantních keratinocytů a fibroblastů, jsou také melanocyty. Melanocyty jsou pigmentové buňky, jejichž primární funkcí je produkce pigmentu melaninu, který je důležitý pro ochranu keratinocytů před škodlivým ultrafialovým zářením. Nadměrné vystavení tomuto záření je rizikovým faktorem pro vznik kožních nádorů včetně maligního melanomu kůže, při kterém dochází k patologické transformaci melanocytů v buňky melanomu. Předložená disertační práce pojednává o studiu melanocytů a zaměřuje se na 4 tematické okruhy spojené zejména s jejich patologiemi. V prvním tematickém okruhu je do souvislostí dána zvyšující se incidence maligního melanomu kůže se stárnutím populace. Jednou z příčin se zdá být častější výskyt prozánětlivého ladění tkání ve stárnoucím organismu. Toto ladění připravuje vhodné prostředí pro vývoj nádoru. Druhý tematický okruh se orientuje na nové přístupy, které by mohly rozšířit škálu diagnostických metod pro časnou detekci maligního melanomu. První metodicky využívá detekci prozánětlivých molekul v těle pacienta, např. v době diagnózy. Bylo zjištěno, že vyšší sérové hladiny IL-6 nebo IL-8 korelují s nepříznivou prognózou pacienta. Druhý přístup se opírá o možnosti detekce

nádorových buněk a možnosti jejich odlišení od buněk zdravých s využitím metod, jako je povrchem zesílená Ramanova spektroskopie rozšířená o metody umělé inteligence využívající konvolučních neuronových sítí. *In silico* se toto spojení vyznačuje vysokou senzitivitou. Práce třetího tematického okruhu se snaží různými metodami o modelování mikroprostředí melanomu ve 3D, a to jak v *in vitro* podmínkách, tak *in ovo* na chorioalantoidní membráně kuřete. Čtvrtý tematický okruh se zaměřuje na mezibuněčnou komunikaci mezi maligními buňkami melanomu a buňkami mikroprostředí, převážně nádorově-asociovanými fibroblasty. V tomto okruhu je kladen důraz na komunikaci zprostředkovanou extracelulárními váčky – exosomy. Z dosažených dat vyplývá, že exosomy produkované melanomem podporují nádorově-asociované fibroblasty a ty změnou svých vlastností dále podporují progresi nádoru.

Abstract

In addition to the dominant keratinocytes and fibroblasts, melanocytes are also indispensable representatives of skin cell populations. Melanocytes are pigment cells whose primary function is to produce the pigment melanin, which is important for protecting keratinocytes from harmful ultraviolet radiation. Excessive exposure to this radiation is a risk factor for the

development of skin tumours, including malignant melanoma of the skin, in which pathological transformation of melanocytes into melanoma cells occurs. The presented thesis focuses on 4 thematic areas associated mainly with malignant melanoma. In the first thematic area, the increasing incidence of malignant skin melanoma is associated with the ageing of the population. One of the reasons seems to be the more frequent occurrence of proinflammatory setting in the ageing organism. It prepares a suitable environment for tumour development. The second thematic area focuses on new approaches that could expand the range of diagnostic methods for the early detection of malignant melanoma. The first approach methodically uses the detection of proinflammatory molecules in the patient's serum. Higher serum levels of IL-6 and IL-8 correlate with an unfavourable patient prognosis. The second approach is based on the possibility of detecting a tumour cell and the possibility of distinguishing it from a healthy cell using methods such as surface-enhanced Raman spectroscopy extended by artificial intelligence methods using convolutional neural networks. *In silico* it seems to be highly sensitive. In the third thematic area there are described various methods to model the melanoma microenvironment in 3D, *in vitro* or *in ovo* using the chorioallantoic membrane of the chicken. The fourth thematic area focuses on intercellular

communication between malignant melanoma cells and cells of the tumour microenvironment, predominantly cancer-associated fibroblasts. In this area, emphasis is placed on communication through extracellular vesicles – the exosomes. The data showed that exosomes produced by melanoma change the biological properties of cancer-associated fibroblasts to promote tumour progression.

