

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2021

Bc. Aneta Kňávová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

***Kultivace primárních linií karcinomu
pankreatu***

Bc. Aneta Kňáková

Laboratoř Růstových Regulátorů

Vedoucí práce: prof. MUDr. Jiří EHRMANN, Ph.D.
Studijní program: Experimentální biologie

Olomouc 2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Kultivace primárních linií karcinomu pankreatu* vypracovala samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum

.....

podpis

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph. D., za jeho odborné vedení a za pomoc, cenné rady a ochotu, kterou mi během zpracování této práce věnoval.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Monice Levkové za odborný dohled v laboratoři, cenné rady a trpělivost během celého průběhu této práce. Mé velké díky také patří chirurgickému týmu z I. Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc.

OBSAH

1 ÚVOD	9
1.1 NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ.....	9
1.2 VZNIK NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ.....	9
1.2.1 Molekulární mechanismy vzniku nádorové přeměny.....	9
1.3 KANCEROGENNÍ FAKTORY.....	10
1.3.1 Fyzikální kancerogeny.....	11
1.3.2 Chemické kancerogeny.....	12
1.3.3 Biologické kancerogeny.....	13
1.4. KARCINOM PANKREATU.....	14
1.4.1. Incidence karcinomu pankreatu.....	15
1.4.2. Faktory vzniku.....	15
1.4.2.1. Věk.....	15
1.4.2.2. Pohlaví.....	16
1.4.2.3. Dědičné faktory.....	16
1.4.2.4. Životní styl.....	16
1.4.2.5. Pracovní prostředí.....	17
1.4.3. Molekulární a genetické příčiny vzniku karcinomu pankreatu.....	17
1.4.3.1. Gen K-ras.....	18
1.4.3.2. Gen p16.....	18
1.4.3.3. Gen p53.....	18
1.4.3.4. Gen DPC4.....	19
1.4.3.5. Gen HER2.....	19
1.4.3.6. Fanconiho anémie.....	19
1.4.4. Příznaky onemocnění.....	20
1.4.5. Diagnostické vyšetření.....	21
1.4.6. Léčba.....	22
1.5. BUNĚČNÉ KULTURY.....	23
1.5.1. Historie vzniku kultivace buněčných linií.....	23
1.5.2. Význam buněčných kultur.....	24
1.5.2.1. Význam v experimentální biologii.....	24
1.5.3. Limitace ve využití buněčných kultur.....	25
1.5.4. Rozdělení buněčných lidských kultur.....	25
1.5.4.1. Využití primárních nádorových linií.....	26
1.5.5. Tkáňové banky.....	27
1.5.5.1. Nádorové tkáňové banky.....	28
1.6. ORGANOIDY.....	29
1.6.1. Charakteristika organoidů.....	29
1.6.2. Nádorové pankreatické organoidy.....	30
1.6.3. Kultivační podmínky.....	32
1.6.3.1. Kultivace a barvení organoidů.....	32
1.6.3.2. Signální kaskáda Wnt.....	34
1.6.3.3. Wnt3a/Afamin.....	36
2 CÍL PRÁCE	37
3 MATERIÁL A METODIKA	38
3.1. PŘÍSTROJE, REAGENCIE A KULTIVAČNÍ MATERIÁL.....	38
3.1.1. Přístrojové vybavení.....	38
3.1.2. Laboratorní pomůcky.....	38
3.1.3. Reagencie a složení použitých médií.....	38
3.2. PROBANDI.....	39
3.3. ODBĚR BUNĚČNÉHO MATERIÁLU.....	39
3.4. POSTUP ZPRACOVÁNÍ NÁDOROVÉ TKÁŇE PANKREATU.....	40
3.5. KULTIVACE ORGANOIDŮ.....	41
3.5.1. Vyšetí organoidů.....	41

3.5.2. <i>Pasáž organoidů</i>	41
3.5.3. <i>Zamrazení organoidů</i>	42
3.6. VÝROBA PARAFÍNOVÉHO BLOKU A TKÁŇOVÝCH ŘEZŮ	42
3.7. HISTOLOGICKÉ BARVENÍ PREPARÁTŮ	42
3.7.1. <i>Základní barvení hematoxylin-eozin</i>	42
3.7.2. <i>PAS – Periodic Acid Schiff – průkaz polysacharidů</i>	43
3.7.3. <i>Hale – modifikace dle Mullera – průkaz kyselých mukopolysacharidů</i>	44
3.7.4. <i>Imunohistochemické barvení</i>	44
4 VÝSLEDKY	46
5 DISKUZE	61
6 ZÁVĚR	63

ABSTRAKT

Karcinom pankreatu je solidní, zhoubný nádor s velice nepříznivou prognózou. V České republice se nachází na druhém místě s incidencí 19/100 000 obyvatel za rok. Jde o onemocnění, které je zřídka vyléčitelné. Díky odběru nádorových buněk z resekovaných nádorů pacientů je možnost kultivovat trojrozměrné nádorové organoidové kultury, které mohou simulovat plné spektrum pacientova tumoru. Díky organoidům se může významně usnadnit práce při potvrzování či vyvracení aktuálních poznatků o mechanismech patogeneze, a taktéž mají podstatnou roli při vývoji nových léků, vakcín či jiných terapeutických prostředků. Tato práce si ve své praktické části klade za cíl úspěšné zvládnutí kultivace primárních kultur nádorových buněk karcinomu pankreatu, které mohou v budoucnu hrát významnou roli při specifické protinádorové léčbě a při testování potencionálních terapeutických cílů.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Pankreas, nádor, primokultury, organoidy, kultivace, Afamin, Wnt-dráha

ABSTRACT

TITLE: The cultivation of primary lines of pancreatic carcinoma

AUTHOR: Bc. Aneta Kňávová

DEPARTMENT: Laboratoř Růstových Regulátorů

SUPERVISOR: prof., MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

Pancreatic cancer is a malignant tumor with a very unfavourable prognosis. In the Czech Republic, it is in second place with an incidence of 19 / 100,000 inhabitants per year. It is a disease that is rarely curable. Thanks to the sampling of tumor cells from resected patients' tumors, it is possible to cultivate three-dimensional tumor organoid cultures that can simulate the full spectrum of a patient's tumor. Thanks to organoids, we can confirm or refute the current knowledge about the mechanisms of pathogenesis which can be significantly helpful. They can also play an essential role in the development of new drugs, vaccines or other therapeutic agents. In its practical part, this work aims to successfully master the cultivation of primary lines of pancreatic cancer cells, which may play an important role in future specific anticancer treatment and testing of potential therapeutic targets.

KEY WORDS: Pancreas, tumor, primary lines, organoids, cultivation, Afamin, Wnt signal pathway

1 ÚVOD

1.1 Nádorové onemocnění

Nádory jsou onemocnění, která jsou zde přítomná již několik milionů let. O tom se můžeme přesvědčit díky technologiím, jež byly schopny odhalit změny související se vznikem nádorového bujení ve zbytcích kostry dinosaura. Nádor je geneticky podmíněný útvar, typický svou klonální proliferací, která se vymknula kontrole. Nádory můžeme rozdělit na základě jejich biologického chování benigní, intermediární a maligní (Povýšil et al, 2001). Některé typy maligních nádorů se vyskytují často, jiné mohou naopak být velmi vzácné.

Benigní neboli nezhoubné nádory jsou typické poměrně pomalým a expanzivním růstem, přičemž stlačují okolní tkáň bez jejich podstatnějšího porušení. Definují se homologní stavbou. Nádorový parenchym je podobný tkáni, ve které vznikl. Tvoří pouzdro, které se vyvíjí z vlastního nádorového stromatu, nebo tlakem atrofované okolní tkáň. Díky tomuto pouzdru mohou být poměrně snadno chirurgicky odstraněny z organismu. Nezhoubné nádory nemetastázuji (Povýšil et al., 2001).

Intermediární neboli semimaligní nádory mají buněčný charakter zhoubného nádoru, avšak rostou výrazně pomaleji a netvoří metastázy (www.linkos.cz).

Maligní nádory jsou chorobným stavem, který je charakterizován nekoordinovaným růstem abnormálních buněk a jejich následným šířením do ostatních tkání, do mízního a krevního systému, a nakonec postižením vzdálených orgánů – metastázováním. Růst těchto abnormálních buněk probíhá autonomně, bez zásahů a regulace organismu, a děje se tak na úkor energetických a nutričních potřeb jeho normálních buněk (Konopásek, Petruželka 2003).

1.2 Vznik nádorového onemocnění

1.2.1 Molekulární mechanismy vzniku nádorové přeměny

Z hlediska molekulární onkologie jsou důležité především geny kódující proteiny zúčastněné v regulačních pochodech udržujících tkáňovou homeostázu.

Geny, které v případě poškození vedou k vzniku nádorové transformace můžeme rozdělit do 3 skupin. Kromě onkogenů (protoonkogenů) jde také o tumor supresorové geny (antionkogeny) a geny, které regulují apoptózu.

Protoonkogeny se nacházejí v genomové DNA a jejich fyziologickou úlohou je zejména regulace buněčné proliferace. Za normálních okolností tyto geny nemají bezprostřední vztah ke vzniku nádorového procesu. K rozvoji nádorového klonu dochází až poté, co tyto geny mutují nebo jsou jiným způsobem aktivovány v nevhodnou dobu a vzniká promitotický signál. U protoonkogenů stačí pro vznik aktivního onkogenu mutace jen v jedné alele z celkového počtu dvou, a onkogen je schopen nádorové transformace. Takový genotypový projev onkogenů je označován jako dominantní.

Opačnou roli hrají nádorové supresory, jejichž produkty jsou negativní regulátory buněčného dělení a inhibují nádorovou transformaci. Může však dojít k jejich inaktivaci, a to v případě že jsou vyřazeny jejich obě funkční alely.

Na růstu nádorových buněk mají velký podíl také buňky, které částečně nebo úplně ztratily schopnost sebedestrukce neboli apoptózy/programované buněčné smrti a nyní dochází k jejich nekontrolovatelné proliferaci.

Mimo tyto zmíněné tři skupiny genů, které regulují vznik a zánik buněk, mají důležitou roli v procesu kancerogeneze také reparační geny. Jde o geny, které mají schopnost opravovat změny v poškozené DNA. Jejich selhání umožňuje rozvoj aberací DNA zodpovědných za vznik nádorových heterogenních buněčných populací. Nádorová transformace předpokládá nevratnou ztrátu kontroly nad buněčným dělením na základě opakovaných poškození klíčových genů při selhání DNA reparačních mechanismů (Petruželka, Konopásek 2003).

1.3 Kancerogenní faktory

Kancerogenní faktory jsou faktory zevního prostředí, které se podílejí na vzniku zhoubných nádorů. Jde o látku nebo faktor, který vyvolává nebo významně zvyšuje riziko zhoubného bujení a schopnost vyvolat změny v DNA – mutace. Zhoubné nádory jsou výsledkem několika po sobě jdoucích mutací a celý proces je

vícestuňový. Dále do skupiny kancerogenních faktorů můžeme zařadit kokarcinogeny, tzv. promotory, které schopnost vyvolávat změny v genetické informaci DNA nemají, avšak jsou schopny prohlubovat již existující genetické změny a zrychlit průběh vzniku nádoru. Na rozvoji nádorového onemocnění se může podílet celá řada faktorů zevního prostředí. Tyto faktory můžeme rozdělit dle jejich vlastností na fyzikální, chemické a biologické. Dle odhadů, by snížení expozice karcinogenním faktorům vedlo až 33 % poklesu úmrtí na nádory (Petruželka, Konopásek 2003).

1.3.1 Fyzikální kancerogeny

Mezi nejvýznamnější fyzikální faktory patří především ionizující záření a ultrafialové záření (Klener, 2002). Vliv ionizujícího záření byl prokázán po objevení rentgenových paprsků, především díky zvýšenému nárůstu leukémií a kožních nádorů. Zvýšený počet leukémií byl zjištěn také u lidí, kteří byli delší dobu ozařováni. Poměrně nedávným příkladem může být havárie Černobylské jaderné elektrárny (1986). Kancerogenní účinky má také UV záření. Zde však hraje podstatnou roli vlnová délka, která určuje intenzitu kancerogenních účinků. Mezi záření s nejslabšími účinky patří UVA. Vlnová délka UVA je 320 – 400nm a je dána tvorbou kyslíkových radikálů. Poškození DNA UVA zářením je druhotné. Oproti tomu UVB s vlnovou délkou 290 – 320nm a UVC s vlnovou délkou 240 – 290 nm má schopnost přímo poškozovat DNA. Důsledkem je vznik bodových mutací. Ty mohou aktivovat vybrané onkogeny a alterovat supresorové geny. Může také negativně ovlivňovat nádorovou imunitu (Klener, 2002). Bylo prokázáno, že některá spektra ultrafialového záření jsou zodpovědná při dlouhodobé i krátkodobé expozici za vznik různých kožních malignit a pigmentových nádorů – melanomů (Petruželka, Konopásek, 2003.)

Mechanismus účinku vychází z přenosu energie ionizací atomů a molekul, včetně podráždění nukleotidových bází v DNA, což má za následek přímé poškození (Klener, 2002). Nejčastěji je toto poškození ve formě chromozomálních zlomů, případně může docházet k ionizaci, což ve vodném prostředí buňky znamená

vytvoření hydroxylových a vodíkových radikálů, které následně mohou vyvolat nepřímé poškození – mutace, zlomy (Petruželka, Konopásek, 2003).

1.3.2 Chemické kancerogeny

Kancerogenní účinky chemických látek byly popsány již v 18. století chirurgem P. Pottem, který si všiml zvýšeného výskytu karcinomu varlat u kominíků, kteří byli vystaveni působení kouřových zplodin (Petruželka, Konopásek, 2003.) Dnes existuje více než půl milionu chemických látek tvořících součást životního prostředí a asi u osmi set z nich byl prokázán karcinogenní účinek (Koutecký, 1989).

Ke karcinogenům zevního prostředí zařazujeme především těžké kovy, arsen a polycyklické aromatické uhlovodíky. Právě polycyklické aromatické uhlovodíky můžeme považovat za nejnebezpečnější skupinu chemických kancerogenů. Nacházejí se především v tabákovém kouři, dehtu, výfukových plynech, průmyslu ale i například v uzeninách (Klener, 2002).

Neméně významné jsou i nitrosaminy, které jsou obsažené v uzených a smažených potravinách (Petruželka, Konopásek, 2003). Kromě přímého vstupu do organismu je zásadní především jejich sekundární tvorba. V žaludeční šťávě se uvolňuje z dusitanu sodného kyselina dusitá a ta reaguje se sekundárními aminy v potravě. Výsledkem této reakce jsou právě nitrosaminy. Z této skupiny je významná především nitrosomethylurea, která způsobuje nádory trávicího ústrojí u zvířat. Chemickou obměnou poté vznikají nádory i v jiných tkáních a orgánech (Koutecký, 1989).

Alifatické karcinogeny jsou skupinou, z níž nejvýznamnější yperit a jeho deriváty, uretan, vinylchlorid, DDT, jsou také schopny vyvolat nádory různého druhu (Koutecký, 1989). Kancerogenní účinek má i celá řada prvků, které jsou součástí anorganických látek – Cd, Be, Ni, Cr, Co. Působení Ni a Cr se uplatňuje především při inhalaci prachu. Příkladem může být zpracování rud, či dalších pracovních úkonech (Koutecký, 1989).

Podstatné je však zmínit, že zatímco u zvířat byl karcinogenní účinek výše zmíněných látek ověřen, u člověka existují pouze nepřímé důkazy vycházející z různých epidemiologických studií (Petruželka, Konopásek 2003.) Lidský organismus obsahuje řadu reparačních mechanismů, které jsou schopny do určité míry poškození opravit. Důsledkem oslabení těchto mechanismů, případně kumulací genetických změn může tedy docházet k projevům chemických karcinogenů. Následné projevy u pacientů se mohou lišit, důsledkem odlišné doby latence mezi vlivem karcinogenu a vznikem nádorového bujení. Existuje také řada endogenních karcinogenů. Mezi ně můžeme zařadit například steroidní hormony – především estrogeny a androgeny, které mají vliv na růst nádorů, které jsou hormonálně vázané. Přestože hormony mají vliv na kancerogenezi, nebyly však u nich prokázány mutagenní účinky (Klener, 2002).

1.3.3. Biologické kancerogeny

Příkladem biologických karcinogenů mohou být produkty různých plísní. Například Aflatoxin, který je produktem plísně *Aspergillus flavus*, může při špatném uložení kontaminovat potraviny a může být zodpovědný za vznik nádoru jater. Nejvíce postiženi jsou lidé žijící v oblastech Číny a Afriky (Petruželka, Konopásek 2003).

Avšak do skupiny biologických karcinogenů patří především viry. Přestože DNA a RNA viry nejsou sice schopny přímo vyvolat nádorový proces, podílejí se na jeho vzniku, a to až v patnácti procentech. RNA viry s nádorovým účinkem řadíme mezi retroviry (Klener, 2002). Nádory vyvolané retroviry jsou značně rozšířené – postihují jak ptáky (především kur domácí), tak i savce (hlodavce, kočky, primáty, ...). Nádorové bujení má nejčastěji podobu leukémie či maligních lymfomů (Koutecký, 1989). Pokud dojde ke kontaktu eukaryotické buňky a onkogenního retroviru, dochází ke vniknutí virové částice do buňky a k uvolnění virové RNA. Tato informace je následně přepsána pomocí virové reverzní transkriptázy do komplementární DNA, čemuž se říká provirus. Provirus je poté transportován do hostitelských chromozomů pomocí DNA polymerázy, díky níž také došlo k syntéze dvouvláknové DNA. Provirus může zůstat v buňce různě dlouhou dobu v tzv.

latentní fázi, než dojde k jeho aktivaci. Retroviry můžeme rozdělit podle jejich schopnosti vyvolat nádorové onemocnění, a to na pomalu transformující retroviry a rychle transformující retroviry, přičemž se od sebe liší odlišnými typy genových sekvencí (Klener, 2002). DNA viry mají karcinogenní účinek také díky onkogenům, onkogeny však nejsou odvozeny od normálních buněk. Principem onkogenů DNA virů je kódování specifických proteinů, které reagují s regulačními molekulami (Klener, 2002).

V současnosti jsou jednoznačně prokázány vazby mezi virovou infekcí a nádorovým onemocněním patří zejména viry: HTLV-I (human T-cell Leukemia Virus) u T-buněčné leukemie dospělých, HBV, HCV (Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus) u hepatocelulárního karcinomu, EBV (Epstein-Barr Virus) u Burkittova lymfomu a HPV (Human Papilloma Virus) u karcinomu děložního čípku (Petruželka, Konopásek 2003).

