

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Anna Běhounková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Techniky kultivace žaludečních organoidů
Bakalářská práce

2022

Anna Běhounková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Anna Běhounková**
Osobní číslo: **C21148**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Techniky kultivace žaludečních organoidů**
Téma práce anglicky: **Cultivation Techniques of Gastric Organoids**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Zpracujte literární rešerši na dané téma bakalářské práce.

1. Prostudujte a shrňte současný stav výzkumu žaludečních organoidů. Popište historii a využití buněčných modelů žaludku pro výzkumné účely s důrazem na nádorové onemocnění žaludku a polypózy.
2. Detailně popište postupy používané při přípravě žaludečních organoidů. Zaměřte se na různé zdroje buněk, kultivační podmínky, diferenciaci buněk a použité růstové faktory. Popište izolaci buněk z žaludečních tkání (zdravých, nádorových, popř. polypů) odebraných přímo od pacientů.
3. Porovnejte výsledky jednotlivých publikovaných prací, a vyberte nejvhodnější protokol pro úspěšné zavedení těchto organoidů. Vypracujte přehled analýz a metod pro identifikaci žaludečních organoidů. A sestavte přehled markerů, které charakterizují zdravé a nádorové organoidy žaludku.
4. Diskutujte význam organoidů pro výzkum a léčbu onemocnění žaludku, a jejich perspektivy. Bakalářskou práci přehledně zpracujte, použijte obrázky a schémata. Ke zpracování kompilace využijte elektronických databází, např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *WoS*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lenka Šmíd, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Techniky kultivace žaludečních organoidů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2024

Anna Běhounková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Lence Šmíd, Ph.D. za veškeré odborné rady a trpělivost. Děkuji také celé mé rodině a nejbližším za podporu a trpělivost.

ANOTACE

Kultivace žaludečních organoidů představuje inovativní metodu v biomedicínském výzkumu, která umožňuje studium defektů žaludeční tkáně a chorob v prostředí blízkém reálným podmínkám. Tato bakalářská práce se zaměřuje na původce vzniku rakoviny žaludku, technikami kultivace žaludečních organoidů a jejich aplikace v klinické medicíně.

KLÍČOVÁ SLOVA

Organoidy, žaludek, kultivace, cancer

TITLE

Cultivation Techniques of Gastric Organoids

ANNOTATION

Gastric organoids cultivation presents inovative methods in biomedical research which enables the study of gastric tissue defects ant its diseases in a near.real environment conditions. This bachelors thesis focuses on origin of gastric cancer, cultivation techniques and its application in clinical medicine.

KEYWORDS

Organoids, stomach, cultivation, cancer

Obsah

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
ÚVOD.....	11
1 Zdroje buněk.....	12
2 Obecný postup kultivace.....	14
2.1 Druhy kultivace.....	14
2.2 Složení kultivačního média.....	16
3 Vznik rakoviny žaludku.....	18
3.1 Klasifikace rakoviny žaludku	18
3.2 Metody pro zjišťování přítomnosti markerů rakoviny žaludku.....	20
4 Markery.....	22
4.1 Helicobacter pylori	22
4.2 Rakovina žaludku způsobená virem Epstein-Barrové	22
4.3 Protein HER2	25
4.4 Narušení systému oprav chybného párování (MMR) a mikrosatelitní instabilita (MSI)	27
4.5 Genomově nestabilní typ rakoviny žaludku	28
4.6 Chromosomálně nestabilní typ rakoviny žaludku	30
5 Kultivace žaludečních organoidů.....	30
5.1 Izolace buněk	30
5.2 Kultivační média a matrixy.....	34
Závěr	37
Seznam literatury	38

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Zdroje žaludečních kmenových buněk	13
Obrázek 2 Základní rozdíly 2D a 3D kultivace	15
Obrázek 3 Dobře diferenciovaný intestinální typ GC	19
Obrázek 4 Zobrazení nádorových markerů metodou FISH a IHC.....	21
Obrázek 5 IHC obarvení nádorových buněk (hnědé).....	24
Obrázek 6 Zobrazení vybraných nádorových markerů pomocí IHC.	25
Obrázek 7 Imunohistochemická detekce proteinu HER2 (hnědě zbarvené tumorové buňky připomínají písmeno "U").....	26
Obrázek 8 Zobrazení různých vlivů na vznik replikačního stresu buňky.	29
Obrázek 9 Příprava fetálních žaludečních organoidů.....	32
Obrázek 10 Organoidy a asembloidy pod mikroskopem (a, b, d) a imunofluorescenčním mikroskopem (c).....	33

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2D	Dvourozměrný
3D	Trojrozměrný
ASC	Dospělé kmenové buňky (z angl. Adult Stem Cells)
BMP	Kostní morfogenetický protein (z angl. Bone Morphogenetic Protein)
BSA	Hovězí sérový albumin (u angl. Bovine Serum Albumin)
CIN	Chromozomální instabilita (z angl. Chromosomal Instability)
EBV	Vir Epstein-Barrové (z angl. Epstein-Barr Virus)
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	Epidermální růstový faktor (z angl. Epidermal Growth Factor)
ESC	Embryonální kmenové buňky (z angl. Embryonic Stem Cell)
iPSC	Indukované pluripotentní buňky (z angl. Induced Pluripotent Cells)
ISH	<i>In situ</i> hybridizace (z angl. <i>In Situ</i> Hybridisation)
MMR	Systém oprav chybného párování (z angl. DNA Mismatch Repair)
MSI	Mikrosatelitní instabilita (z angl. Microsatellite instability)
ORISC	Kmenové buňky získané z tkáně pacienta (z angl. Organ-Restricted Stem Cells)
PDO	Organoidy získané z tkáně pacienta (z angl. Patient-Derived Organoids)
PBS	Fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (z angl. Phosphate Buffered Saline)
TCGA	Atlas genomů rakoviny (z angl. The Cancer Genome Atlas)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organisation)

ÚVOD

Rakovina žaludku je v dnešní době jedna z nejčastějších příčin úmrtí na světě. V minulých letech byla nazývána „nemoc asijských zemí“ hlavně kvůli jejímu vysokému výskytu především na východě Asie. Nyní je ale reálným problémem západu i evropských zemí, a to především díky zhoršujícím se stravovacím návykům populace. Díky vysoké úmrtnosti je třeba hledat inovativní cesty, které vedou k léčbě této zákeřné nemoci. Jednou z cest je právě kultivace žaludečních organoidů.