1 Úvod

Kůže představuje jeden z největších orgánů lidského těla a plní různorodé fyziologické funkce. Současně může být postižena i početnými patologickými stavy. Studium biologie lidské kůže přineslo již v předchozích dekádách velmi detailní poznatky, z nichž mnohé mají dokonce svůj translační potenciál a našly i klinické uplatnění. Kromě základních populací lidské kůže, epidermálních keratinocytů a dermálních fibroblastů, kůži spoluvytvářejí další, takzvané minoritní, buněčné populace. Jednou z nich jsou i melanocyty, jejichž biologie je náplní předkládané disertační práce.

Melanocyty jsou buňky vývojově vycházející z buněk neurální lišty. Za embryonálního vývoje jejich prekursorů migrují do míst svého určení, např. epidermis kůže. Fyziologicky zde pak zajišťují tvorbu pigmentu melaninu, která je realizována v organelách zvaných melanosomy. Tento pigment následně předávají svými výběžky okolním keratinocytům, a vytvářejí tak funkční jednotku (tzv. *Epidermal Melanin Unit*). Melanocyt tak předávaným melaninem přispívá k ochraně jejich jádra před nadměrnou expozicí ultrafialovému záření a následnému poškození integrity genetické informace DNA. Nadměrné ozáření totiž

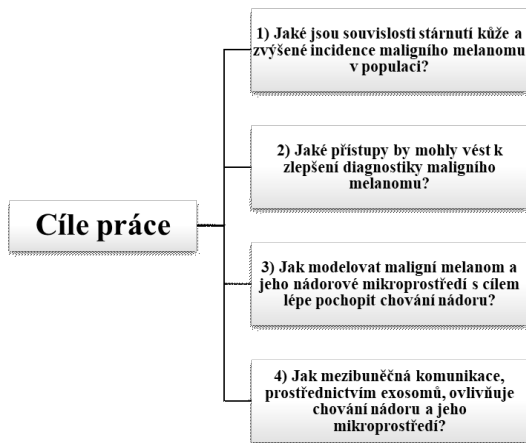
představuje základní rizikový faktor pro neoplastickou transformaci epidermálních keratinocytů a vznik epidermálních karcinomů, velmi běžných zhoubných nádorů, které postihují lidskou populaci. Mimo to ale ultrafialové záření může poškozovat i samu populaci melanocytů, a zvyšuje tak riziko vzniku kožního nádoru – maligního melanomu. Toto maligní onemocnění představuje jeden z nejagresivnějších kožních nádorů, jehož incidence v populaci stoupá. Časná detekce primárního ložiska maligního melanomu může být pro pacienta zásadní, protože umožňuje dosažení plně kurativního efektu prostřednictvím chirurgické léčby. Problém nadále ale představuje často rychlá progresse nádorového onemocnění, kdy nádorové buňky invadují lokálně a posléze pak i migrují do vzdálenějších míst krevním či lymfatickým řečištěm, což vede k tvorbě metastáz.

Klíčovým faktorem podílejícím se na regulaci invazivního chování nádoru je nádorové mikroprostředí. Pro buňky a struktury spoluvytvářející nádor, ale odlišné od maligně transformované nádorové populace, se historicky vžil v patologii termín stroma. Stromatu byly přisuzovány v starších dobách spíše jen podpůrné a nutritivní funkce. V novějším konceptu je přiznáván stromatu významný podíl na formování právě komplexního mikroprostředí, které může významně ovlivnit i maligní populaci.

Jednou z hlavních buněčných populací tohoto nádorového mikroprostředí jsou nádorově-asociované fibroblasty, které jsou důležitými producenty složek extracelulární matrix a mnoha biologicky aktivních, zejména prozánětlivých, faktorů. Interakce a mezibuněčná komunikace mezi nádorovými a stromálními buňkami je pak zásadní pro vývoj nádoru. Proto byly právě mechanismy mikroprostředí a jejich vliv na melanocyty klíčovým přístupem a objektem zájmu při výzkumné práci vedoucí k sepsání předkládané disertační práce.