Dále se mezi biologickými karcinogeny můžeme setkat s bakteriemi a parazity. Co se týče nádorových onemocnění, které jsou vyvolané bakteriemi, dochází k nim spíše vzácněji. Jedním z příkladů může být *Helicobacter Pylori*. Tato bakterie působí při vzniku maligních lymfomů žaludku a při karcinomu žaludku. U parazitů se můžeme setkat s krevničkami, jejichž metabolismus produkuje škodlivé nitrozosloučeniny. Ty mohou následně způsobovat karcinomy močového měchýře (Klener, 2002).

1.4. Karcinom pankreatu

Karcinom pankreatu je vysoce zhoubný, nádor, který má velice nepříznivou prognózu. Nejčastěji jde o solidní adenokarcinom (CaP) (Ryska et al, 2015). Většina CaP se vyvíjí v oblasti hlavy slinivky, a to až v 70 %. V těle slinivky se potom nachází přibližně 15 %, a zbývajících 5 % připadá na oblast ocasu slinivky. Velmi ojediněle se můžeme setkat s nádorovým bujením postihujícím celou oblast pankreatu (Zeman et al, 2001). Morfologicky se nachází ve formě skirhotické a medulární. Mikroskopicky potom jde o tubulární nebo solidní adenokarcinom a často prorůstá jak do žlučového systému, tak i do cév (Mařatka, 1999). Karcinom hlavy slinivky

může tak být někdy velmi těžko rozlišitelný od karcinomu vycházejícího ze žlučového systému.

1.4.1. Incidence karcinomu pankreatu

Česká republika se v Evropě nachází na druhém místě, co se týče výskytu karcinomu pankreatu (www.mou.cz). V západním světě dosahuje průměrná incidence kolem 8/100 000 obyvatel za rok. V České republice se incidence pohybuje kolem 15 až 19/100 000 obyvatel za rok. Počet lidí postižených nádorem slinivky břišní neustále roste a mortalita se prakticky rovná incidenci, jelikož pětileté přežití pacientů je menší než 5 %. Hlavní příčinou nepříznivé prognózy je fakt, že toto onemocnění je v době diagnózy generalizované až u 85 % pacientů (Lowenfels, 2006). Každým rokem je u nás zaznamenáno přes 2000 nových případů. Více postiženými jsou muži, a to v poměru 2:1 se ženami. Průměrný věk onemocnění je 60 let (<https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/06/03.pdf>). Poměrně vzácně se vyskytuje karcinom pankreatu u mladších jedinců. Incidence dosahuje maxima v populaci starší 75 let, kde bylo zjištěno více než 100 případů onemocnění na 100 000 obyvatel (Mařatka, 1999). Po nádorech plic a tlustého střeva je karcinom pankreatu na třetím místě v příčinách smrti mezi 35 – 54 roky života (Reber, 1998). Obecně je potom na 4. místě v nejčastějších nádorových onemocněních. Odhaduje se, že průměrně na toto onemocnění umírá každý rok 250 000 pacientů (Lowenfels, 2006).

** epidemiologie nádorových onemocnění je samostatný vědní obor, který sbírá a provádí analýzy údajů, které se týkají incidence a úmrtnosti na maligní nádory ve velkých populačních skupinách. Jejím cílem je ukázat na rozdíly v jednotlivých zkoumaných parametrech, dále pomáhat v hledání příčin současné situace a odhadovat budoucí vývoj a progresi choroby. Další důležitou součástí epidemiologie je možnost zhodnotit efektivitu léčby (Petruželka, Konopásek, 2003).*

1.4.2. Faktory vzniku

1.4.2.1. Věk

Karcinom pankreatu se vyskytuje především u starších lidí. U osob mladších 30 let se toto onemocnění vyskytuje velmi ojediněle. V České republice incidence

ve věkových skupinách narůstá se zvyšujícím se věkem až do hodnoty 1,47 u pacientů ve věku do 40 let. U osob mladších 60 let je to až k hodnotám 22,3. Nejvyšší incidence dosahuje ve věkových skupinách starších 60 let. V USA je medián u pacientů ve věku 71 let (Kollárová et al, 2006).

1.4.2.2. Pohlaví

Existují studie, které poukazují na to, že karcinom pankreatu je více běžný u mužského pohlaví než u ženského. Příkladem jsou výsledky studie z USA, které ukazují výsledky mezi muži a ženami ve věkové skupině 40 až 59 let, kde poměr byl 1,7:1,0. U skupiny pacientů s věkem na 70 let byl tento poměr 1,3:1,0. Podobné výsledky jsou i v České republice, kde se karcinom pankreatu vyskytuje častěji u mužů. Existují však i studie, které vliv pohlaví na toto onemocnění vyvracejí (Kollárová et al, 2006).

1.4.2.3. Dědičné faktory

Přestože vliv hereditárních faktorů ještě není zcela objasněn, existují studie, které na jejich vliv poukazují. Při výskytu tohoto onemocnění u příbuzných prvního stupně se předpokládá až trojnásobné riziko vzniku v 5 % případů. Karcinom pankreatu však může být i součástí různých syndromů, jako je například autozomálně dominantně dědičná hereditární pankreatitida, Li-Fraumeni syndrom, hereditární syndrom nádorů prsu nebo Lynchův syndrom (Kollárová et al, 2006).

1.4.2.4. Životní styl

Životní styl můžeme zařadit mezi rizikové faktory ovlivnitelné. Jeden z nejvýznamnějších faktorů této skupiny je určitě kouření. Výše rizika se pohybuje v závislosti na délce kouření a počtu vykouřených cigaret. Bylo zjištěno, že kouření dýmky a doutníků toto riziko zvyšuje až dvojnásobně. Kouření produktů z konopí až trojnásobně. Kouření patří mezi jediný prokázaný rizikový faktor, který se na základě různých studií podílí na vzniku karcinomu pankreatu až u 20 % (Kollárová, 2006).

Dalším rizikovým faktorem je nezdravá výživa. Významný je především vysoký příjem živočišných tuků a cholesterolu, jež mají za následek zvýšený

energetický příjem. Podle japonské studie bylo zjištěno, že vysoký příjem masa může zvýšit riziko vzniku karcinomu pankreatu, přičemž je také dbán důraz na způsob tepelného zpracování. Smažení, či grilování masa může potencionálně zvýšit riziko vzniku karcinomu, jelikož při tomto druhu zpracování dochází k pyrolýze bílkovin, která má za následek vznik látek, které jsou považovány za karcinogenní.

Dalším zmíněným faktorem je například konzumace kávy a alkoholu. Přestože konzumace kávy se neprokázala být významným rizikovým faktorem, v kombinaci s kouřením může docházet k zvýšenému výskytu karcinomu pankreatu. Naopak prokazatelně škodlivým faktorem je alkohol. V některých studiích se zvýšené riziko vyskytovalo především u pacientů, kteří za den zkonsumovali vyšší počet alkoholických nápojů, tzn. více než 6 nápojů za den (Kollárová et al, 2006.)

1.4.2.5. Pracovní prostředí

Přestože pracovní prostředí jako rizikový faktor není příliš významný, některé výsledky studií vykazují vyšší výskyt karcinomu pankreatu u profesí v chemickém průmyslu, ve stavebnictví, v textilním průmyslu, v gumárenském průmyslu, při zpracování dřeva nebo v zahradnictví při práci s herbicidy. V některých případech byl nárůst zaznamenán i v automobilovém průmyslu, a to především u automechaniků, kteří byli exponováni krokydolitů.

1.4.3. Molekulární a genetické příčiny vzniku karcinomu pankreatu

Karcinom slinivky břišní je z molekulárního hlediska primárně genetické onemocnění – protože v průběhu onkogeneze dochází k akumulaci alterací v onkogenech, tumorsupresorových genech a genech udržujících neporušený genom (Wilentz et al, 2000). Více než desetina karcinomů pankreatu vzniká v důsledku vrozené predispozice. Za tu odpovídá řada genů – BRCA2, CDKN2A, LKB1 a PRSS1. Podobně jako ostatní karcinomy vzniká nádor slinivky postupnou progresí z neinvazivních prekursorů, které jsou nazvány PanIN (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia). Tyto prekurzory společně s IPMN (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms) a MCN (Mucinous Cystic Neoplasms) tvoří skupinu lézí

s maligním potenciálem. Vedle známých mutací v genech K-ras, CDKN2A, p53 a DPC4 je velmi významná i studie role genů signální dráhy Fanconiho anémie (viz. níže). Znalost specifických genetických alterací hraje významnou roli v stanovení včasné diagnostiky a následně aplikaci cílené terapie (Hucl, Špičák 2009).

1.4.3.1. Gen K-ras

Nejčastěji mutovaným onkogenem je KRAS2. Somatické mutace v genu KRAS2 se objevují až u 95 % pacientů s duktálním adenokarcinomem pankreatu (Hucl, Špičák 2009). Jeho produktem je GTP vázající protein, který je asociovaný s buněčnou membránou a zprostředkovává přenos v systému proteinkinázových kaskád. Tato signální cesta má vliv na rychlost BC. Mutací genu v exonu 12, kterou způsobí záměna AMK glycinu za valin či aspartát, dochází ke ztrátě GTP-ázové funkce proteinu, a protože je protein neustále aktivní, tak přenáší signál. Buňka je tudíž neustále stimulována k růstu a dělení (www.wikiskripta.eu).

1.4.3.2. Gen p16

CDKN2A gen (p16) je inaktivován u všech adenokarcinomů mutacemi, homozygotními delecemi či utlumením transkripce metylací promotoru (Schutte et al, 1997). K inaktivacím dochází již v časných stádiích karcinomu pankreatu. Produkt tohoto genu je protein schopný regulovat BC v G1 fázi, čímž cyklus zastaví. Jeho absence tudíž vede k nekontrolovatelnému buněčnému růstu (www.wikiskripta.eu).

1.4.3.3. Gen p53

Gen p53 je mutovaný u 50-75 % (Pellegata et al, 1994). Poškození tohoto tumorsupresorového genu se vyskytuje až v pozdějších stádiích karcinomu pankreatu. Jeho proteinový produkt ovlivňuje BC tak, že pokud je poškozená DNA buněčný cyklus zastavuje až do jejího opravení. V případě, že oprava není možná, navozuje apoptózu. Poškození p53 má za následek jeho nadměrnou expresi (www.wikiskripta.eu).

1.4.3.4. Gen DPC4

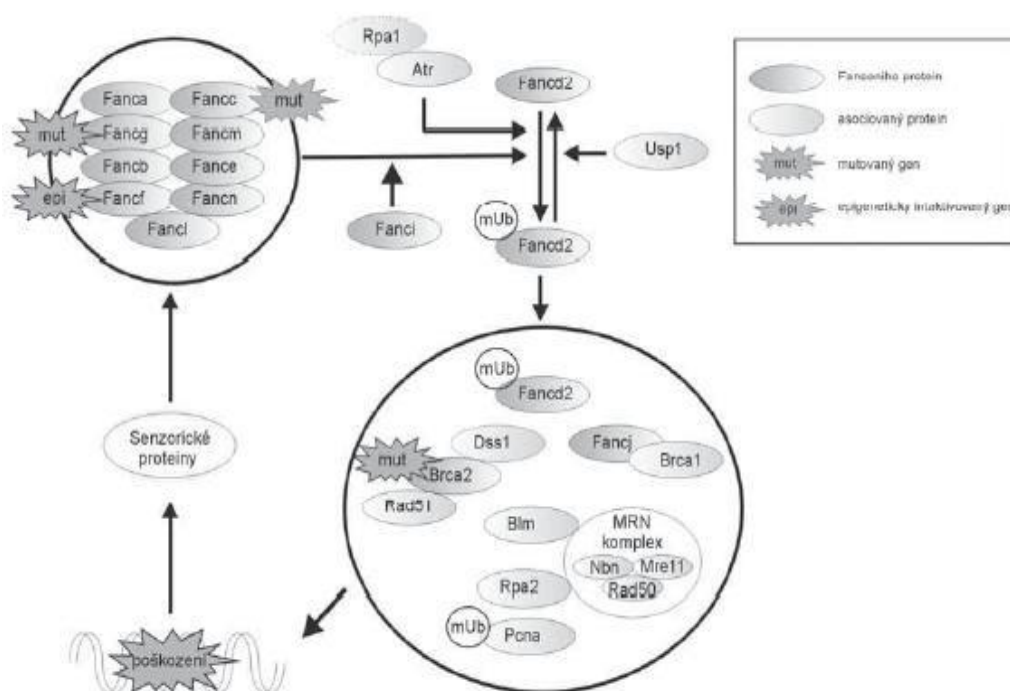
U genu DPC4 je typická delece v pozdějším stádiu vývoje karcinomu. Proteinový produkt se podílí na řízení signálních drah růstových faktorů TGF- β . Ty regulují BC tak, že jej tlumí, až dojde k jeho zástavě, případně apoptóze. Při absenci tohoto produktu dochází tedy k nádorovému bujení (www.wikiskripta.eu).

1.4.3.5. Gen HER2

U onkogenu HER2 často dochází k jeho amplifikaci a následně zvýšené expresi produktu EGF. EGF je transmembránový glykoproteinový receptor s vlastní tyrosinkinázovou aktivitou. U karcinomu pankreatu se projevuje především zvýšeným množstvím ligandů pro tento receptor (www.wikiskripta.eu).

1.4.3.6. Fanconiho anémie

Fanconiho anémie je onemocnění na němž se patogeneticky podílí minimálně 13 genů. Mutace v těchto genech mají za následek vzácnou recesivní chorobu charakterizovanou abnormalitami skeletu. Poškození některých z těchto genů se může vyskytovat také u solidních nádorů v běžné populaci – konkrétně geny FANCC a FANCG z této skupiny jsou mutovány u karcinomu pankreatu. Mutace v genu BRCA2/FANCD1 je přítomna taktéž u pacientů karcinomu pankreatu, ale také prsu, ovarií a dalších orgánů



Obr. 2. Signální dráha Fanconiho anémie
Fig. 2. Fanconi anemia signaling pathway

Obr. 1 – Fanconiho anémie. Dostupné z: <https://www.csgh.info/cs/clanek/molekularni-patogeneze-karcinomu-pankreatu-377>

1.4.4. Příznaky onemocnění

Klinické příznaky závisí především na lokalizaci nádoru a na jeho velikosti. Časná stádia karcinomu jsou většinou bez větších příznaků, a pokud se nějaké symptomy objeví, jsou většinou atypické a pacient je může chybně považovat za dietní chybu (Klener, 2002). V počátečním období u karcinomu hlavy pankreatu lze pozorovat nechutenství, odpor k jídlu, nevolnost, nebo zvracení. Častým příznakem je poté bolest. Ta bývá nezávislá na příjmu potravy a může být velmi intenzivní. Má trvalý ráz, a k jejímu zhoršení dochází především v poloze na zádech, propaguje se do levého podbřišku anebo do zad. Pokud dojde k útlaku choledochu důsledkem rostoucího nádoru, objeví se ikterus neboli žloutenka. Ten může být doprovázen svěděním - pruritem, popřípadě klinickým obrazem zánětu žlučových cest - cholangitidy. Může dojít k zvětšení žlučníku, jater, popřípadě se vytvoří ascites,

který je většinou již projevem metastázování. Karcinom těla a ocasu pankreatu provází velké bolesti. Vzácně se v pozdějším období může objevit i žloutenka (Koutecký, 1989). Ta bývá doprovázena nechutenstvím, návaly na zvracení, jílovitou stolicí, tmavě hnědou močí a někdy i svěděním pokožky. Častý je úbytek hmotnosti, a to i v průměru 10 kg (Skála, online). Častější bývají komprese velkých cév rostoucím nádorem, které mohou způsobit trombózu slezinné a portální žíly. Následkem může být až vznik syndromu portální hypertenze, který může být zdrojem fatálního krvácení. U cca 20 % pacientů můžeme sledovat i přidružený diabetes mellitus. Při fyzikálním vyšetření lze téměř u 50 % pacientů zjistit Curvoisierovo znamení (charakterizováno žloutenkou s hmatatelným žlučníkem). V laboratorním vyšetření lze nalézt vysokou sedimentaci, u pokročilých nádorů je v séru zvýšen karcinoembryonální antigen (CEA), při cholestáze vyvolané nádorem lze pozorovat zvýšený bilirubin, alkalickou fosfatázu a GGTP v séru (Koutecký, 1989).

1.4.5. Diagnostické vyšetření

Karcinom pankreatu lze vyšetřit především ultrazvukovým vyšetřením a CT. Omezením ultrasonografického vyšetření je rozlišitelnost časných lézí velikosti 1 – 1,5 cm a citlivost tohoto vyšetření dosahuje 70 %. Avšak v současné době se upřednostňuje především spirální CT vyšetření. To umožňuje 3D rekonstrukci včetně zobrazení cév. Podobných výsledků je možné dosáhnout při použití endoskopické ultrasonografie. Komplementární vyšetřením je potom ERCP, neboli endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie.

Obecně je však včasná diagnóza karcinomu slinivky poměrně vzácná, a to především kvůli dlouhému asymptomatickému průběhu. Většinou jde o náhodné zachycení než o výsledek primárně cíleného vyšetření (Petruželka, Konopásek, 2003). Karcinom pankreatu tak nesmíme totiž chápat jako „pouhé“ lokoregionální onemocnění, ale jako onemocnění systémové protože v době stanovení diagnózy má již více jak třetina pacientů různé jaterní sekundarity, třetina pacientů projevuje známky angioinvaze a desetina pacientů diseminaci na peritoneu. Nádor se šíří nejen lymfaticky, ale i perineurálně (Lowenfels, 1999).

1.4.6. Léčba

Karcinom pankreatu je onemocnění, které je jen velmi obtížně vyléčitelné. Největší šanci mají pacienti, u kterých je karcinom lokalizovaný pouze v pankreatu. Avšak toto stádium je bohužel zachyceno u méně než 20 % případů. (Denemark, 2005). Jedinou potencionálně kurativní léčebnou metodou u adenokarcinomu je radikální chirurgická resekce se standartní lymfadenektomií s přidruženou chemoterapií (Alexakis et al, 2004). Ale i u resekovaných pacientů se však medián pohybuje mezi 11 až 26 měsíci s pětiletým přežitím 15-25 % po pankreatoduodenektomii a 8 – 14 % po levostranné resekcii. U neoperovaných pacientů je to pouze třetina této doby (Carrato et al, 2015). U méně časných lokalizací v těle a ocase pankreatu je většinou potřeba použít jiného přístupu. Jelikož je zde provedena diagnóza již v pokročilém stádiu, není obvykle radikální výkon proveditelný. Namísto toho se většinou provádí pouze paliativní chirurgický výkon, který odstraňuje ty nejzávažnější obtíže, a to především biliární obstrukci nebo obstrukci duodena. Dalším velmi účinným opatřením je zprůchodnění žlučových cest zavedením stenu.