2 Cíle práce

Ve své disertační práci jsem se zaměřila na tyto otázky:



3 Materiál a metodika

Veškerý biologický materiál byl pro řešení výzkumných prací získáván vždy s písemným informovaným souhlasem pacienta v souladu s etickými komisemi uvedených klinických pracovišť s plným respektem k Helsinské deklaraci z roku 1964. Biologický materiál, využitý v rámci této disertační práce, byl odebírán převážně na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN, Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole nebo Klinice plastické chirurgie FNKV.

V laboratořích Anatomického ústavu 1. LF UK byl biologický materiál následně zpracován pro histologickou analýzu, nebo byl využit jako zdroj pro kultivaci buněk a následné *in vitro* experimenty. Jednalo se hlavně o izolaci dermálních fibroblastů ze zdravých kontrolních tkání, nádorově-asociovaných fibroblastů z primárních nádorů či metastáz melanomu nebo buněk maligního melanomu z punktátů, např. z maligního ascitu pacienta. Keratinocyty byly izolovány z dodávané kůže a standardně kultivovány feederovou technikou na mitomycinem C ošetřených 3T3 myších fibroblastech (Rheinwald and Green 1975). Kromě toho byly v experimentech využívány i komerčně dostupné linie maligního melanomu (A2058, G-361). Melanomová linie

BLM byla poskytnuta L. van Kempenem a J.H.J.M. van Kriekenem (Univerzita svatého Radbouda, Nijmegen, Nizozemské království). Kontrolou k buňkám maligního melanomu byly vysoce pigmentované melanocyty poskytnuté J. Vachtenheimem (Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK, Česká republika). Xenotransplantace buněk byly prováděny na embryích masných hybridů Ross 308 kura domácího (*Gallus gallus domestica*; Xaverov, Česká republika). Chorioalantoidní membrány kuřecích embryí byly využity i jako zdroj pro izolaci fibroblastů. Kontrolou byly fibroblasty izolované z kůže dospělých slepic.

Specifikace použitého materiálu a detailní popis metod a statistického hodnocení jsou uvedeny v jednotlivých článcích autorky, které jsou nedílnou součástí této disertační práce, proto nebudou v této kapitole blíže popsány.

Je však nutné zmínit, že některé metody uvedené v publikacích by nebylo možné provést bez spolupráce s jinými institucemi a jejich specializovanými pracovišti. Genomové metody a bioinformatická analýza (publikace I, VIII, IX) byly provedeny na Oddělení genomiky a bioinformatiky na Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky. Proteomické metody (např. Luminex xMAP[®] kuličková assay v publikaci III) byly realizovány v Laboratoři aplikovaných proteomových analýz a výzkumného centra

Pigmod na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky. Metoda gradientové ultracentrifugace pro izolaci exosomů (publikace IX) byla prováděna v Laboratoři nefrologické proteomiky a extracelulárních vezikul na Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Metody uvedené v publikaci IV (kromě přípravy biologického materiálu) byly provedeny na Ústavu inženýrství pevných látek VŠCHT v Praze a Katedře mikroelektroniky Fakulty elektrotechnické ČVUT v Praze. Intenzivní spolupráce (publikace I, VII, IX) probíhala také s Laboratoří invazivity nádorových buněk v BIOCEVu (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy).

4 Výsledky a diskuse

4.1 Tematický okruh: Stárnutí kůže a jeho vztah ke zvýšené incidenci melanomu

Přehledový článek II se tematicky věnuje v širším pohledu známým faktorům stárnutí kůže a jejich podílu na zvýšení incidence nádorových onemocnění jako maligní melanom, bazocelulární nebo spinocelulární karcinom u stárnoucí populace. Klinicky výrazným rysem je alterace struktury epidermis a dermis v průběhu stárnutí, což může vést i k chronické kožní fragilitě stárnoucí kůže zvané

dermatoporóza. Při narušení struktury kůže exogenními a endogenními vlivy sehrává důležitou roli mimo jiné populace dermálních fibroblastů, která se mění také funkčně, tedy zejména změnou skladby svého sekretu. V případě nádorové transformace pak spoluvytváří příhodné prostředí pro nádorový růst a invazi, toto umožňuje např. sekrecí prozánětlivých molekul. Přehledový článek VII se soustředí na jednu z těchto prozánětlivých molekul v průběhu fyziologického stárnutí a s ním souvisejících patologií, na IL-6.

I když stárnutí není možno vnímat jako nemoc, je senium obdobím, kdy narůstá deregulace biologických procesů v organismu, což následně usnadňuje nástup mnohých chorob. Jedním z významných faktorů tohoto životního období je i nástup chronického prozánětlivého stavu v těle, který podporuje mimo jiné i potenciální rozvoj malignit. Vzhledem k narůstajícímu počtu lidí seniorského věku v populaci tak dochází k nárůstu případů diagnostikovaného nádorového onemocnění, včetně maligního melanomu.

4.2 Tematický okruh: Zlepšení časné detekce maligního melanomu

Kožní melanom v pokročilém stádiu nadále představuje onemocnění s omezenými terapeutickými možnostmi. Z toho

důvodu je snahou hledat a identifikovat molekuly, biomarkery, které by zlepšily, usnadnily, či zpřesnily diagnostiku a umožnily selekci ohroženého pacienta, nebo pomohly zvolit optimální terapii a případně byly i prognostickými faktory. Publikace III je pilotní studií, která analyzuje 31 sérových proteinů, jako jsou cytokiny, chemokiny a růstové faktory, u pacientů trpících maligním melanomem a u zdravých kontrol.

Sérologická analýza ukázala, že přítomnost primárního nádoru je spojena se sníženými hladinami IL-2, IL-13, RANTES a zvýšenými hladinami IL1RA, MIP-1 β a EGF.

Analýza séra dále ukázala, že hodnoty Breslowovy klasifikace naměřené v primárních nádorech pozitivně korelovaly se sérovými hladinami IL-6, CXCL-8, IL-13 a VEGF-A.

V této pilotní studii byla prokázána přítomnost širokého spektra zánětlivých molekul v séru pacientů. Současně však tato studie odhalila obrovský rozsah interindividuálních rozdílů mezi testovanými pacienty a také intraindividuální kolísání hodnot. Z výsledků je patrné, že výskyt některých faktorů koreluje s nepříznivými hodnotami Breslowovy klasifikace. Zvýšená hladina VEGFA pozorovaná v séru pacientů naznačuje, jak vitálně nádor potřebuje bohaté cévní zásobení.

V současnosti používané markery, jako laktát dehydrogenáza a S100 proteiny, mají „stagingový“ a prognostický význam, ale neodrážejí přesné chování organismu v době diagnózy nebo v průběhu progresu melanomu, takže strategie založená na kombinaci několika biomarkerů by mohla být v budoucnu přínosná a mohla by přispět k efektivnější detekci či terapii.

Publikace IV prezentuje pokročilé technologické přístupy a je diskutován jejich potenciál k implementaci do laboratorní medicínské diagnostiky. Blíže jsme se zaměřili na možnou detekci změn ve složení kultivačního média vyplývajících z metabolické a sekreční aktivity nádorových a nenádorových buněk. Tento přístup kombinuje několik metod z oblasti nanotechnologie, povrchové chemie, plazmoniky a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) a jejich spojení s metodami umělé inteligence (tzv. konvolučních neuronových sítí). Hlavním cílem této pilotní práce bylo testovat užitnou hodnotu těchto technologií při analýze komplexních biologických vzorků, které by mohly imitovat diagnostické vzorky získané od pacientů.

V experimentech byla použita, jako komplexní biologické směsi, kultivační média získaná z kultur buněk melanomu, nádorově asociovaných fibroblastů, ale i normálních buněk.

Iniciálně metoda SERS umožnila charakterizaci molekulárních rozdílů jednotlivých kondiciovaných kultivačních médií od nádorových i nenádorových buněk. Pro každý použitý druh kondiciovaného média byla sestavena spektra specifická a zároveň dostatečně senzitivně indikující změny související s výskytem nádoru. V dalším kroku pak byly testovány neznámé vzorky obdobného typu. Lze konstatovat, že i ve fázi randomizovaného experimentu došlo ve 100 % případů k přesné identifikaci vzorku.