Další možnou léčbou je využití radioterapie nebo chemoterapie. U lokálně pokročilých karcinomů může radioterapie přinést komplexní efekt (Petruželka, Konopásek, 2003). Radioterapii je možné využít u nádorů slinivky břišní v adjuvantní, neoadjuvantní i paliativní indikaci. Okrajově se využívá intraoperační radioterapie (IORT), při které je ozařováno přímo lůžko tumoru ihned po resekcii při laparatomii a tato dávka záření se doplní pooperační konformní 3D zevní radioterapií. Limitujícím faktorem pro radioterapii je však uložení pankreatu v těsné blízkosti radiosenzitivních orgánů (tenké střevo, žaludek, játra, ledviny a mícha) (Halámková et al, Remedia, 2011). Účinnost chemoterapie je potom z hlediska lokálního účinku menší než radioterapie (Petruželka, Konopásek, 2003.) To především z toho důvodu, že karcinom pankreatu je chemorezistentní onemocnění, a přestože je chemoterapie doporučována, má v tomto případě poměrně malý efekt. Přesto i přes svoji chemorezistenci je u nádoru slinivky chemoterapie doporučována, a to hlavně pro pacienty, kteří prošli kompletní resekcí (Halámková et al, Remedia, 2011). Přestože je regrese tumoru minimální,

Ize alespoň dosáhnout zkvalitnění života pacienta. Nejčastější chemoterapeutika byla donedávna využívaná kombinace 5-fluorouracilu s leukovorinem (FUFA), nyní se však do popředí dostává především gemcitabin (Konopásek, Petruželka, 2003). U pacientů s lokálně pokročilým či s metastatickým karcinomem pankreatu bylo na základě studie a metaanalýzy, že se pozitivně jeví kombinace GEMCAP (gemcitabin/kapecitabin) (Cunningham et al, 2009). U lokálně pokročilých karcinomů je poté možné využít i kombinaci radiochemoterapie (Petruželka, Konopásek, 2003).

V posledních letech se však velmi osvědčuje tzv. cílená léčba, někdy také označována jako biologická léčba. Je specificky mířená proti některým molekulárním reakcím v buňce. Tyto reakce jsou většinou nutné k spuštění a udržení nádorového růstu. Biologická léčba je však velice ekonomicky nákladná, proto se její indikace vždy pečlivě zvažuje s ohledem na přínos pro daného pacienta (Halámková et al, 2003).

1.5. BUNĚČNÉ KULTURY

1.5.1. Historie vzniku kultivace buněčných linií

První pokusy kultivace proběhly roku 1885, kdy se zoologovi Georgeovi Rouxovi podařilo ve fyziologickém roztoku udržet živé kuřecí embryonální buňky. Přesto však nebyl schopný udržet buňky tak, jak to lze nyní v podmínkách *in vivo*. Na konci 19. století proběhl pokus, během něhož se podařilo buňky zmrazit a následně rozmrazit. To následně našlo uplatnění u inseminaci dobytka. Tkáňové kultury byly však objeveny až na počátku dvacátého století a našly využití jako metody pro studium chování živočišných buněk. Tato technika byla nejprve provedena s drobnými fragmenty tkáně. Avšak vzhledem k tomu, že tkáň nebyly dostatečně natrávené, růst buněk byl značně omezený a docházelo pouze k migraci buněk z kousíčků tkáně. Tato technika se následně používala více jak 50 let (Freshney, 2005). Na přelomu 19. a 20. století se R. Harrisonovi povedlo z nervové tkáně z žabích embryí, které uzavřel do komůrky s lymfou žáby, vykultivovat nově vytvořené axony (wikiskripta.eu). Touto technikou vzbudil zájem o kultivaci *in vitro*. V roce 1912 se povedlo francouzskému lékaři a laureátovi

Nobelovy ceny A. Carrelovi vložit do živného média kus kuřecího srdce. Buňky ze srdce vydrželi v kultivační nádobě 27 let (Vejražka, 2005). Následně se pozornost upnula spíše k savcům. Jejich tkáně v kulturách dobře rostly a byly snadno dostupné. Další výhodou těchto tkání byla jejich schopnost poskytnout buněčné linie, které mohly neomezeně proliferovat (Freshney, 2005). Významným milníkem byl počín dvou vědců L. Hayflicka a P. Moorheada, kterým se v roce 1961 povedlo úspěšně provést experiment s dělením lidských fibroblastů kultivovaných *in vitro* a následně zastavit jejich mitotickou aktivitu (Hayflick, Moorhead 1961). Později byly provedeny podobné experimenty na dalších typech buněčných kultur. Lidské nenádorové buňky mohou prodělat v průměru až 50 buněčných cyklů v *in vitro* prostředí a toto omezení buněčné proliferace *in vitro* dostalo název Hayflickův limit. Oproti tomu nádorové buňky je možné kultivovat neomezeně dlouhou dobu - důkazem mohou být linie buněk HeLa, které se udržují kultivací již přes 60 let (wikiskripta.eu).

1.5.2. Význam buněčných kultur

Buněčné kultury jsou dnes jedním z hlavních nástrojů, které využívají přírodní vědy v základním i aplikovaném výzkumu či výrobě. Ve výzkumu mají své uplatnění především jako zdroj materiálu pro pokusy. Významné postavení mají například hybridomové kultury, a to konkrétně při výrobě monoklonálních látek. Využití buněčných kultur je však uplatňováno i při dalších procesech, například při výrobě bílkovinných molekul či peptidů (Davis, 2002).

1.5.2.1. Význam v experimentální biologii

Co se týče využití kultur v experimentální biologii, existuje zde řada výhod v porovnání s jinými biologickými modely jako jsou třeba laboratorní zvířata nebo izolované orgány a tkáně. Mezi tyto výhody patří například i to, že pokusy probíhají na jednom, dobře charakterizovaném buněčném typu a výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými tkáněmi či orgány. Další výhodou je také fakt, že mnoho buněčných linií lze velmi snadno kultivovat a během krátké doby lze získat velké množství přesně definovaného homogenního materiálu, což bývá většinou v porovnání s jinými biologickými modely obtížné. V rámci experimentální biologie

bývají tyto vykultivované buňky využívány i k pokusům, při kterých dochází k jejich zničení – tím se lze elegantně vyhnout etickým problémům, které by mohly nastat v případě takových pokusů na zvířecích modelech či lidech (Davis, 2002), (Freshney, 1992).

1.5.3. Limitace ve využití buněčných kultur

Využívání buněčných kultur má však na druhou stranu i řadu omezení, která je limitují. Jelikož se kultivované buňky pěstují v umělém kultivačním médiu za nefyziologických podmínek, postrádají obvyklý tkáňový kontext. Umělé médium totiž neumožňuje vytvořit přesně stejné vnitřní prostředí jako v organismu. Kultivovaným buňkám tudíž chybí přítomnost jiných buněčných typů, se kterými by mohly komunikovat *in vivo* a vyměňovat si s nimi látky. Dalším problémem může být absence extracelulární matrix, jež může mít na buňky významný vliv. Důsledkem může nastat to, že kultivované buňky mohou změnit svůj fenotyp a tím pádem se mohou změnit i jejich vlastnosti. Může docházet k změnám morfologickým, či změnám v expresi genů. Dalším významným omezením může být přímo přizpůsobení práce s nimi. Buněčné kultury se musí pěstovat ve speciálních laboratořích, které často obsahují nákladnou specializovanou přístrojovou techniku. Zapotřebí je i speciální jednorázový materiál a pomůcky. Chemikálie a roztoky pro kultivaci musí být zbaveny veškerých kontaminantů, jako jsou například přechodné kovy či různé toxiny. V neposlední řadě je také velmi důležité proškolení personálu, který se v laboratoři nachází, jelikož práce s buněčnými kulturami je náročná na čistotu, přesnost a soustředěnost (Davis, 2002), (Freshney, 1992).

1.5.4. Rozdělení buněčných lidských kultur

Mezi kultury buněk živočišných se řadí i kultury buněk lidských. Ty můžeme dle stáří rozdělit do tří skupin:

- 1) primární linie
- 2) buněčné kmeny
- 3) buněčné linie

Primární kultury se skládají z buněk, které byly přímo odebrané z organismu, nejčastěji laboratorního zvířete či člověka (Kočárek, 2006). První kultura izolovaných buněk se poté nazývá primární kultura nebo primokultura (Davis, 2002). Tento typ kultury má však velmi nízkou životnost. Ta trvá pouze pár dní a poté je potřeba buňky převést do nového média tzv. pasážováním (Kočárek, 2006). Poté co se buňky naředí a přenesou do nových kultivačních nádob vzniká tzv. sekundární kultura – subkultura. V sekundární kultuře se buňky pěstují do té doby, než vznikne dostatečné množství materiálu, který se může následně použít pro další výzkum. V primárních kulturách dochází tedy hlavně k selekci buněk – přežívají ty, které jsou lépe přizpůsobeny kultivačním podmínkám. Primární kultury můžeme rozdělit dle jejich původu – na normální a nádorové. Nádorové buňky se od těch normálních liší především tím, že se daleko lépe množí a obecně snáze kultivují. Kultury normálních buněk mají daleko více omezenou životnost, po několika pasážích dochází k „zestárnutí“ kultury a buňky buď změni své vlastnosti nebo se přestanou dělit (Davis, 2002).

Buněčné kmeny jsou tvořeny z buněk, které již byly jednou pasážovány. Jde o kulturu normálních diploidních buněk, čímž se liší od buněčných linií. Jejich životnost je v průměru 50 dělení a následně zanikají.

Buněčné linie jsou skupiny buněk, které se vyznačují prakticky neomezenou schopností dělit se. Tento typ kultury vzniká z buněčných kmenů procesem, který se nazývá transformace. Dalším způsobem, jak mohou vznikat je izolováním z živé tkáně. Příkladem buněčných linií jsou například HeLa buňky, které pocházejí z karcinomu děložního hrdla (Kočárek, 2006).

1.5.4.1. Využití primárních nádorových linií

Již několik desetiletí představovaly buněčné nádorové linie přístupnou a snadno využitelnou sadu biologických modelů pro výzkum biologie (mechanismů?) rakoviny a potencionálních účinků protinádorových léků. Četné studie však naznačují, že buněčné linie nepředstavují dostatečně složitost a rozmanitost tumorů. Ne všechny rakovinné buněčné linie mají stejnou hodnotu jako nádorové modely. Oproti tomu si naopak získávají daleko více pozornosti primární linie

buněk a jejich krátkodobá kultivace ze solidních nádorů, především co se týče v personalizované terapii. Preklinické studie s primárními kulturami poskytují užitečné informace potřebné k vytváření nových strategií pro chemoprevenci, chemoterapie, cytotoxinové terapie, radioterapie, a tak dále (Gillet et al, 2013). Primární linie jsou velmi jedinečným zdrojem. Jsou získávány z nádorové tkáně od pacientů. Tento vzorek vyžaduje okamžité zpracování – je potřeba ihned identifikovat buňky vhodné pro kultivaci. Nedávné publikace o využití primárních buněčných linií zdůrazňují jejich potenciál a podíl na vývoji léků od zhodnocení cíle po kombinovaný design a vysoce výkonný screening potencionálních protinádorových látek a léků (Cree et al, 2010).

1.5.5. Tkáňové banky

Tkáňové banky vznikají odběrem a následným zpracováním různých druhů tkání. Velmi důležitý je zde způsob skladování a konzervace z důvodu možné distribuce a dalšího využití tkání při transplantacích. Tkáňové banky spolupracují při odběrech s vybranými odděleními a informace čerpají z Národního registru dárců tkání a orgánů. V České republice o vzniku tkáňových bank rozhoduje Ministerstvo zdravotnictví ČR. Zřízení těchto zařízení je možné v nemocnicích, které poskytují specializovanou zdravotní péči (zákon č. 285/2002 Sb.).

Lidské tkáňové banky jsou velmi důležité v rámci různých výzkumů a hrají zásadní roli při aplikaci celé řady nových technologií – tzv. „omics“, které jsou důležité při nacházení/výzkumu a validaci nových molekulárních vzorců onemocnění a při implementaci nových biomarkerů při klinických studiích. Objevování nových biomarkerů a jejich validace je velmi důležitá při biologických a lékařských výzkumech a analýzách ex vivo - pokládají základy pro výzkum nových cílených terapií a pro výzkum léčiv (Bevilacqua et al, 2010). Za posledních 20 let se zakládání tkáňových bank stalo významným fenoménem, jak v rámci biomedicínského výzkumu, tak i v rozvoji personalizované medicíny (Riegman et al, 2007). Tkáňové banky, tzv. biobanking, obsahují celou řadu typů vzorků rozmanitých organismů a jejich možnosti odběrů – od populačních tkáňových vzorků zdravých jedinců ve velkých epidemiologických kohortách až po specifické

biobanky „nemocných“ tkání získaných v průběhu klinických intervencí (Pukkala et al, 2007). Získání tkáňových vzorků je vícestupňový proces, který začíná informováním pacientů a získáním jejich informovaného souhlasu (v závislosti na místních požadavcích). Dále zahrnuje získávání dat, odběr tkáně, anotaci, konzervaci, uskladnění, kontrolu kvality, katalogizaci, zpracování a distribuci. Při zakládání tkáňových bank jsou rovněž zapotřebí odborné znalosti v oblasti kryobiologie, znalosti v právních/etických aspektech, v řízení projektů či v administrativě (Bevilacqua et al, 2010).

„Patologické archivy“ představují speciální typ tkáňových bank a mohou pomáhat při vytváření nových tkáňových bank, především jako zdroje při výzkumu. Primární rolí těchto archivů je dokumentovat diagnostiky, ale měl by být vytvořeny takovým způsobem, aby mohly být uplatněny i při výzkumu (Bevilacqua et al, 2010).

1.5.5.1. Nádorové tkáňové banky

Nádorové banky obsahující hluboce zmražené (kryokonzervované) vzorky nádorových tkání poskytují rozvoj nových diagnostických postupů, které jsou založené na metodách molekulárně-biologických a genetických analýz. Nádorová tkáňová banka umožňuje sběr a evidenci odebraných nádorových tkáňových vzorků, které jsou připraveny k dalším diagnostickým postupům. Odběr nádorové tkáně a následná kryokonzervace se provádí u nemocných pacientů většinou již v pokročilejším stádiu. Od pacienta je získán informovaný souhlas. Pro transport odebraných vzorků se musí dodržovat celá řada standardních podmínek – transport do laboratoří musí být proveden co nejrychleji, jelikož může poměrně rychle nastat autolýza tkáně. Pro transport se využívá buď nízká teplota, nebo různé stabilizační roztoky. Po archivaci zmražené tkáně se vzorky uchovávají při teplotách -80 stupňů Celsia v hluboce mrazících boxech či v mrazících přístrojích na tekutý dusík s teplotou -140 stupňů Celsia. Každý vzorek s tkání je označen technickými, demografickými a klinickými daty a je anonymizován. (Filipová et al, 2013).

(V závislosti na státě či v rámci politiky jednotlivých klinik může docházet k opakovaným purifikacím získaných tkání, které jsou následně využívány

k výzkumu na základě souhlasu pacienta. V některých zemích ztrácí pacient kontrolu nad svou tkání bezprostředně po operaci nebo po určité době, kdy je materiál klasifikován jako lékařský odpad. Mnoho akademických a institucionálních biobank neumožňuje přesun vzorků do jiných výzkumných institucí a nastává problém chronického nedostatku onkologických vzorků k dalším výzkumům. Dostupnost vzorků je také dále znesnadněna standardním klinickým ošetřením a chemickým ošetřením, které proběhne bezprostředně po stanovení diagnózy.)

Přesné uchování tkáně a dokumentace údajů o pacientech, a dobře definované koncepty dlouhodobých prospektivních studií jsou nezbytné pro vývoj cenných biorepozitářů, které přispívají k progresivnímu translačnímu výzkumu a vývoji jednotlivých modelů předpovědi rizik a klinické inovace. Samozřejmě, zaměření na etické aspekty je silně zastoupeno v celé oblasti výzkumu biobankingu. Především s dalším rozvojem v tomto oboru a stále složitější strukturou lidských biobank, bude nutnost tuto skutečnost etických otázek v budoucnu vyřešit (Budimir et al, 2011).

1.6. Organoidy

1.6.1. Charakteristika organoidů

Organoidy jsou in vitro trojrozměrné buněčné kultury, které mohou in vivo připomínat orgány nebo tkáně (Hynds, Giangreco, 2013). Vývoj technik, které by umožnily konstrukci organoidů započal již kolem roku 1900, kdy byla především snaha dosáhnout simulace organogeneze v kultivačních podmínkách za využití fragmentů tkání (Burrows, 1910). Pojmu organoid však byly dlouhou dobu přisuzovány různé charakteristiky. Ve 20. století tak byla například pojmenována buněčná strukturní „organela“ a v onkologii měl pojem „organoid“ význam jako karcinom nebo teratom (Heller, 1991). K pojmu, pod jakým známe organoid dnes přispěl především objev embryonálních kmenových buněk v roce 1981. Zásluhou vědců Takahashiho a Yamanaka následovala indukce pluripotentních buněk z buněk somatických v roce 2006 (Takahashi, Yamanaka 2006). Kombinací známých metod s těmito novými objevy mohly vznikat první myší mini orgány a později následovaly i lidské (Kretzschmar, Clevers 2016).

Mezi vlastnosti organoidových kultur patří jejich schopnost strukturně organizovat buňky tak, aby byly schopny napodobit konkrétní orgán. Další důležitou vlastností je také částečný výkon funkce daného orgánu (Lancaster, Knoblich, 2014). Organoidové kultury jsou ideálním nástrojem pro výzkum tkání *in vivo*, jelikož napodobují jejich komplexní strukturu a morfologii a lze s nimi poměrně lehce manipulovat. Výhodou je také fakt, že jejich růst a vývoj probíhá rychleji než u skutečných orgánů (Shamir, Ewald, 2014).

Mezi nevýhody organoidních tkání patří například druhová diverzita a odlišnost podmínek *in vivo* oproti lidskému prostředí. Oproti ostatním modelům jsou také poměrně dost finančně náročné. Mezi další nevýhody můžeme zařadit i skutečnost, že nemají několik základních složek, které dovytváří epitel daného orgánu (např. cévní nebo lymfatický systém). Limitovaná velikost je pravděpodobně následkem nedostatku krevní podpory (Rossi a kol. 2018)

Výzkum a použití organoidů hraje klíčovou roli při vytváření simulací *in vitro*, které se podobají prostředí *in vivo*. Díky nim jsou vědci schopni potvrdit či vyvracet aktuální poznatky o mechanismech patogeneze a mají podstatnou roli při vývoji nových léků, vakcín či jiných terapeutických prostředků. Další vývoj této aplikace může vést až k získání nových metod pro personalizovanou léčbu různých druhů rakoviny. Organoidy jsou také schopny zaplnit mezeru mezi *in vitro* výzkumem nových léčiv na 2D buněčných kulturách a klinickými studiemi (www.optixs.cz).

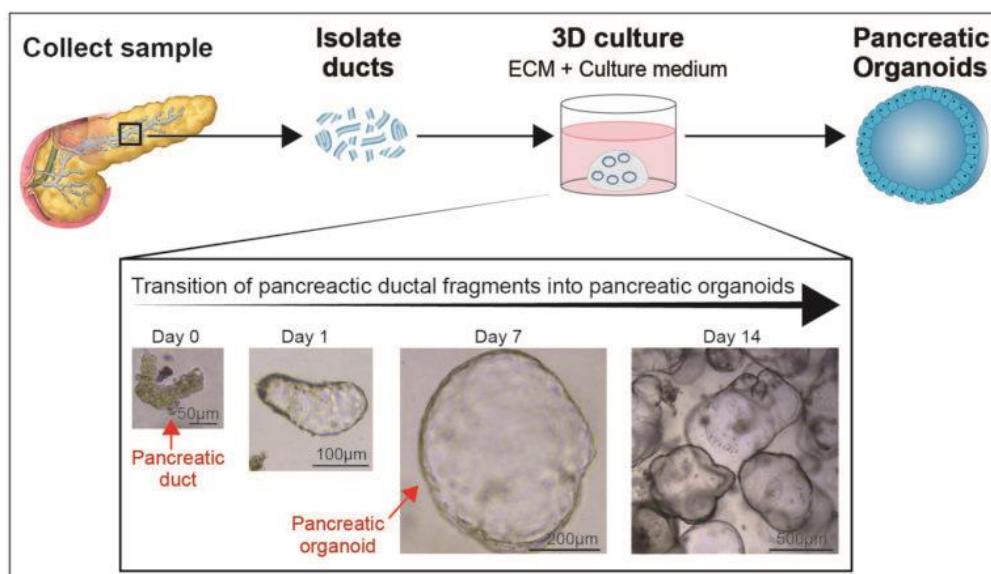
1.6.2. Nádorové pankreatické organoidy

Pankreatické nádorové organoidy jsou nádorové modely individuálních lidských pankreatických duktálních adenokarcinomů (PDA), které mohou být rychle generované z chirurgicky resekovaných nádorů. Organoidy mohou simulovat plné spektrum pacientova tumoru, včetně stroma elementů, u kterých se předpokládá, že mohou být zodpovědné za rezistenci léčby během chemoterapie. Na rozdíl od xenograftů odvozených od pacientů, které vyžadují relativně velké množství nádorové tkáně a u kterých může trvat několik měsíců, než se spojí s hostitelským organismem. Lidské PDA organoidy mohou být vytvářeny rychleji a z menšího

množství materiálu. Organoidy mohou být poté použity k specifické protinádorové léčbě, pomocí testování potencionálních terapeutických cílů. Většina pacientů s podezřelými tkáněmi pankreatu podstupují diagnostiku EUS-FNA (EUS guided fine-needle aspiration) nebo EUS-FNB (fine needle biopsy) odebraného vzorku pomocí malé jehly. Diagnostika EUS-FNB má teoretickou výhodu nad FNA v tom, že poskytuje větší množství tkání se zachovalou strukturou, čímž se zvyšuje pravděpodobnost počáteční pozitivní diagnostiky PDA. Nicméně předešlé klinické testy, které srovnávaly oba tyto typy odběru tkáně měly protikladné výsledky. Současná meta-analýza ukázala, že FNA a FNB odběr vzorků poskytuje podobnou diagnostiku, přičemž FNB vyžadovala méně odběrů pomocí jehly. Při odběru vzorků nádorové tkáně pankreatu je vyžadován nízký počet odběrů pomocí jehly, a to z toho důvodu, aby bylo možné potencionálně získat další bioptický vzorek pro přidružené molekulární testování, aniž by se zvýšil celkový risk akutní pankreatitidy, která by mohla vzniknout následkem této procedury. Schopnost vytvářet lidské PDA organoidy jinými prostředky, než resekci tkáně, nebyla dosavadně prozkoumána. Využití FNB odběru vzorků pro kultivaci organoidů hned na začátku diagnózy má potencionální výhodu v tom, že poskytuje přesné léčebné možnosti pro všechny pacienty s touto nemocí, a ne jen pro těch pár, kteří se rozhodnou pro chirurgickou resekci (Tiriac et al, 2018).

1.6.3. Kultivační podmínky

1.6.3.1. Kultivace a barvení organoidů



Obr.2 – Pankreatické kanály mohou být kultivovány *in vitro* a expandovány jako pankreatické organoidy (Prior et al, 2020).

Technologie organoidů umožňuje kultivaci nádorových buněk pacientů s mnohem vyšší účinností než klasické 2D buněčné linie. Organoidy odvozené od nádorů se kultivují z biopsie resekovaného lidského nádoru (Sander et al, 2019). Poté se umístí do 3D extracelulární matrix, která funguje jako 3D lešení (Prior et al, 2020). Tato důležitá složka při tvorbě organoidů, tzv. matrigel, je matrix bohatá na laminin a kolagen vytvářející vhodné podmínky a mimikující prostředí organismu. Matrigel umožňuje růst a vývoj vznikající tkáně (Sander et al, 2019). Aby byl tento proces úspěšný, je nutné vyvinout kultivační médium, které obsahuje veškeré signální a růstové faktory potřebné ke vzniku organoidů a udržení jejich dlouhé kultivační doby. Také je důležité vyvinout protokol ke zmrazení přebytečné tkáně, která potom může do budoucna posloužit jako tkáňová banka (Prior et al, 2020). Zajímavým aspektem organoidů odvozených z nádoru je jejich schopnost zachovat heterogenitu nádoru, jak je pozorováno *in vivo*, a to i při dlouhodobé expanzi, což je hlavní výhoda oproti tradičním buněčným liniím (Sander et al, 2019).

Jako kultivační médium se používá médium o následujícím složení: jako základní médium je použito kompletní médium adMEM/F12, ke kterému je

přidán Afamin/Wnt3a kondiciované médium (50 %, JSR Life Sciences), gastrin I (10nM, Sigma-Aldrich), N-acetylcystein (1mM, Sigma-Aldrich), B27 supplement (2 %, Thermo Fisher Scientific), EGF (50ng/ml, Invitrogen), noggin (100ng/ml, PeproTech), A83-01 (500nM, Tocris Bioscience), prostaglandin E2 (Tocris), FGF10 (100ng/ml, PeproTech), nicotinamid (Sigma-Aldrich), R-spondin1 kondiciované médium (10 %) (Tiriac et al, 2018).

Barvení organoidů na preparátech lze provést několika způsoby:

1) Barvení hematoxylin-eosin

Barviva, která se v histologii využívají k barvení tkání, se dělí na barviva zásaditá (bazická) a barviva kyselá. Barviva kyselá, taktéž nazývaná plazmatická, barví cytoplazmu buněk a v histologii se nejčastěji používá barvivo eozin. Zásaditá barviva barví jádra buněk a nejpoužívanějším barvivem je hematoxylin. Díky barvení hematoxylin eosin jsou odlišena jádra buněk tmavě modře, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně a chrupavka modře (Vacek, 1996).

2) PAS – Periodic Acid Shift

PAS reakce se využívá pro průkaz polysacharidů. Podstatou této reakce je oxidace látek s blízkými glykolovými skupinami nebo jejich amino nebo alkylaminoderiváty s kyselinou jodistou za vzniku dialdehydů, které se spojí se Schiffovým činidlem za vzniku nerozpustné purpurové sloučeniny. Používá se pro formalinovou fixovanou tkáň a cytochemii enzymů; lze použít pro zmrazené řezy s úpravami. Barví bazální membránu (normální a v nádorech), glykogen, některé muciny a mukopolysacharidy. Také barví různé inkluze, tělíška, granule a sekrece složené z mukopolysacharidů nebo mucinů (www.pathologyoutlines.com).

3) Hale – Modifikace dle Mullera

Toto barvení se používá k průkazu kyselých mukopolysacharidů. Kyselé mukopolysacharidy jsou součástí různých hlenovitých sekretů, jako je například kyselina hyaluronová, heparin či chondroitinsulfát. Mukopolysacharidy obsahují sacharidovou a bílkovinnou složku.

4) Imunohistochemické barvení CK7

Imunohistochemické barvení umožňuje znázornit přítomnost jedné konkrétní látky pomocí specifických protilátek. V imunohistochemii rozeznáváme dvě základní metody: přímou a nepřímou. Přímá metoda nachází využití především v elektronové mikroskopii (na světelnou není dostatečně citlivá). Dochází zde k navázání primární protilátky, která je značená nějakou značkou. Značka může být fluorescenční, enzymatická či se může jednat o navázaný kov. Protilátky poté přisedají na cílový antigen, proti kterému byly vyprodukovány. Tento typ barvení se hojně využívá jako nástroj pokročilé diagnostiky v patologii (Jirkovská, 2009).

Použití protilátky CK 7 (Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 7), umožňuje patologům blíže specifikovat primární místo novotvaru. CK7 se silně a difuzně barví u nádorů slinných žláz, plic, mléčné žlázy, ovaria, endometria, močového měchýře a thymu, mezoteliomu, neuroendokrinních nádorů a adenokarcinomu pankreatu a žlučových cest (Dabbs, 2006).

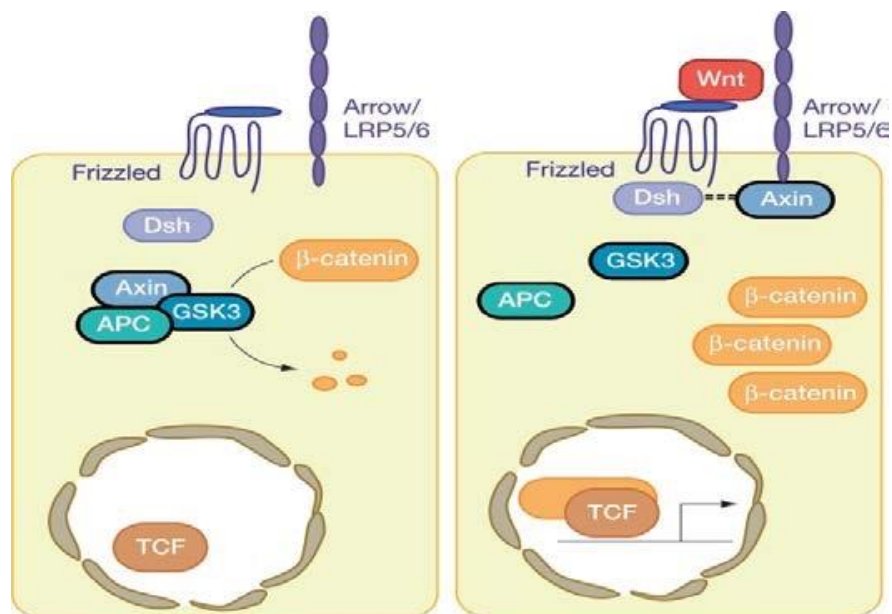
1.6.3.2. Signální kaskáda Wnt

Kanonická signální dráha Wnt hraje důležitou roli v regulaci, buněčné proliferaci, embryonálním vývoji a polaritě kmenových buněk a při vývoji rakoviny. Napomáhá také udržovat homeostázi tkání (Logan, 2004). Sebeobnova kmenových buněk v organoidech vyžaduje aktivaci Wnt dráhy. V myších organoidech je toho dosaženo například pomocí amplifikace endogenních signálů Wnt pomocí potenciátoru Wnt-R-Spondin (proteiny R-Spondin jsou rodinou molekul, které silně posilují signalizaci Wnt/beta-katenin). Lidské organoidy však vyžadují další Wnt ligandy, které lze získat z média obsahující sérum kondicionované buněčnou linií produkující Wnt3a. Toto médium však obsahuje nedefinované komponenty, které indukují diferenciaci nežádoucí pro diagnostické testy nebo jiné klinické aplikace. Proto je pro terapeutické a diagnostické využití preferována náhrada Wnt3a kondicionovaného média purifikovanými faktory (Tuysuz et al, 2017).

Rovněž bylo zjištěno, že signální dráha Wnt hraje důležitou roli při růstu a údržbě těchto procesů. Ukázalo se, že Wnt3a je nezbytný specializovaný

komponent pro udržení proliferace Lgr5-pozitivních kmenových buněk v intestinálních epitelových buňkách a užívá se při kultivaci různých organoidů trávicího ústrojí, jako je tenké střevo, tlusté střevo, žaludek, pankreat a játra. Přesto, že jde o protein rozpustný v tucích a tvoří agregáty v bezsérových médiích, a proto nemůže dostatečně vykonávat svoji aktivitu, byl Wnt3a konvenčně užíván pro kultivaci střevních organoidů. V roce 2016 bylo zjištěno, že vysoká aktivita Wnt3a může být zachována formováním komplexů s Wnt3a Afaminem, což je jedna ze složek tohoto média. Navíc užitím Afaminu a Wnt3a komplexu pro organoidní kulturu umožní dlouhodobou kultivaci organoidů. Toto nové médium zajišťuje vyšší úspěch při kultivaci organoidů (Mihara et al, 2016).

Signalizace Wnt je zahájena navázáním ligandu Wnt na transmembránový receptor Fz (Frizzled) a koreceptor LRP (Wehrli et al, 2000). Na vnitřní straně membrány je pomocí tohoto receptoru aktivován prostředník, který inhibuje 3-proteinový komplex GSK3/axin/APC. Po jejich inaktivaci dojde k přerušení fosforylace Beta-kateninu, který se začne následně kumulovat v cytoplasmě v nefosforylované formě (wikiskripta.org). Následně se přesune do jádra, kde se spojí s transkripčními faktory rodiny TCF nebo LEF. Tyto transkripční faktory v komplexu s beta-kateninem aktivují expresi cílových genů signální dráhy Wnt (MacDonald et al, 2009). Mezi tyto geny patří například ty, co zahajují buněčný cyklus, čímž je spuštěna buněčná proliferace kmenových buněk (Reya, Clevers, 2005).



Obr.3 – Schéma kanonické signální kaskády Wnt (Logan et al, 2004).

1.6.3.3. Wnt3a/Afamin

Afamin, taktéž znám jako a-albumin, je plazmatický glykoprotein, který patří k proteinům rodiny albuminu. Afamin je přítomen v krvi dospělého člověka v množství 10–30 µg/ml. Je také transportním proteinem vitamínu E (Mihara et al, 2016). V roce 2016 bylo zjištěno, že vysoká aktivita Wnt3a může být udržována vznikem komplexů s Wnt3a Afaminem. Protože Afamin může také solubilizovat Wnt5a, Wnt3 a mnoho dalších podtypů Wnt, laminová komplexace poskytuje způsob, jak podrobit různé Wnt ligandy a jejich signální mechanismy důkladné biochemické kontrole, která byla roky obtížná. Afamin může také specificky interagovat s několika proteiny Wnt a umožnit jim zůstat rozptýleny ve vodném roztoku a taktéž zabránit jejich inaktivaci/agregaci během skladování. Navíc užitím Afaminu a Wnt3a komplexu pro organoidní kulturu umožní dlouhodobou kultivaci organoidů. Toto nové médium zajišťuje vyšší úspěch při kultivaci organoidů (Mihara et al, 2016).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zrealizovat úspěšnou kultivaci primárních linií karcinomu pankreatu od konkrétních pacientů, která by mohla vést k získání vhodného materiálu pro budoucí potřeby tzv. „tailored“ predikce vhodné léčby.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1. Přístroje, reagentie a kultivační materiál

3.1.1. Přístrojové vybavení

- Centrifuga MR22i, Jouan
- Flow-Box s vertikálním prouděním vzduchu MSC-Advantage, ThermoScientific
- Inkubátor CO2 Heracell, ThermoScientific
- Stolní centrifuga MiniSpin, Eppendorf
- Světelný mikroskop Eclipse TS100, Nikon
- Vodní lázeň TW8, Julabo
- Vodní lázeň s třepačkou, Julabo

3.1.2. Laboratorní pomůcky

Zkumavky 50ml, Zkumavky 50ml, 15ml (TPP), mikrozukavky (Eppendorf), pipety a špičky (Eppendorf), Petriho misky 6cm, 2cm (TPP), pinzety, skalpely, filtry 70 µm (MyltenyiBiotec), Burkerova komůrka, 4-jamkový kultivační panel

3.1.3 Reagentie a složení použitých médií

adDMEM (Gibco), fetální bovinní sérum (Invitrogen), Glutamax (Gibco), MycoZap (Eastport), BD Matrigel (BD Biosciences, kat. č. 07980), dispáza (Gibco), trypsin-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich), DMSO (Sigma-Aldrich)
sterilní fosfátový pufr (PBS), Hepes 1M, EDTA 0,5M (finální konc. 0,005M), plasma-citrát, CaCl₂, trombin, eosin, 10% formaldehyd

Disociační médium – kolagenáza, DNase I (10 µg/mL), Y-27632 (10.5 µM)

Kompletní médium adDMEM - Bylo použito základní médium ad DMEM/F12 (Gibco), do kterého byl přidán HEPES (10mM, ThermoFisher), Glutamax (2mM,

Sigma-Aldrich) a antibiotika penicilin(1 U/ml, Invitrogen) a streptomycin (1 U/ml, Invitrogen)

Transportní médium adDMEM - Bylo použito kompletní médium adDMEM s 5% fetální bovinní sérum (FBS, Invitrogen)

Kultivační médium - Jako základní médium bylo použito kompletní médium adDMEM/F12, ke kterému byl přidán Afamin/Wnt3a kondiciované médium (50 %, JSR Life Sciences), gastrin I (10nM, Sigma-Aldrich), N-acetylcystein (1mM, Sigma-Aldrich), B27 supplement (2 %, Thermo Fisher Scientific), EGF (50ng/ml, Invitrogen), noggin (100ng/ml, PeproTech), A83-01 (500nM, Tocris Bioscience), prostaglandin E2 (Tocris), FGF10 (100ng/ml, PeproTech), nicotinamid (Sigma-Aldrich), R-spondin1 kondiciované médium (10 %) (Tiriac et al, 2018).

Zamrazovací médium - Bylo použito kultivační médium s 10% DMSO (Sigma-Aldrich).