Tato studie demonstruje potenciál SERS a umělé inteligence konvolučních neuronových sítí pro budoucí klinické využití. Lze vyvozovat, že tato metodika by mohla být klíčem k rychlé detekci nádorů či monitoringu maligního onemocnění. Biologicky je ale nutno uvážit, že nádorové onemocnění je u každého pacienta do značné míry velmi individuální, a navíc se mění v čase vzhledem k tendenci mutovat v průběhu času. Přes úspěch dosažený v tomto experimentu nelze zaručit absolutní spolehlivost této metody a její užitnou hodnotu v klinické praxi. K etablování této metody na poli diagnostiky bude ještě nutno zvýšit počet různorodých vzorků pro ověření senzitivity a specifity tohoto postupu, a bude tedy i nadále potřeba rozsáhlé interdisciplinární spolupráce.

4.3 *Tematický okruh: Modelování nádorového mikroprostředí*

Jedním z největších rizikových faktorů pro vznik maligního melanomu je UV záření (Gandini et al. 2005; Leonardi et al. 2018). V publikaci I je testován vliv UV radiace na normální keratinocyty a jejich následná interakce s normálními a nádorově-asociovanými fibroblasty z melanomu od různých donorů. Keratinocyty byly pro tyto účely ozářeny UVB, a to buď mírnějším frakcionovaným ozařováním simulujícím chronickou intermitentní expozici ($3 \times 10 \text{ mJ/cm}^2$) nebo subletální dávkou simulující akutní zátěž (100 mJ/cm^2).

Nádorové mikroprostředí bylo v této publikaci modelováno pomocí insertového systému UVB-ozářených keratinocytů a neozářených fibroblastů. Bioaktivní látky produkované do kultivačního média v důsledku této kokultivace vytvořily kondiciované médium, které obsahovalo mediátory reakce na proběhlé poškození.

Výsledky ukázaly, že bioaktivní látky z kokultury UVB-ozářených keratinocytů a nádorově asociovaných fibroblastů z melanomu signifikantně podporují invazi melanomových linií.

Opakované ozáření nízkými dávkami UVB v této publikaci připomíná opakované vystavení nechráněné pokožky

slunci. Životaschopnost keratinocytů je zachována, ale i tato nízká dávka působí DNA poškození. Fibroblasty v dermis kůže komunikují s takto poškozenými keratinocyty parakrinní produkcí bioaktivních látek a z výsledků je patrné, že v případě výskytu ložiska melanomu podporují jeho schopnost invadovat.

Publikace V se zaměřuje na xenotransplantaci melanomových buněk na kuřecí chorioalantoidní membránu, jakožto komplexnější biologický model pro studium chování nádorových buněk.

In ovo tvoří transplantované buňky melanomu shluky na této membráně, které následně stimulují dostředivý růst cév do místa přihojení. Vzhledem k těmto vlastnostem je chorioalantoidní membrána tradičně používána jako vhodný nástroj pro studium vaskularizace a angiogeneze (Ribatti 2008; Nowak-Sliwinska et al. 2014; Burggren and Antich 2020).

Invaze nádorových buněk do stromatu chorioalantoidní membrány byla vzácná a histologicky byla potvrzena pouze u dvou vzorků ze 45. Omezení invazního potenciálu melanomových buněk může být způsobeno časovou restrikcí experimentu vynucenou rychlostí vývoje embrya kuřete nebo nepermissivními biologickými vlastnostmi této membrány. I

přes tyto limitace chorioalantoidní membrána kuřecího embrya nabízí v některých aspektech i nadále atraktivní *in vivo* biologický model pro studium chování melanomových buněk.

Původní článek VIII je zaměřen na hodnocení funkční diverzity fibroblastů při interakcích s buňkami melanomu.

Pro modelování diverzity dermálního mikroprostředí byly využity dva zdroje dermálních fibroblastů. Jednalo se o juvenilní fibroblasty z neozářené části kůže dítěte a fibroblasty z fotoexponované kůže seniorního dárce. Heterogenní sféroidy složené z buněk melanomu a z daného typu fibroblastů (v poměru 1:1) utvořené metodou visící kapky představovaly pak 3D model simulující ekosystém nádoru. Klíčovou metodou, která měla rozlišit chování různě aktinicky poškozených fibroblastů při vytváření mikroprostředí melanomu, byla single-cell RNA analýza.