3.2. Probandi

Probandi, kteří byli vybráni pro tento experiment byli již v pokročilém stádiu nemoci rakoviny pankreatu a byl u nich proveden jeden z typů chirurgické intervence, při které došlo k částečnému nebo úplnému odstranění pankreatu. Tento zákrok byl proveden na I. Chirurgické klinice LF UP a FN Olomouc. Všichni pacienti byli před operací poučeni a poskytli informovaný souhlas, který byl schválen Etickou komisí FN v Olomouci. Pro tento experiment bylo počítáno s cca 10 pacienty, avšak kvůli světové pandemii, která vypukla na začátku roku 2020 byl tento počet redukován na polovinu z důvodu prozatímního omezení těchto operací a omezenému provozu v laboratořích. Mezi těmito pěti probandy byly 3 ženy a 2 muži.

3.3. Odběr buněčného materiálu

Čerstvé nádorové tkáně byly odebrány během plánovaných chirurgických zákroků při odstranění nádoru pankreatu u pacientů. Bezprostředně po operaci a

vyjmutí pankreatu z těla byla patologem určená část tkáně, která byla nejvíce zasažená nádorem. Tato tkáň byla patologem opatrně odkrojena a po pečlivém vyšetření vzorků nádoru pankreatu s patologem byly do experimentu zahrnuty pouze vzorky jednoznačně diagnostikované jako adenokarcinom pankreatu. Operace s následným odběrem materiálu probíhaly v rozmezí od podzimu roku 2019 do zimy roku 2020. Celkově bylo odebráno 5 vzorků materiálu.

3.4. Postup zpracování nádorové tkáně pankreatu

Nádorová tkáň byla přenesena z operačního sálu na šupinovém ledu v 50 ml zkumavce, která obsahovala transportní médium s antibiotiky. Po příchodu do laboratoře se pracovalo ve sterilním prostředí v laminárním flowboxu. Transportní médium bylo odsáto pomocí pipety a byl dvakrát proveden oplach tkáně pomocí sterilního PBS. Následně byla tkáň přenesena na Petriho misku, zvážena a pomocí skalpelu byla rozkrájena na co nejmenší části o velikosti cca 0,5 mm. Takto upravená hmota byla přenesena do sterilní konické zkumavky o objemu 15 ml. Bylo přidáno předem připravené disociační médium (8 ml média na 1 kg tkáně) a následně byla inkubována v třepací lázni při 37°C a 1400rpm. Po hodině byla směs resuspendována pipetou o objemu 1 ml a poté vrácena zpět na třepací vodní lázeň. Následně byl každých 15 minut kontrolován stupeň rozkladu, dokud nebyla tkáň homogenní. K rozložené směsi byl poté přidán, v poměru 1:1, PBS vychlazený na ledu a obsah zkumavky byl následně několikrát zprudka resuspendován pipetou o objemu 5 ml. Poté byla provedena centrifugace při 22°C a 1400 rpm po dobu 5 minut. Po skončení centrifugace byl supernatant odsát a peleta resuspendována v 10 ml adDMEM kompletním médiu, ke kterému bylo přidáno fetální bovinní sérum (FBS, Invitrogen) ve výsledné 20 % koncentraci (v/v), ohřáté na 37°C. Tato buněčná suspenze byla přefiltrována přes 70µm filtr a centrifugována při 22°C a 1200 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl opět odsát a peleta byla resuspendována v PBS. Následně bylo odebráno 10 µl suspenze, která byla aplikována do Burkerovy komůrky, kde byly buňky spočítány. Za účelem vyšetí buněk do matrigelu bylo odebráno 200 000 buněk do Eppendorf zkumavky a přebytečné buňky byly zamrazeny do zamrazovacího média (Procházková et al, 2020).

3.5. Kultivace organoidů

3.5.1. Vyšetí organoidů

Dostatečnou dobu předem byl na šupinatém ledu rozmrazen alikvot matrigelu a v mrazáku vychlazena krabička se sterilními seříznutými 200 μ l špičkami. 4-jamkový panel byl umístěn předem do termostatu pro jeho dostatečné nahřátí. Následně byla centrifugována suspenze buněk v počtu 200 000 při 22°C a 1200 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odsát a peleta v Eppendorf zkumavce umístěna na led. Poté bylo pomocí sterilně seříznuté špičky nabráno 100 μ l matrigelu a v něm byla resuspendována peleta s dostatečnou opatrností a rychlostí. Suspenze v matrigelu byla nanesena v množství 50 μ l do 2 jamek v nahřátém panelu. Takto naplněný panel byl ihned umístěn do termostatu a inkubován po dobu 10 minut při 37°C. Po ztuhnutí matrigelu bylo do každé jamky přidáno 500 μ l teplého kultivačního média a panel byl opět vložen do termostatu a inkubován při 37°C a 5 % CO₂. Výměna média byla prováděna 2x až 3x týdně (Strnadel et al, 2018).

3.5.2. Pasáž organoidů

Pomocí pipety bylo odsáto kultivační médium z jamky. Matrigel s organoidy byl přenesen do falkony s konickým dnem o objemu 15 ml. Následně bylo přidáno 5 ml roztoku dispázy a zkumavka byla umístěna do inkubátoru na 30-60 minut. Průběžně byl kontrolován stupeň rozkladu matrigelu jemným převrácením a zatřepáním obsahu zkumavky. Po rozložení matrigelu (přestal být viditelný proti světlu), se organoidy uvolnily z matrigelu a na dně zkumavky vznikl sediment. Enzymatická reakce byla zastavena přidáním 50 μ l 0,5M EDTA (finální koncentrace 0,005M) a zkumavka byla centrifugována při 22°C a 1200 rpm po dobu 1 minuty. Pro rozložení organoidů byl odsát supernatant a přidán 1 ml 0,25 % trypsin-EDTA, peleta byla lehce resuspendována, přenesena na 2 cm Petriho misku a následně inkubována 10 minut v inkubátoru. Stav rozkladu organoidů byl po 10 minutách kontrolován pod mikroskopem, a to každé 2 minuty. Po rozložení byla suspenze přenesena do zkumavky s konickým dnem o objemu 15 ml, kde bylo poté přidáno 10 ml PBS a zkumavka byla centrifugována při 22°C a 1200 rpm po dobu 2 minut. Tento krok s promytím PBS byl opakován (Strnadel et al, 2018).

3.5.3. Zamrazení organoidů

Organoidy mohou být zamrazeny buď jako jednobuněčná suspenze po pasáži organoidů (příprava pomocí rozkladu dispázou a trypsinem), nebo jako celé organoidy (uvolněné z matrigelu pomocí dispázy). Buňky v množství od 500 000 do 2 000 000, nebo organoidy z jedné jamky panelu byly resuspendovány v 1 ml zamrazovacího média s 10 % DMSO a následně umístěny v zamrazovací zkumavce do polystyrenové zamrazovací krabičky do hlubokomrazícího boxu (-80 °C). Následující den byly tyto zkumavky přeneseny do Dewarovy nádoby s tekutým dusíkem (Strnadel et al, 2018).

3.6. Výroba parafínového bloku a tkáňových řezů

Peleta organoidů v Eppendorf zkumavce byla promyta PBS. Následně byla peleta resuspendována v 112 µl plazmě-citrátu a přenesena do Eppendorf zkumavky o objemu 2 ml pro pozdější kvalitnější manipulaci se sraženinou. Poté bylo přidáno 2,8 µl CaCl₂ a 11,5 µl trombinu. Zhruba po 2 minutách byla vytvořena sraženina a bylo přidáno 0,5 ml eosinu. Po 1 minutě byla peleta z eosinu vyjmuta do kazetky a byla provedena fixace 10 % formaldehydem. Takto připravená zafixovaná peleta organoidů byla předána zdravotnickým laborantkám v bioptické laboratoři, kde byl pomocí automatu vytvořen parafínový blok a tkáňové řezy na sklech, které byly později použity pro histologická a imunochemická barvení.

3.7. Histologické barvení preparátů

3.7.1. Základní barvení hematoxylin-eozin

Při barvení organoidů hematoxylin-eozinem byl použit různý materiál a roztoky: xylen, aceton, HCl, montovací médium, destilovaná voda, reagentie a fixátory (10% formol, Bakerova tekutina, Lowyho roztok).

Dále bylo zapotřebí laboratorní vybavení a pomůcky: tkáňový blok, mikrotom, mikrotomový nůž, mikroskop, laboratorní sklo, krycí sklo a coverslipping film.

Pracovní postup:

V prvním kroku se před samotným barvením zbavily řezy parafínu. K tomu se použil xylen a sestupná alkoholová řada. Jako první se nechal po dobu 10-ti minut působit xylen. Poté se přidal 96 % alkohol B po dobu 3 minut. Následoval 80 % alkohol B po dobu 2 minut a v posledním kroku se použil 70 % alkohol B po dobu 2 minut. Následně se řezy propraly ve vodě po dobu 5 minut.

Následovalo vlastní barvení odparafinovaných a zavodněných řezů. Jako první se provedla diferenciace v kyselém 1 % alkoholu po dobu 10 s. Poté následovalo 5-ti minutové proprání ve vodě. Následovalo barvení eosinem po dobu 1 minuty a po skončení oplach vodovodní vodou. Řezy se opět odvodnily v 96 % alkoholu B po dobu 1 minuty a následně se přidala směs acetonu a aceton-xylynu. V xylynu došlo k projasnění řezů. Posledním krokem bylo montování do kanadského balzámu, pertexu nebo entellanu.

3.7.2. PAS – Periodic Acid Schiff – průkaz polysacharidů

K barvení se využívají roztoky a činidla: xylen, aceton, barvicí roztoky, alkohol B, voda, montovací médium (pertex, kanadský balzám, entellan), glycerin-bílek, fixátory (10 % formol, Lowyho roztok, Bakerova tekutina).

Další použitý laboratorní materiál a pomůcky: tkáňový blok, mikrotom, mikrotomový nůž, mikroskop, laboratorní sklo, podložní a krycí sklo, buničitá vata.

Pracovní postup:

V prvním kroku proběhlo odparafinování vzorků pomocí xylynu po dobu 10 minut. Po rozpuštění parafínu se převedl preparát do vody a následně se použila alkoholová sestupná řada za použití alkoholu B (96 %, 80 %, 70 %) po dobu 3, 2 a 2 minut. Následovala oxidace v 0,5 % kyselině jodisté po dobu 10 minut. Poté se preparáty opláchly nejprve vodovodní vodou a poté destilovanou vodou. Následovalo barvení v Schiffově roztoku po dobu 10 minut a po skončení proprání ve vodě. Dalším krokem bylo již barvení pomocí Weigertova hematoxylinu. Následovala diferenciace pomocí 1 % kyselého alkoholu (70 % alkohol B + kyselina solná konc.) a poté proprání ve vodovodní vodě po dobu 10 minut. Řezy se poté

odvodnily v 96 % alkoholu B a projasnily ve dvou xylenových lázní. Posledním krokem bylo opět montování.

3.7.3. Hale – modifikace dle Mullera – průkaz kyselých mukopolysacharidů

K barvení byly použity roztoky a činidla: xylen, aceton, barvicí roztoky, alkohol B, montovací médium (pertex, kanadský balzám, entellan), destilovaná voda, glycerin-bílek, fixátor (10 % formol) a voda.

Další použitý materiál a vybavení: tkáňový blok, mikrotom, mikrotomový nůž, mikroskop, laboratorní sklo, podložní a krycí sklo, buničitá vata.

Pracovní postup:

Prvním krokem bylo odparafínování řezů pomocí xylenu po dobu 10 minut a následně pomocí alkoholové řady (96 %, 80 %, 70 %). Následoval oplach v destilované vodě a barvení Mullerovým roztokem po dobu 10 minut. Poté proběhl další oplach a barvení pomocí okyselené žluté krevní soli po dobu 10 minut. Další barvení proběhlo za využití jádrové červeně po dobu 10 minut a následoval další oplach. Posledním barvivem byla Saturnová červeň F3B po dobu 10 minut. Dalším krokem bylo odfiltrování řezů a odvodnění pomocí alkoholu B (96 %) a acetonu. Na závěr se řezy projasnily v xylenu a následně proběhlo montování.

3.7.4. Imunohistochemické barvení

Pracovní postup – protilátky s demaskováním epitopu antigenu v přístroji PT Link (Flex systém):

V prvním kroku se preparáty zasadily do držáku a přenesly se do PT Linku do pufru EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (1x). Preparáty byly následně zahřívány po dobu 20 minut při 97 stupních Celsia. Preparáty se poté nechaly vychladit v PT Linku. V dalším kroku se preparáty promyly ve FLEX pufru (3 x 5 minut). Řezy se označily speciálním perem pro IHC nebo tuhým parafínem a pomocí Peroxidase-Blocking reagentu se zrušila aktivita endogenní peroxidázy. Následně se preparáty promyly ve FLEX pufru (3x 5 minut).

Pracovní postup II - Protilátky s demaskováním epitopu antigenu v PT Linku a protilátky po použití metanolového peroxidu:

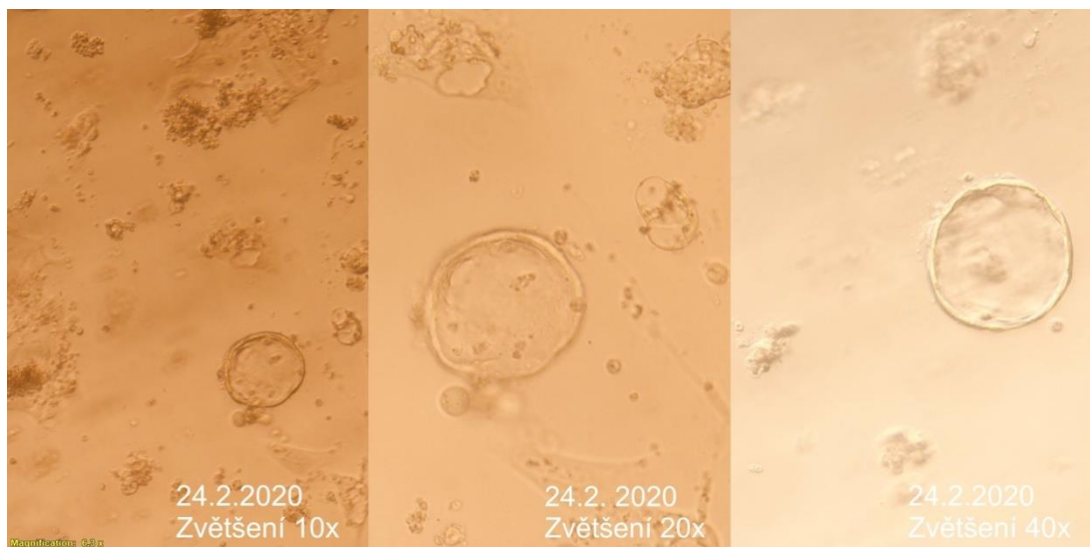
Na sklo bylo nakapáno cca 100um naředěných primárních protilátek a následně proběhla inkubace ve vlhké komůrce po dobu 20 minut. Po inkubaci se sklepla primární protilátka ze skla do buničiny a skla se promyla ve FLEX pufriu (3x 5 minut). U některých protilátek se aplikovala zesílení z FLEX Kitu a následně proběhla inkubace po dobu 15 minut. Činidla se sklepla do buničiny. Skla se promyla ve FLEX pufriu (3x 5 minut). Na připravené sklo se aplikovalo cca 100 um sekundární protilátky z FLEX kitu. Následovala inkubace po dobu 20 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po skončení se opět sklepla sekundární protilátka do buničiny a skla se promyla ve FLEX pufriu (3x 5 minut). V dalším kroku se připravil DAB z FLEX kitu. Na sklo se nakapal DAB ze skla do buničiny a skla se poté opláchla ve FLEX pufriu. Poté se skla propláchla pod tekoucí vodou.

Barvení hematoxylin-eosin sloužilo k histologické identifikaci buněk organoidů, barvení PAS a HALLE pak k identifikaci a průkazu hlenu – tedy produktu buněk žlázek pankreatu a barvení CK7 pak prokazuje původ ve tkáni pankreatu – jde tedy o histologickou, histochemickou a imunohistochemickou verifikaci původu buněk organoidu z exokrinního pankreatu/adenokarcinomu pankreatu.

4 VÝSLEDKY

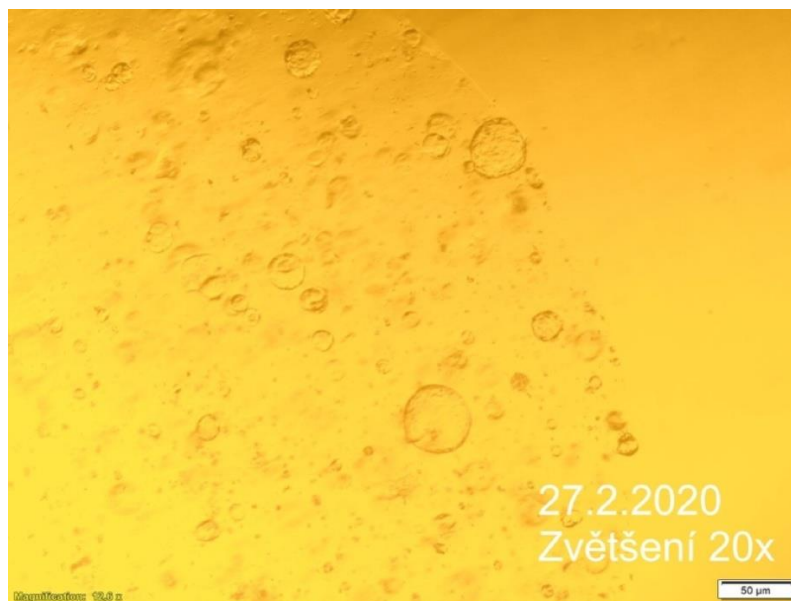
Proband č. 1

U probanda č. 1 byla získána tkáň o hmotnosti 0,33 g. Z ní byl následně vytěžen cca 1 mil. buněk, které byly poté nasazeny do dvou jamek s matrigelem po 100 tisíc buňkách na jamku. Dále byla také zamrazena 1 ampule s 800 tisíci buňkami.

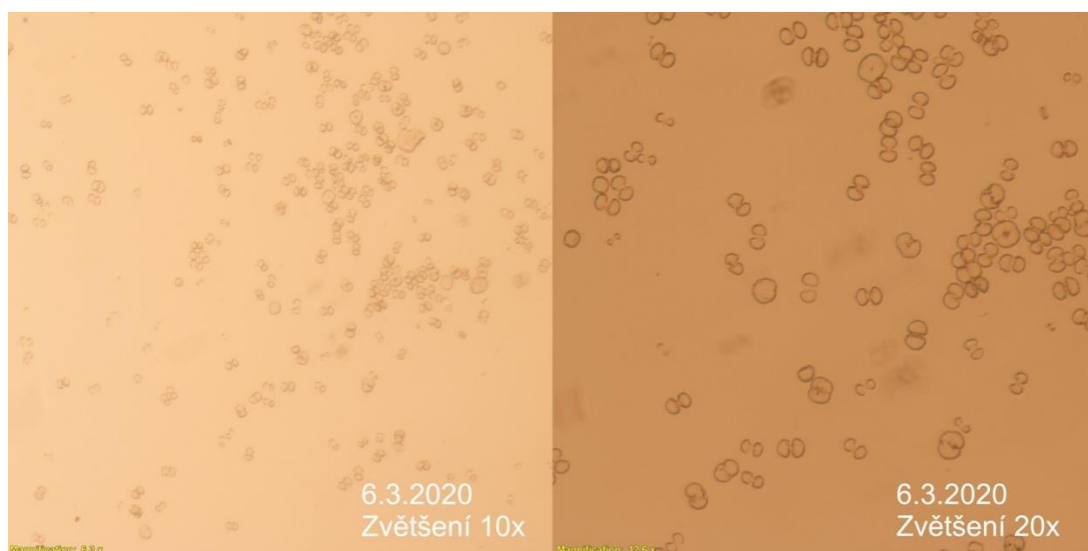


Obr.4 – Organoidy 5. den po kultivaci – největší organoid má 50 um.

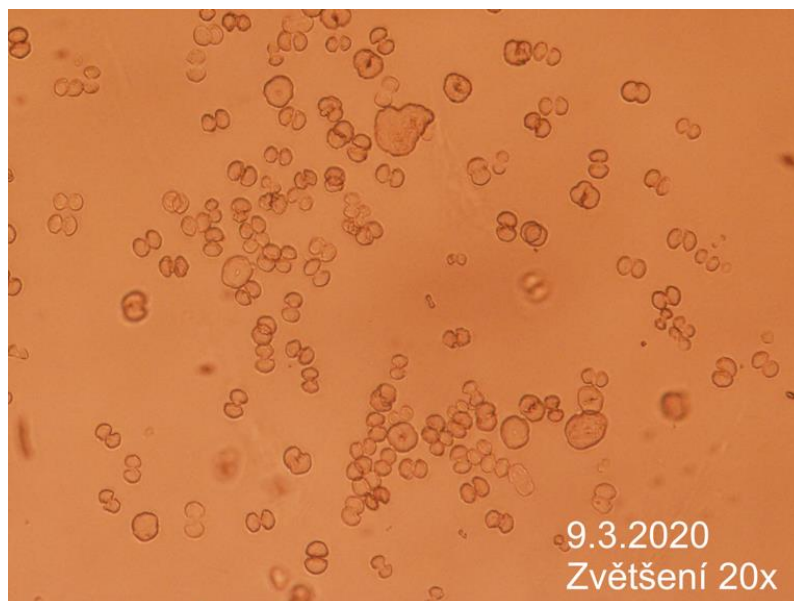
Sedmý den kultivace byla provedena pasáž organoidů. U první jamky nedošlo k disociaci organoidu a následné převedení do nového matrigelu dopadlo neúspěšně. U druhé jamky proběhla pasáž s disociací organoidu a následně byly nasazeny dvě nové jamky. Po pasáži buňky dále nerostly, a proto byl vzorek vyřazen.



Obr.5 – Organoidy 7. den kultivace – velikost 100 um



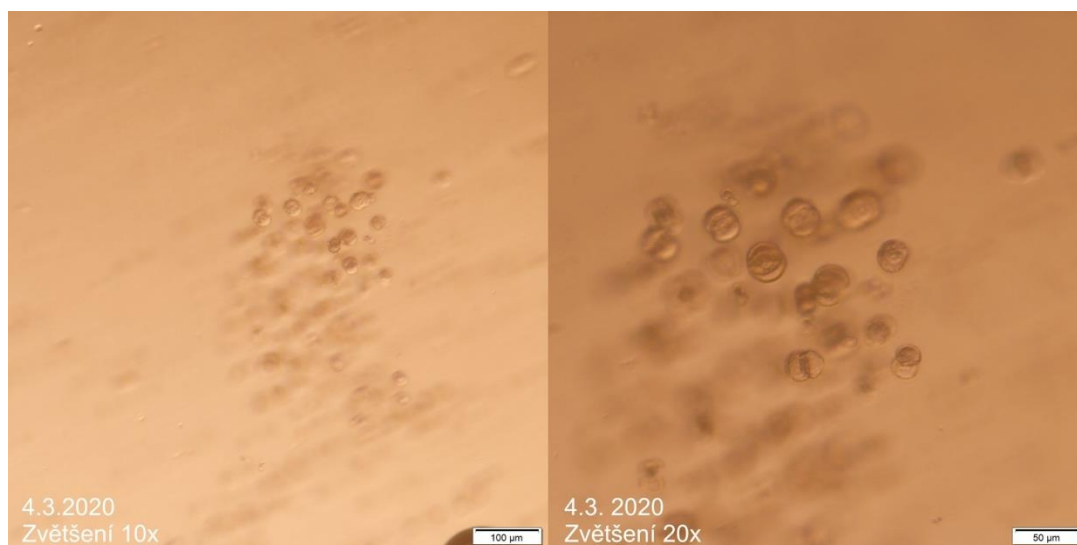
Obr.6 – Organoidy 14. den kultivace / 7. Den po pasáži



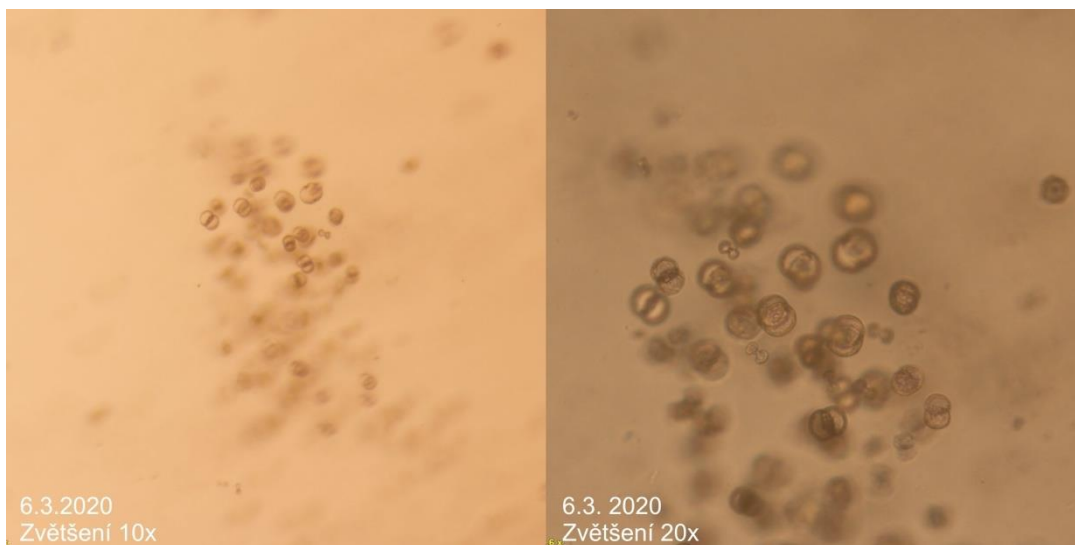
Obr. 7 – Organoidy 16. den po kultivaci/9. den po pasáži.

Proband č. 2

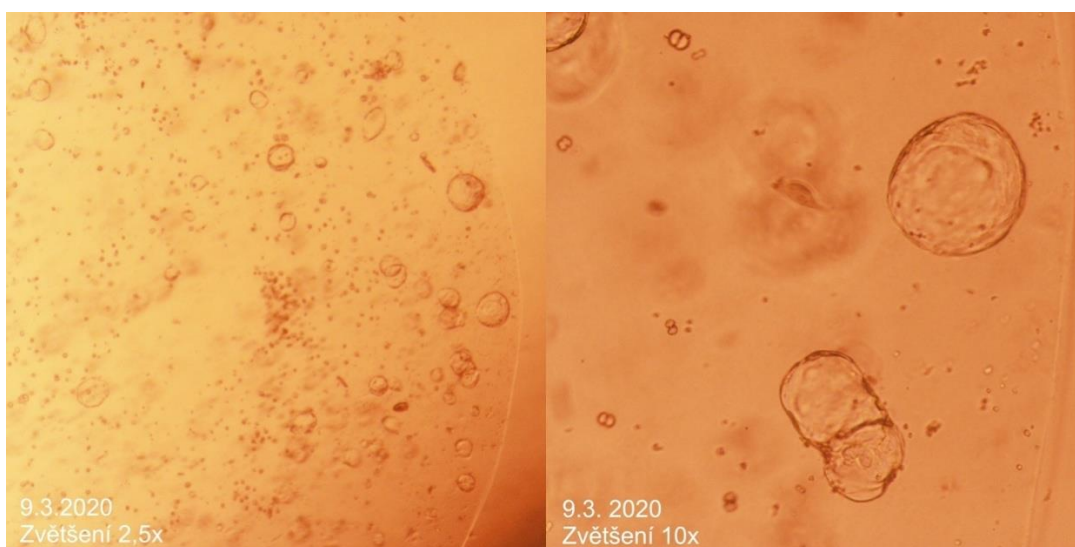
U probanda č. 2 byla získána tkáň o hmotnosti 0,11 g. Z ní bylo vytěženo 376 tisíc buněk. Ty byly následně nasazeny do dvou jamek s matrigelem, přičemž v každé z nich bylo 100 tisíc buněk. Také byla zamrazena 1 ampule s buňkami.



Obr. 8 – Organoidy 2. den kultivace – velikost organoidů 10 um.

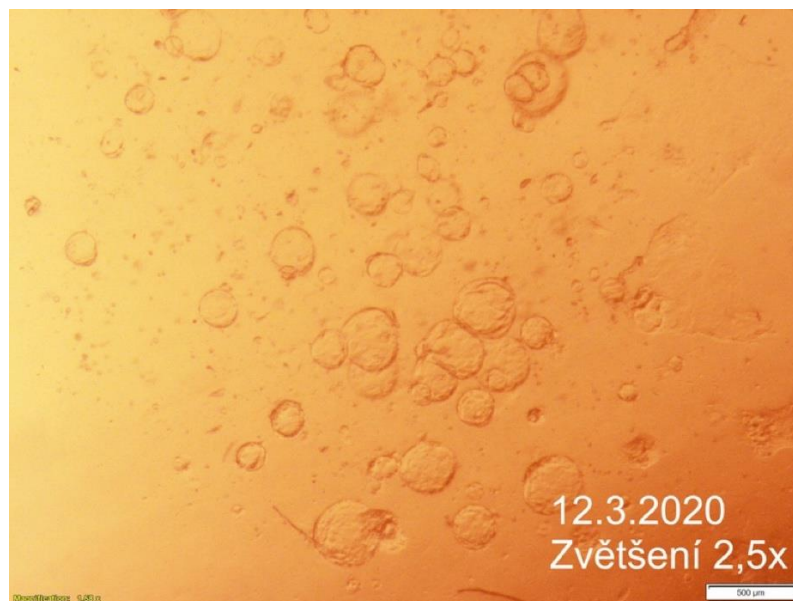


Obr. 9 – Organoidy 4. den kultivace – velikost organoidů 20-30 um



Obr. 10 – Organoidy 7. den kultivace – velikost organoidů 100 um.

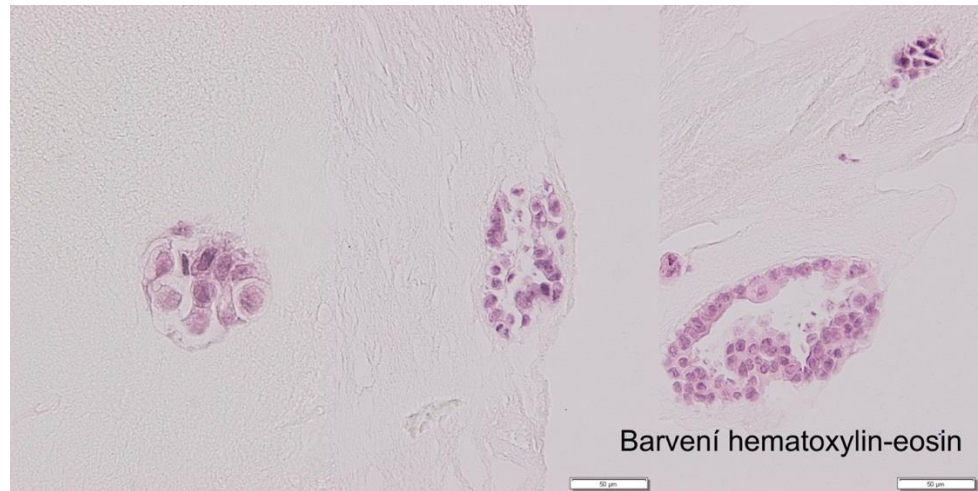
Desátý den kultivace byl z první jamky vytvořen parafínový blok, u druhé jamky proběhla pasáž. Po pasáži organoidy již nerostly a vzorek byl vyřazen.



Obr. 11 – Organoidy 10. den kultivace – velikost organoidů 200 µm.

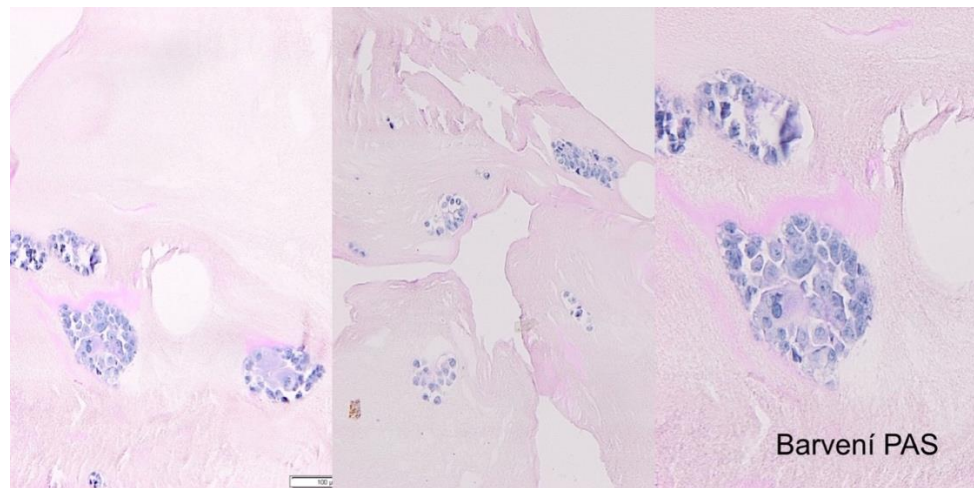


Obr. 12 – neúspěšný růst organoidů 4. den po pasáži.



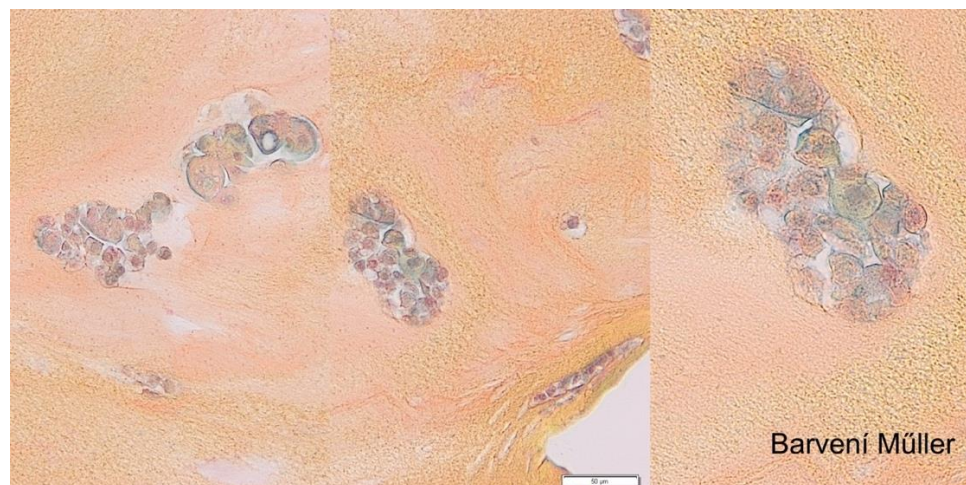
Barvení hematoxylin-eosin

Obr. 13 – Barvení organoidů hematoxylin-eosin.



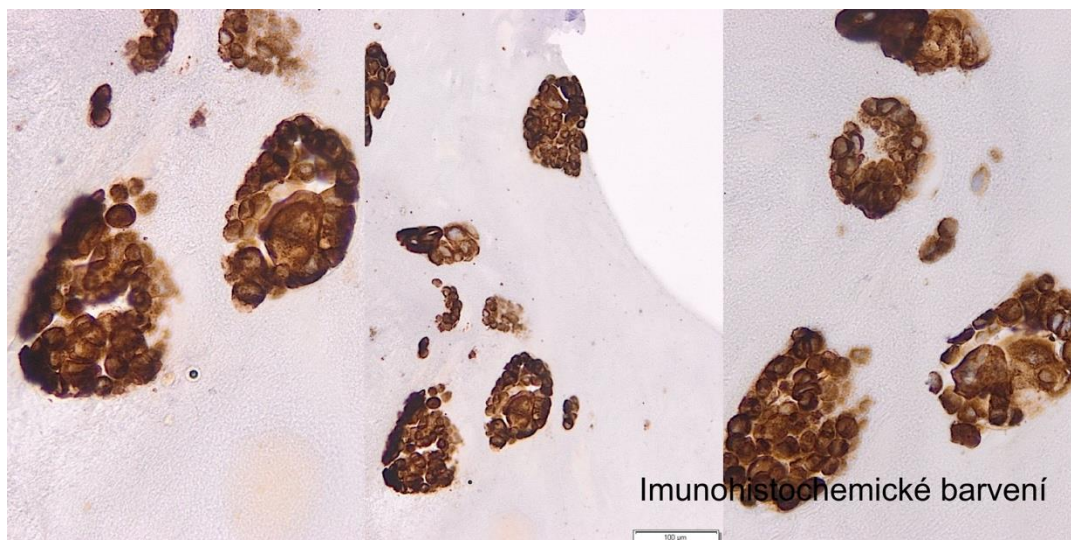
Barvení PAS

Obr. 14 – Barvení organoidů Periodic Acid Schiff



Barvení Müller

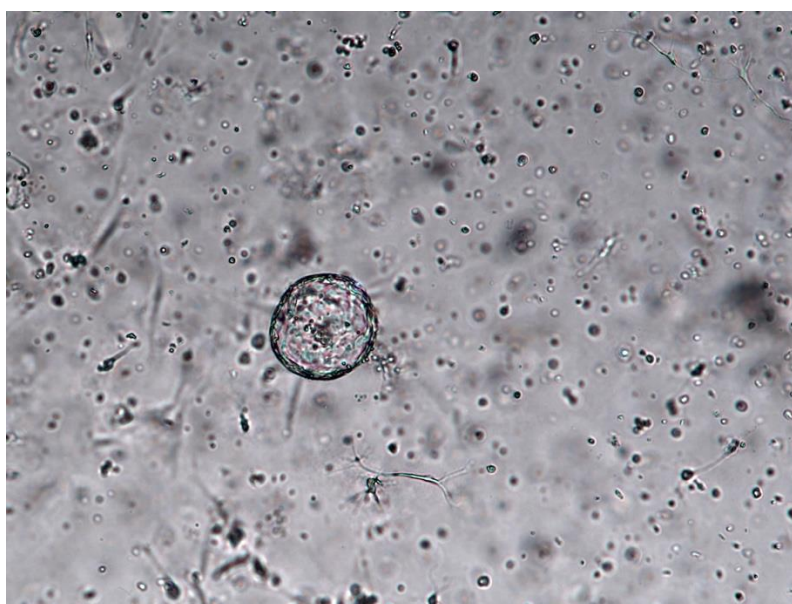
Obr. 15 – Barvení organoidů Muller



Obr. 16 – Imunohistochemické barvení organoidů (CK7).