Bioinformatická analýza primárních dermálních fibroblastů ze sféroidů ukázala, že oba typy fibroblastů lze shodně funkčně rozdělit do tří klastrů na základě jejich expresního profilu. První skupina, označovaná jako ECM-, byla bohatá na expresi genů pro prozánětlivé faktory, jako jsou cytokiny a chemokiny. Zároveň postrádala přeepsané geny zodpovědné za produkci extracelulární matrix. Druhá skupina ID+ obsahovala transkripty genů zodpovědných za diferenační a dediferenační procesy, které se objevují

v signální kaskádě superrodiny TGF β . Příkladem je gen ID1. Třetí skupina ECM+ představuje klasický náhled na fibroblasty jakožto producenty složek mezibuněčné hmoty. Tato skupina hojně transkribovala geny pro extracelulární matrix např. kolagen 1. Rozdělení na tři funkčně odlišné skupiny bylo zřetelnější u fotoexponovaných fibroblastů ze staršího pacienta.

Tato studie potvrdila, že dermální fibroblasty nejsou homogenní skupinou, ale místo toho obsahují několik samostatných subpopulací s rozdílným expresním profilem. Právě metoda single-cell RNAseq umožňuje zachytit i subtilnější či méně početné populace, které ale mohou mít velký regulační potenciál.

Endogenně a exogenně poškozené dermální fibroblasty (tedy změněné jak vlivem stárnutí, tak i UV ozáření) přispívají větší měrou k prozánětlivému prostředí, a stávají se tak důležitou komponentou určující charakter nádorového mikroprostředí. Jelikož jsou fibroblasty všude přítomnými buňkami, terapeutické cílení na celou populaci se obecně jeví jako riskantní a nereálný cíl. Hlubší znalosti heterogenity fibroblastů mohou představovat důležitý přínos a mohou mít dopad na vývoj nových přístupů v léčbě nádoru s cílením na jeden z klastrů s pro-nádorovým chováním.

4.4 *Tematický okruh: Mezibuněčná komunikace*

Přehledový článek VI se zaměřuje na interpretaci známých dat týkajících se vzniku kožního maligního melanomu a jeho následné diseminace, tedy rozsevu nádorových buněk do tkání a orgánů pacienta v průběhu progresu onemocnění.

Důležitou součástí přehledového článku je shrnutí hlavních způsobů mezibuněčné komunikace v nádorovém mikroprostředí kožního maligního melanomu v průběhu jeho progresu. Konkrétně je zaměřen na přímé mezibuněčné kontakty prostřednictvím kadherinů, dále na bioaktivní látky účastnící se parakrinní signalizace anebo na komunikaci využívající extracelulární tělíska – exosomy. Tyto membránové váčky by neměly být v nádorové biologii opomíjeny, jelikož je stále lépe dokladováno, že hrají v mikroprostředí nádoru nezanedbatelnou roli, jako jsme prokázali i v publikaci IX.

Publikace IX byla zaměřena na sledování vlivu exosomů izolovaných z buněk melanomu na funkční a fenotypové vlastnosti normálních lidských dermálních fibroblastů a nádorově-asociovaných fibroblastů izolovaných z maligního melanomu.

Z několika možných přístupů jsme pro dosažení optimálního výtěžku exosomů zvolili metodu ultracentrifugace s hustotním gradientem, která poskytuje dobrou výslednou kvalitu izolovaných exosomů (Duong et al. 2019). Po charakterizaci exosomů na základě velikosti, koncentrace a morfologie, byly exosomy využity k ovlivnění biologických vlastností uvedených typů fibroblastů (proliferace, adheze, migrace, invaze, expresní profil).

Transkriptomická analýza izolované RNA obou typů fibroblastů ovlivněných exosomy ukázala, že u nich dochází k reorganizaci genů pro extracelulární matrix, např. zvýšením exprese genů pro matrix metaloproteinázy. To koreluje s výsledky, kdy samotné fibroblasty, pod vlivem exosomů, zrychlují svou invazi kolagenovým gelem. Nádorově-asociované fibroblasty pod vlivem exosomů zvyšují expresi genů pro cytokiny a chemokiny, např. *IL-6* a *CXCL8*, čímž ustanovují prozánětlivý charakter nádorového mikroprostředí podporující progresi nádoru.