Probant č. 3

U probanda č. 3 byla získána tkáň o hmotnosti 0,57 g. Z ní byl získán výtěžek cca 3 mil. buněk, které byly následně nasazeny do dvou jamek po 100 tisíc buněk na jamku. Také byly zamrazeny 3 ampule po 1 mil. buněk. Bylo zde použito nové médium s Afaminem. Následně proběhla kultivace i ze zamrazených buněk, které se podařilo úspěšně dvakrát zpasážovat a následně vytvořit histologické preparáty.



Obr. 17 - Rozmražený vzorek s organoidy (zvětšení 4x).



Obr. 18 – Organoidy po pasáži (zvětšení 2,5x).



Obr.19 – Rozmrazené organoidy po první pasáži (zvětšení 10x).



Obr. 20 – Obarvené organoidy PAS barvivem z rozmrazeného vzorku.



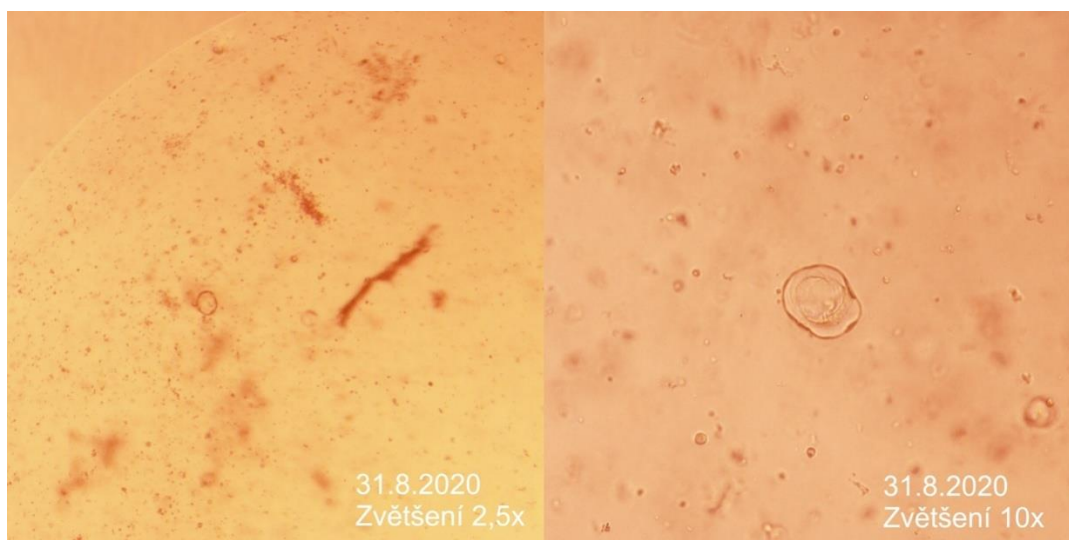
Obr. 21 – Obarvené organoidy hematoxylin eozinem z rozmrazeného vzorku.



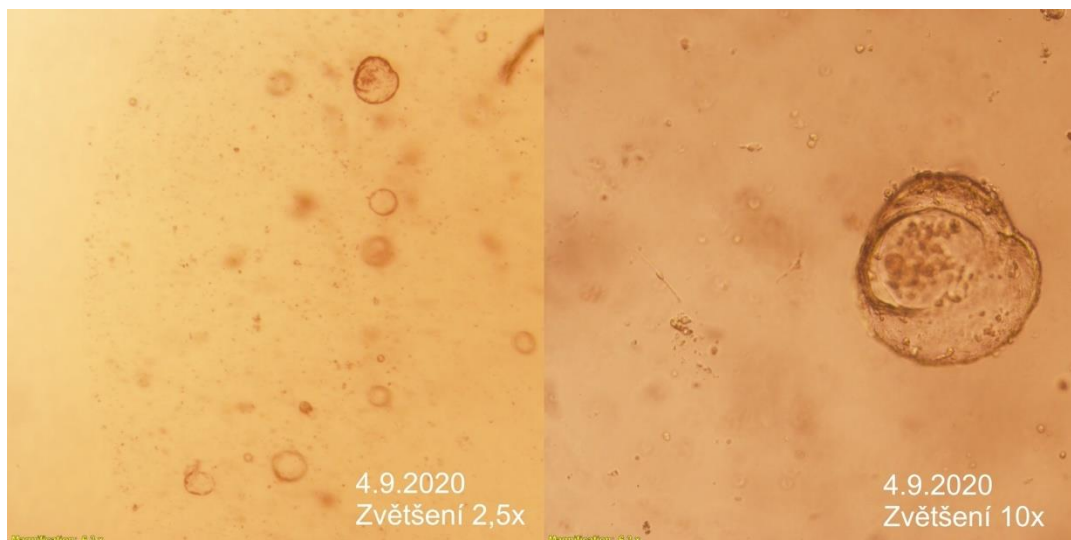
Obr. 22 – Obarvené organoidy pomocí imunohistochemického barvení z rozmrazeného vzorku.

Probant č. 4

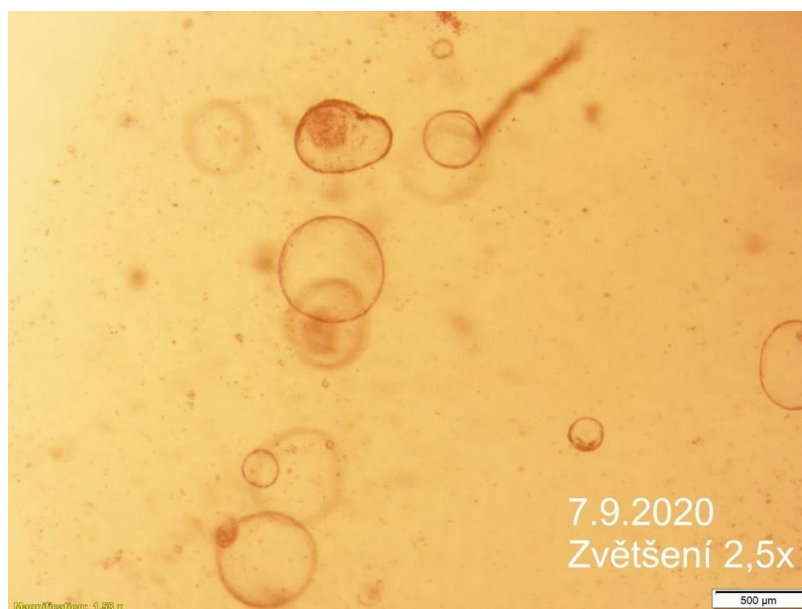
U probanda č. 4 byla získána tkáň o hmotnosti 0,18 g. Z ní byl získán výtěžek cca 600 tisíc buněk, které byly následně nasazeny do dvou jamek po 100 tisíc buňkách na jamku. Zamrazeny byly 2 ampule buněk. Opět zde bylo použito médium s Afaminem.



Obr. 23 – Organoidy 7.den kultivace – velikost organoidů 50-100 µm.

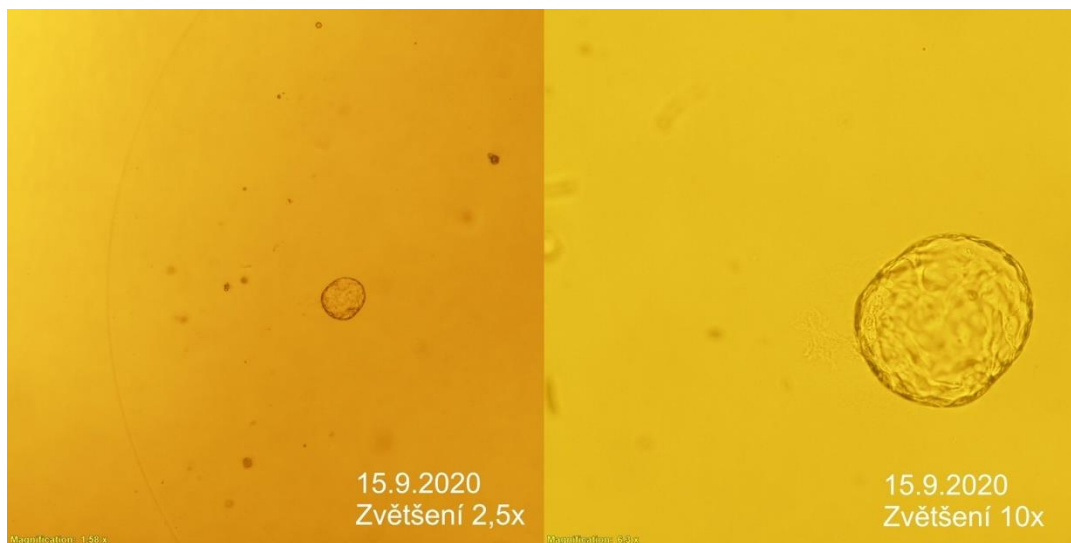


Obr. 24 – Organoidy 11. den kultivace– velikost organoidů 150-200 um.



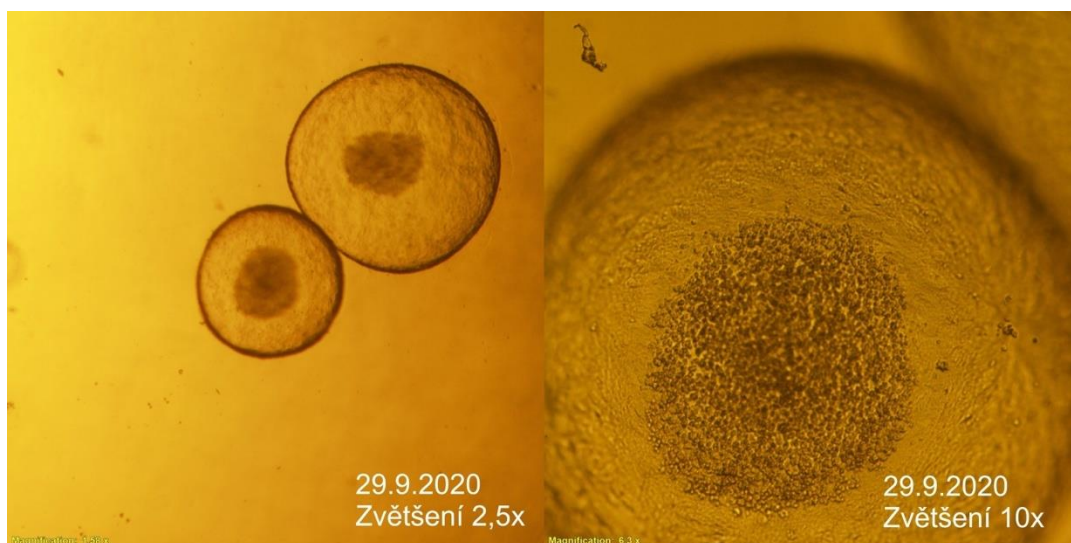
Obr. 25 – Organoidy 14. den kultivace– velikost organoidů 500 um.

Po 15. dni kultivace byl z první jamky vytvořen parafínový blok. U druhé jamky byla provedena pasáž a následně po ní byly vytvořeny dvě nové jamky. Do 7 dnů po pasáži, se v první jamce vytvořil první větší organoid a ve druhé jamce vznikly 3 organoidy, které byly větší než 200 um.



Obr. 26 – Organoidy 7. den po pasáži – velikost organoidů 200 um.

Následně byla rozmrazena první ampule, ze které byla vytvořena nová jamka. Zde následně vznikly 3 velké organoidy a po 18. dnech byl z této jamky vytvořen parafínový blok, avšak nepodařily se z něj vytvořit kvalitní preparáty.



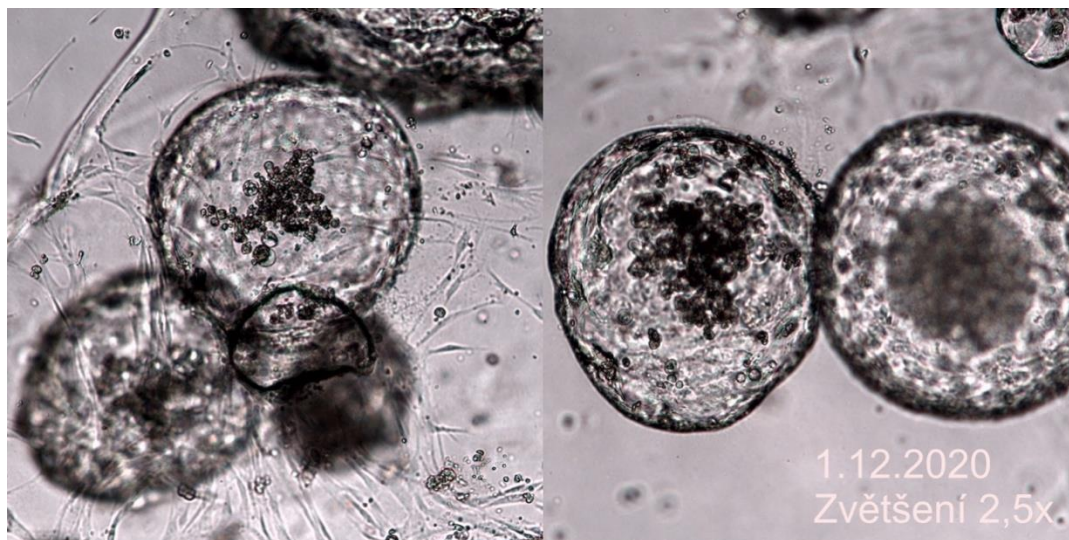
Obr. 27 – Organoidy vzniklé 18. den z rozmrazeného vzorku.



Obr. 28 – Organoidy vytvořené z rozmrazeného vzorku.

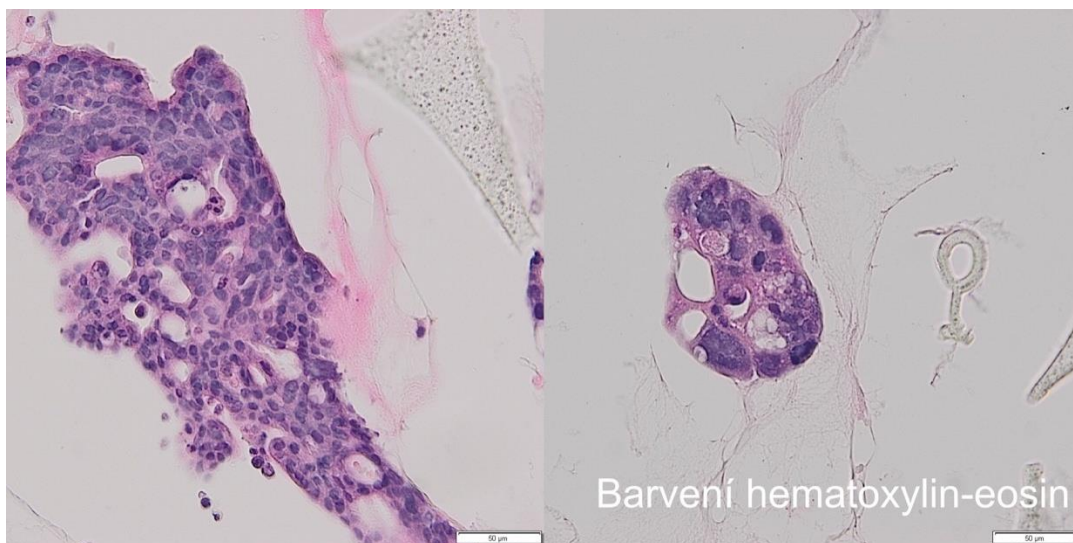
Proband č. 5

U probanda č. 5 byla získána tkáň o hmotnosti 0,10 g. Z ní byl získán výtěžek cca 966 tisíc buněk, které byly následně nasazeny do dvou jamek po 100 tisíc buňkách na jamku. Zamrazeny byly 2 ampule po 400 tisíci buňkách.



Obr. 29 – Organoidy vzniklé 6. den po kultivaci.

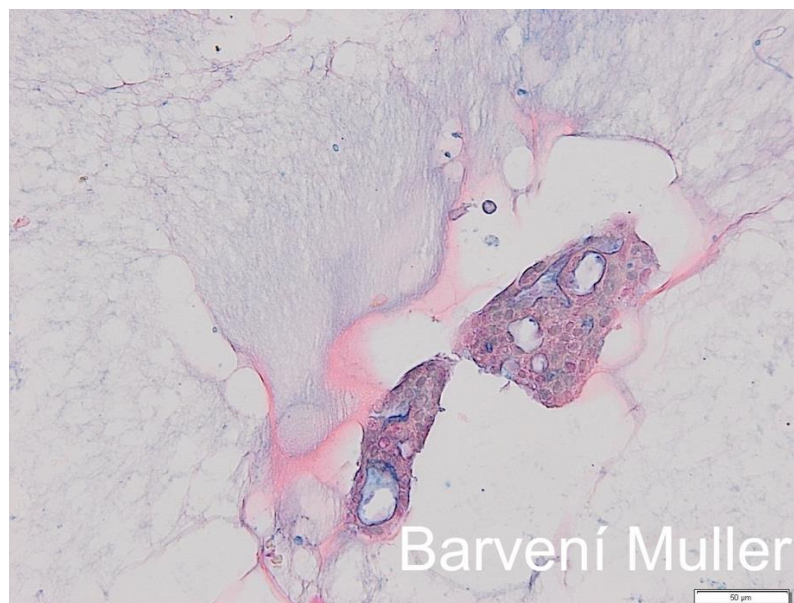
Po 14. dnech kultivace byl z jedné jamky vytvořen parafínový blok. Preparát však nebyl reprezentativní, proto byl z druhé jamky vytvořen další parafínový blok.