Hlavním výstupem této publikace tedy je, že tyto malé extracelulární váčky, izolované z buněk maligního melanomu, stimulují prozánětlivé chování nádorově-asociovaných fibroblastů a že změnou těchto vlastností podporují šíření nádoru.

5 Závěry

- Kůže je v průběhu života vystavována ultrafialovému záření a dalším fyzikálním, biologickým, či chemickým faktorům, které ji poškozují. Kumulativním působením těchto škodlivých vlivů dochází ke změnám na úrovni tkáně, buněk i jejich genetické informace. Aktinické poškození kůže UV zářením je jednou z hlavních příčin pro vznik maligního melanomu. Důvodem, proč je populačně u starších jedinců větší riziko vzniku nádorového onemocnění včetně melanomu, je právě kumulace poškození tkáně v průběhu stárnutí. To vede navíc k chronicky prozánětlivému ladění tkáňového mikroprostředí, které rozvoj nádoru usnadňuje. S věkem také současně klesá i schopnost organismu se mutacím aktivně bránit jejich opravou.
- Sekretom UV ozářených keratinocytů a nádorově-asociovaných fibroblastů zvyšuje invazi buněk melanomu ze sféroidů v kolagenovém gelu. Tento model poukazuje na synergii vlivu nádorového mikroprostředí a UV radiace na progresi maligního melanomu.

- Model heterogenních sféroidů složených z buněk melanomu a rozdílně aktinicky zatížených fibroblastů byl podroben single-cell RNA sekvenování a bioinformatické analýze. Z té vyplývá, že fibroblasty se v přítomnosti nádorových buněk rozdělují do klastrů na základě své genové exprese. Fakt, že stárnutí a stres plynoucí z poškození buněk je důležitým faktorem pro vývoj maligního onemocnění včetně melanomu, dokladuje i nález, že jeden z klastrů aktinicky poškozených fibroblastů významně exprimuje geny prozánětlivých mediátorů.
- Chorionální membrána kuřete je vhodným komplexním modelem pro studium nádorové neovaskularizace, ale při studiu invazivního chování maligního melanomu má tento přístup své určité limity.
- Exosomy hrají významnou roli v mezibuněčné komunikaci mezi nádorem a ostatními buňkami nádorového mikroprostředí. Stimulují prozánětlivé chování nádorově-asociovaných fibroblastů, čímž podporují nádorový růst.
- Časná detekce maligního melanomu představuje lepší prognózu pacienta. Z analýzy sér pacientů s maligním melanomem vyplývá, že je přítomnost primárního

nádoru významně spojena se sníženými hladinami IL-2, IL-13, RANTES a zvýšenými hladinami IL1RA, MIP-1 β a EGF. Progrese nádoru je stimulována IL-6 a IL-8, jejichž výskyt koreluje s nepříznivými hodnotami Breslowovy klasifikace.

6 Použitá literatura

- Burggren W., Antich M. R. (2020) Angiogenesis in the avian embryo chorioallantoic membrane: A perspective on research trends and a case study on toxicant vascular effects. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **7**, 1–18.
- Duong P., Chung A., Bouchareychas L., Raffai R. L. (2019) Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC) improves the isolation efficiency of extracellular vesicles. *PLoS One* **14**, 1–16.
- Gandini S., Sera F., Cattaruzza M. S., Pasquini P., Picconi O., Boyle P., Melchi C. F. (2005) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur. J. Cancer* **41**, 45–60.
- Leonardi G. C., Falzone L., Salemi R., Zanghi A., Spandidos D. A., Mccubrey J. A., Candido S., Libra M. (2018) Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int. J. Oncol.* **52**, 1071–1080.
- Nowak-Sliwinska P., Segura T., Iruela-Arispe M. L. (2014) The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* **17**, 779–804.
- Ribatti D. (2008) The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **49**, 131–135.

Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Jobe NP, Živicová V, Mífková A, Rösel D, Dvořánková B, Kodet O, Strnad H, Kolář M, Šedo A, Smetana K Jr, **Strnadová K**, Brábek J, Lacina L.

Fibroblasts potentiate melanoma cells in vitro invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. *Histochem Cell Biol.* 2018 May;149(5):503-516. (IF: 2.640) – **publikace I**

Strnadová K, Šandera V, Dvořánková B, Kodet O, Dušková M, Smetana K, Lacina L.

Skin aging: the dermal perspective. *Clin Dermatol.* 2019 Jul-Aug;37(4):326-335. (IF: 2.458) – **publikace II**

Kučera J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Lacina L, Krajsová I, Štork J, Kovářová H, Skalníková HK, Vodička P, Motlík J, Dundr P, Smetana K Jr, Kodet O.

Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncol Rep.* 2019 Nov;42(5):1793-1804. (IF: 3.417) – **publikace III**

Erzina M, Trelin A, Guselnikova O, Dvořánková B, **Strnadová K**, Perminova A, Ulbrich, P, Mareš, D, Jeřábek, V, Elashnikov, R, Švorčík, V, Lyutakov, O.

Precise cancer detection via the combination of functionalized SERS surfaces and convolutional neural network with independent inputs. *Sensors and Actuators, B: Chemical.* 2020 Apr 1;308. 127660. (IF: 7.335) – **publikace IV**

Strnadová K, Španko M, Dvořánková B, Lacina L, Kodet O, Shbat A, Klepáček I, Smetana K Jr.

Melanoma xenotransplant on the chicken chorioallantoic membrane: a complex biological model for the study of cancer cell behaviour. *Histochem Cell Biol.* 2020 Aug;154(2):177-188. **(IF: 4.304) – publikace V**

Kodet O, Kučera J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Štork J, Lacina L, Smetana K Jr.

Cutaneous melanoma dissemination is dependent on the malignant cell properties and factors of intercellular crosstalk in the cancer microenvironment (Review). *Int J Oncol.* 2020 Sep;57(3):619-630. **(IF: 5.65) – publikace VI**

Brábek J, Jakubek M, Vellieux F, Novotný J, Kolář M, Lacina L, Szabo P, **Strnadová K**, Rösel D, Dvořánková B, Smetana K Jr.

Interleukin-6: Molecule in the Intersection of Cancer, Ageing and COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 26;21(21):7937. **(IF: 5.923) – publikace VII**

Novotný J, **Strnadová K**, Dvořánková B, Kocourková Š, Jakša R, Dundr P, Pačes V, Smetana K Jr, Kolář M, Lacina L. Single-Cell RNA Sequencing Unravels Heterogeneity of the Stromal Niche in Cutaneous Melanoma Heterogeneous Spheroids. *Cancers (Basel).* 2020 Nov 10;12(11):3324. **(IF: 6.639) – publikace VIII**

Strnadová K, Pfeiferová L, Prikryl P, Dvořánková B, Vlčák E, Frýdlová J, Vokurka M, Novotný J, Šáchová J, Hradilová M, Brábek J, Šmigová J, Rösel D, Smetana K Jr., Kolář M, Lacina L.

Exosomes produced by melanoma cells significantly influence the biological properties of normal and cancer-associated fibroblasts. *Histochem Cell Biol.* 2022;157(2):153–172. **(IF: 4.304) – publikace IX**

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Kodet O, Němejcova K, **Strnadová K**, Havlínová A, Dundr P, Krajsová I, Štork J, Smetana K Jr, Lacina L. The Abscopal Effect in the Era of Checkpoint Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 4;22(13):7204. (IF: 6.208)

Španko M, **Strnadová K**, Pavlíček AJ, Szabo P, Kodet O, Valach J, Dvořánková B, Smetana K Jr., Lacina L. IL-6 in the Ecosystem of Head and Neck Cancer: Possible Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(20):11027. (IF: 6.208)

Erzina, M., A. Trelin, O. Guselnikova, A. Skvortsova, **K. Strnadova**, V. Svorcik, and O. Lyutakov. 2022. "Quantitative Detection of A1-Acid Glycoprotein (AGP) Level in Blood Plasma Using SERS and CNN Transfer Learning Approach." *Sensors and Actuators B: Chemical* 367:132057. (IF: 7.335)