Obr. 30– Obarvené organoidy hematoxylin-eosinem.



Obr. 31 – Imunohistochemicky obarvené organoidy.



Barvení Muller

Obr. 32 - Barvení organoidů barvivem Muller.



Barvení Periodic Acid Shift

Obr. 33 – Barvení organoidů Periodic Acid Shift (PAS).

5 DISKUZE

Kultivace organoidů z resekovaných nádorových tkáních je komplikovaný proces, který však může mít obrovský přínos. Na začátku jsme měli vytyčený cíl, a to zvládnout úspěšně kultivaci organoidů z nádorových tkání karcinomu pankreatu. Tohoto cíle se nám podařilo dosáhnout, přestože ne ze všech vzorků se podařilo vykultivovat organoidy a následně vytvořit parafínové bloky. V průběhu tohoto experimentu jsme řešili několik problémů. Nedlouho po zahájení, na podzim 2020, vypukla celosvětová pandemie onemocnění Covid-19, která do značné míry zkomplikovala odběr nádorových tkání. Naplánované operace karcinomu slinivky byly z tohoto důvodu často zrušeny, nebo přeloženy, tudíž jsme nakonec místo původních 10 vzorků získali pouze 5. S dalším problémem jsme se potýkali v dalším kroku, a to během kultivace. Na začátku experimentu víceméně ještě neexistoval žádný 100 % osvědčený postup nebo protokol pro kultivaci organoidů z nádorové tkáně pankreatu, tudíž jsme ze začátku použili médium pro postup při kolorektálním karcinomu. Následně jsme našli článek, kde měli úspěch v kultivaci s médiem s Afaminem. Částečně jsme vycházeli ze článku Tiriac *et al* z roku 2018, který měl 87 % úspěšnost při kultivaci pankreatických organoidů.

U prvního vzorku od probanda č. 1 jsme měli problém právě s růstem buněk, jelikož zde nedošlo k disociaci organoidu a vzorek byl prakticky nepoužitelný. U vzorku druhého sice již organoidy narostly, avšak po pasáži byl opět problém s jejich růstem, a proto byl vzorek vyřazen. U třetího vzorku jsme proto použily nově speciální médium s Afaminem, které mělo zaručit dlouhodobější kultivaci a tím pádem i větší úspěch po pasážích. Avšak organoidy získané od probanda č. 3 taktéž po kultivaci nerostly, zřejmě z důvodu nevhodného vzorku. S úspěchem jsme se setkali u vzorků 4 a 5, kde už kultivace byla natolik optimalizovaná, že jsme byli schopni z těchto vzorků vytvořit i parafínové bloky. Růst organoidů se také u vzorků od každého pacienta lišil, tudíž jsme výměnu média i pasáž museli přizpůsobit ke každému vzorku zvlášť, tak aby kultivace byla co nejvíce efektivní.

Během průběhu našeho experimentu vyšel v prosinci 2020 článek s protokolem (*Establishment of pancreatic organoids from normal tissue and tumors*, Driehuis *et al*, 2020) pro kultivaci pankreatických nádorových organoidů, jehož závěrem bylo, že při dodržení jejich protokolu mohou být organoidní kultury vytvořeny z primárního materiálu pacienta s účinností vyšší než 70 %. Autorům této studie se podařilo úspěšně vykultivovat 30 vzorků s organoidy, které byly následně použity k prozkoumání translačního potenciálu technologie organoidů, a to dvěma způsoby. Nejprve byly zavedené organoidy a odpovídající primární tkáň histologicky hodnoceny a porovnány s ohledem na molekulární charakteristiky. Zadruhé, po genetické charakterizaci byly organoidy vystaveny řadě terapeutických činidel k identifikaci terapií, které účinně usmrcovaly nádorové buňky pankreatu. V protokolu mimo jiné popisují, že se jim organoidy objevily již po 2-4 dnech od prvotního nasazení, což můžeme potvrdit i u naší kultivace. Rozdílem však bylo to, že prováděli pasáž buněk až po 14-20 dnech, kdežto my jsme vzorku pasážovali v průměru po 10-14 dnech. Dalším rozdílem také bylo to, že my jsme používali médium s Afaminem, kdežto v jejich protokolu bylo použito jejich vlastní připravené nádorově selektivního médium bránící kontaminaci normálními buňkami. Naopak, taktéž jako my, ve své práci uvedli, že růst každého vzorku byl individuální a lišil se od pacienta. Oproti dalším pracím jsme také provedli histologické barvení, jež sloužilo k přesnějšímu průkazu a specifikaci organoidů.

6 ZÁVĚR

Tato práce shrnuje poznatky v oblasti tvorby orgánových struktur z nádorových buněk, které mohou být potencionálně využity při léčbě nádoru pankreatu, a popřípadě dalších nádorových onemocnění. S využitím znalostí, jak organoidy správně kultivovat, jsme schopni vytvořit prostředí *in vitro*, které je potom velmi podobný prostředí *in vivo* těchto nádorů/orgánů a mohou zde být do jisté míry zohledněny i jejich funkce. Díky těmto trojrozměrným strukturám, které jsou schopny simulovat plné spektrum pacientova tumoru, nám umožňují studium od různých biologických procesů, přes modelování onemocnění, až po aplikaci nových léčebných postupů při personalizované terapii. Organoidy tedy představují slibný a unikátní model pro budoucí, a nebo navazující studium mechanismů kancerogeneze.

Obrovskou výhodou organoidů je nejen to, že jsou poměrně rychle generované z chirurgicky resekovaných nádorů, ale i to, že jsme schopni je vykultivovat z poměrně malého množství nádorové tkáně pacienta, tudíž nám poskytují obrovský zdroj materiálu pro různé pokusy nejen v experimentální biologii. Nalezení optimálních postupů a správnost kultivace je v tomto případě esenciální, o čemž jsem se sama mohla přesvědčit v laboratoři, kdy se postupy či použitá média optimalizovaly za pochodu, tak aby výsledná kultivace organoidů byla co nejvíce efektivní. Přestože je jejich příprava poměrně náročná, organoidy si určitě zaslouží nejen naši pozornost, ale i další studium, jelikož jejich potenciál jako nádorových modelů je určitě velký a do budoucna by tyto postupy mohly být zavedeny třeba i do klinické praxe.

Seznam použité literatury

- 1) Alexakis N, Halloran C, Raraty M, et al. Current standard of surgery for pancreatic cancer. *BJS* 2004; 91: 1410–1427
- 2) Asslaber, M., Zatloukal, K. Biobanks: transnational, European and global networks. *Brief Funct. Genomic. Proteomic.* 2007; 6: 193–201
- 3) Bevilacqua, G., et al. The role of the pathologist in tissue banking: European Consensus Expert Group Report. *Virchows Arch* 2010; 449–454 doi: 10.1007/s00428-010-0887-7
- 4) Budimir, D., et al. Ethical aspects of human biobanks: a systematic review. *Croat. Med. J.* 2011; 52(3), 262-279
- 5) Burrows, M.T. The cultivation of tissues of the chick-embryo outside the body. *Journal of the American Medical Association* 1910; 55(24): 2057–2058
- 6) Carrato A, Falcone A, Ducreux M, et al. A systematic review of the burden of pancreatic cancer in Europe: real-world impact on survival, quality of life and costs. *J. Gastrointest. Canc.* 2015; 46: 201–21
- 7) Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 2016; 165(7), 1586-1597. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.082
- 8) Cree, I., A., et al. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumor tissue. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 10(4), 375-379
- 9) Cunningham, D., Chau, I., et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 5513–5518
- 10) Dabbs, D. *Diagnostic immunohistochemistry*. Vyd. 2. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2006. ISBN 04-430-6652-3

- 11) Davis, J.M. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. Vyd. 2. Oxford: University Press Oxford, 2002. ISBN 0 19 963853 5
- 12) Denemark, L. Chirurgie pankreatu. [online]. Chirurgická klinika 3. LF, Radiodiagnostická klinika 3.LF, 2005. [cit. 2021-01-02], s. 16. Dostupné z: http://chirweb.cz/index.php?action=article&id=727#sub_5
- 13) Dumont, S. *et al.* Organoids of epithelial ovarian cancer as an emerging preclinical in vitro tool: a review. *J Ovarian. Res.* 2019; 12(105) <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0577-2>
- 14) Filipová, A., Mačigová, Z., *et al.* Nádorová tkáňová banka jako zdroj nových důležitých informací k prediktivním a prognostickým faktorům u karcinomu prsu. *Onkologie* 2013; 7(6), 276-280
- 15) Freshney, R. I., *a kol.* *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. Vyd. 7. Hoboken: Wiley Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-87365-6
- 16) Freshney, R.I. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. Vyd. 2. Oxford: University Press Oxford, 1992. ISBN 0 19 963213 8
- 17) Georgakopoulos, N., Prior, N., Angres, B., *et al.* Long-term expansion, genomic stability and in vivo safety of adult human pancreas organoids. *BMC Dev. Biol.* 2020; 20(1), 4. doi: 10.1186/s12861-020-0209-5
- 18) Gillet, J.P., Varma, S., Gottesman, M. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2013; 105: 452–458, <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>
- 19) Halámková, E., *et al.* Regeneration capacity of calli derived immature embryos in spring barely cultivars. *Biologia Plantarum* 2004; 48(2), 313-316
- 20) Hayflick, L.P., Moorhead S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 26: 585-621, ISSN 0014-4827. PMID: [13905659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13905659/)

- 21) Hynds, R.E., Giangreco, A. The relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. *Stem Cells* 2013; 31(3): 417–422
- 22) Jirkovská, M. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-263-3
- 23) Klener, P. *Klinická onkologie*. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-7262-151-3.
- 24) Kočárek, E., a kol. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1069-8.
- 25) Kollárová, H., a kol. Rizikové faktory vzniku karcinomu pankreatu. *Klinická onkologie – časopis České onkologické společnosti* [online]. 2006, roč. 19, č. 6 [cit. 2020-10-21], s. 287-288. Dostupné z: http://www.mou.cz/mou/upload/Rubriky/pro_odborniky/casopis_klinicka_onkologie/KO6_06.pdf. ISSN 0862-495
- 26) Koutecký, J. *Klinická onkologie: celostátní vysokoškolská učebnice pro lékařské fakulty v ČSSR*. Praha: Avicenum, 1989. ISBN 80-86221-77-6.
- 27) Kretschmar, K., Clevers, H. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Developmental Cell* 2016; 38(6): 590–600
- 28) Lancaster, M.A., Knoblich, J.A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; 345(6194): 124-125
- 29) Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2006; 20(2), 197-209
- 30) MacDonald, B., et al. Wnt/Beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* 2009; 17(1), 9-26
- 31) Mařatka, Z. *Gastroenterologie*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-561-2.
- 32) Mihara, E., et al. Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ α -albumin., *eLife* 2016; 5

- 33) Pellegata, S., Sessa, F., Renault, B., et al. *K-ras* and *p53* gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res.* 1994; 54: 1556-1560.
- 34) Petruželka, L., Konopásek, B. *Klinická onkologie*. Praha: Karolinum, 2003. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0395-0
- 35) Povýšil, C., et al. *Speciální patologie*. Vyd. 2. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-494-2
- 36) Procházková, J., Slavík, J., Bouchal, J., Levková, M., Hušková, Z., Ehrmann, J., et al. Specific alterations of sphingolipid metabolism identified in EpCAM-positive cells isolated from human colon tumors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020; 1865(9), 158742. doi: 10.1016/j.bbali.2020.158742.
- 37) Pukkala, E., Andersen, A., et al. Nordic biological specimen banks as basis for studies of cancer causes and control—more than 2 million sample donors, 25 million person years and 100,000 prospective cancers. *Acta Oncol* 2007; 46, 286–307
- 38) Riegman P.H., Dinjens, W.N., Oosterhuis, J.W. Biobanking for interdisciplinary clinical research. *Pathobiology* 2007; 74, 239–244
- 39) Rossi, G., Manfrin, A., Lutolf, M.P. Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics* 2018; 19(11), 1–671
- 40) Ryska, M., Parobková, H., et al. Pokročilý karcinom pankreatu. *Onkologie* 2015; 9(6), 264-267
- 41) Schutte, M., Hruban R., H., Geradts, J., et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57, 3126-313
- 42) Shamir, E. R., Ewald, A. J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15(10), 647–664. doi:10.1038/nrm3873

- 43) Skála, E. Rakovina slinivky břišní [online]. Liga proti rakovině [cit. 2020-11-10].
Dostupné z: <<http://www.lpr.cz/down/publikace/slinivka.doc>
- 44) Strnadel, J., Woo, S., M., et al. 3D Culture Protocol for testing Gene Knockdown Efficiency and Cell Line Derivation. *Bio-protocol* 2018; 8(11), doi: 10.2176/BioProtoc.2874
- 45) Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663–67
- 46) Tiriác, H., Bucobo, J., C., et al. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment. *Gastrointestinal Endoscopy* 2018; 87(6), 1474-1480
- 47) Tüysüz, N. et al. Lipid-mediated Wnt protein stabilization enables serum-free culture of human organ stem cells. *Nat. Commun.* 2017; 8(4578) doi: 10.1038/ncomms14578
- 48) Vacek, Z. *Histologie a histologická technika*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-202-7.
- 49) Way, L. *Současná chirurgická diagnostika a léčba*. Vyd. 1. čes. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-7169-397-9.
- 50) Wilentz, R., E., Goggins, M., Redston, M., et al. Genetic, immunohistochemical, and clinical feature sof medullary carcinomas of the pancreas: a newly described and characterized entity. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1641-1651.

SEZNAM ONLINE ZDROJŮ

- 1) Současné možnosti léčby karcinomu slinivky břišní. *Remedia*.
Remedia.cz [online] [cit. 20.10.2020]. Dostupné
z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Soucasne-moznosti-lecby-karcinomu-slinivky-brisni/6-L-Zt.magarticle.aspx>
- 2) Nádory zhoubné (maligní) . *Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně*. *Linkos.cz*[online] [cit. 24.01.2021]. Dostupné
z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/nador-zhoubny-maligni/>
- 3) Karcinom pankreatu (genetika) – WikiSkripta. *Wikiskripta.org* [online][cit. 20.10.2020]. Dostupné
z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Karcinom_pankreatu_\(genetika\)](https://www.wikiskripta.eu/w/Karcinom_pankreatu_(genetika))
- 4) Replikativní stárnutí – WikiSkripta. *Wikiskripta.org* [online][cit. 20.10.2020].
Dostupné
z: https://www.wikiskripta.eu/w/Replikativn%C3%AD_st%C3%A1rnut%C3%AD
- 5) Pathology Outlines - PAS (Periodic Acid-Schiff). *Pathology Outlines - PathologyOutlines.com* [online] [cit. 03.01.2021]. Dostupné z:
- 6) Základní techniky práce s tkáňovými kulturami –
WikiSkripta. *Wikiskripta.org* [online] [cit. 03.01.2021]. Dostupné
z: https://www.wikiskripta.eu/w/Z%C3%A1kladn%C3%AD_tech_niky_pr%C3%A1ce_s_tk%C3%A1n%C3%99v%C3%BD_mi_kulturam
- 7) SDCM – Mikroskopie organoidů – Optixs. *Optixs.cz* [online] [cit. 03.01.2021].
Dostupné z: <https://www.optixs.cz/aplikace-53/mikroskopie-146/organoidy-jako-krok-smerem-k-personalizovane-medicine-148>
- 8) Tumor Bank – WikiSkripta. *Wikiskripta.org* [online][cit. 20.10.2020]. Dostupné
z: https://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_Bank#cite_note-4

- 9) Molekulární patogeneze karcinomu pankreatu – Gastroenterology and Hepatology. *Csgh.info* [online] [cit. 03.10.2020]. Dostupné z: <https://www.csgh.info/cs/clanek/molekularni-patogeneze-karcinomu-pankreatu-377>

Obrázek 1: Fanconiho anémie - Dostupné z: <https://www.csgh.info/cs/intro>

Obrázek 2: Kultivace organoidů - Dostupné z:

<https://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12861-020-0209-5>

Obrázek 3: Schéma kanonické signální dráhy Wnt – Dostupné z:

[https://www.researchgate.net/profile/Catriona-](https://www.researchgate.net/profile/Catriona-Logan/publication/8241718_Logan_CY_Nusse_R_The_Wnt_signaling_pathway_in_development_and_disease_Annu_Rev_Cell_Dev_Biol_20_781-810/links/54bfcdbd0cf28a63249fe502/Logan-CY-Nusse-R-The-Wnt-signaling-pathway-in-development-and-disease-Annu-Rev-Cell-Dev-Biol-20-781-810.pdf)

[Logan/publication/8241718_Logan_CY_Nusse_R_The_Wnt_signaling_pathway_in](https://www.researchgate.net/profile/Catriona-Logan/publication/8241718_Logan_CY_Nusse_R_The_Wnt_signaling_pathway_in_development_and_disease_Annu_Rev_Cell_Dev_Biol_20_781-810/links/54bfcdbd0cf28a63249fe502/Logan-CY-Nusse-R-The-Wnt-signaling-pathway-in-development-and-disease-Annu-Rev-Cell-Dev-Biol-20-781-810.pdf)

[_development_and_disease_Annu_Rev_Cell_Dev_Biol_20_781-](https://www.researchgate.net/profile/Catriona-Logan/publication/8241718_Logan_CY_Nusse_R_The_Wnt_signaling_pathway_in_development_and_disease_Annu_Rev_Cell_Dev_Biol_20_781-810/links/54bfcdbd0cf28a63249fe502/Logan-CY-Nusse-R-The-Wnt-signaling-pathway-in-development-and-disease-Annu-Rev-Cell-Dev-Biol-20-781-810.pdf)

[810/links/54bfcdbd0cf28a63249fe502/Logan-CY-Nusse-R-The-Wnt-signaling-](https://www.researchgate.net/profile/Catriona-Logan/publication/8241718_Logan_CY_Nusse_R_The_Wnt_signaling_pathway_in_development_and_disease_Annu_Rev_Cell_Dev_Biol_20_781-810/links/54bfcdbd0cf28a63249fe502/Logan-CY-Nusse-R-The-Wnt-signaling-pathway-in-development-and-disease-Annu-Rev-Cell-Dev-Biol-20-781-810.pdf)

[pathway-in-development-and-disease-Annu-Rev-Cell-Dev-Biol-20-781-810.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Catriona-Logan/publication/8241718_Logan_CY_Nusse_R_The_Wnt_signaling_pathway_in_development_and_disease_Annu_Rev_Cell_Dev_Biol_20_781-810/links/54bfcdbd0cf28a63249fe502/Logan-CY-Nusse-R-The-Wnt-signaling-pathway-in-development-and-disease-Annu-Rev-Cell-Dev-Biol-20-781-810.pdf)