Nádorové buňky mohou vznikat buď nějakým mechanickým poškozením žaludeční stěny anebo jsou predispozice vrozené. K poškození žaludeční stěny dochází například v důsledku nakažení mikrobem *Helicobacter pylori*. Další možností je nákaza virem Epstein-Barrové. Některé studie tvrdí, že nadměrné solení nebo nadměrná konzumace alkoholu vede k mechanickým poruchám žaludeční stěny a tím i k vyšší šanci vzniku polypů a následně rakovinných buněk. Mezi vrozené predispozice řadíme genomové či chromosomální nestability způsobené poruchou replikace DNA či vysokým replikačním stresem buňky.

Dlouhou dobu byl jedinou možnou léčbou chirurgický zákrok – gastrektomie. Tento zákrok je sice spojen s excelentními onkologickými výsledky, ale výrazně se jím snižuje kvalita života pacienta. Velký pokrok sledujeme u endoskopických technik, zejména u resekcí. Endoskopie je spojena s menší invazivitou zákroku, kratší dobou rekonvalescence a nižší mortalitou.

Samotná kultivace je velmi náročná. Žaludek je velmi členitý orgán specifický pro každého pacienta. Vytvoření jednotného protokolu pro všechny případy je tedy velmi náročný požadavek. Kultivace se provádí z tkání získaných od pacienta biopsií. Tím je zajištěno, že vykultivovaný organoid bude mít stavbu žaludeční tkáně co nejbližší, ne-li stejnou, s tkání pacientovou. Přesný model pacientovi žaludeční stěny nám poté pomůže při zjišťování reakcí nádorových buněk na různá chemoterapeutika a tím i výběr optimální terapie.

V minulosti byla využívána 2D kultivace. Časem se od ní začalo ustupovat a začala se využívat 3D kultivace. 3D kultivace má hned několik výhod. Jednou z nich je rovnoměrný přístup organoidů k živinám. Tato bakalářská práce se zabývá markery rakoviny žaludku a kultivací žaludečních organoidů.

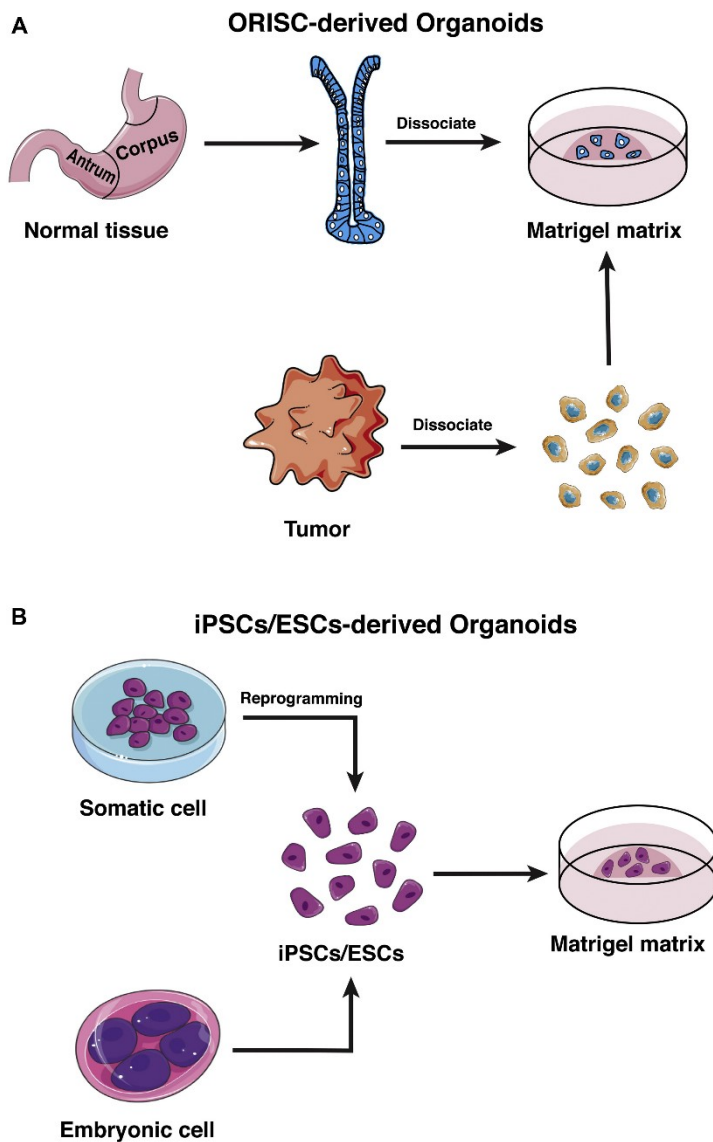
1 Zdroje buněk

Příprava jakéhokoli modelu organoidů je závislá na kultivační technice. U žaludečních organoidů můžeme využít dospělé kmenové buňky (adult stem cells, ASC), umělé pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent cells, iPSC) či embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells, ESC). Tvorba jakýchkoli organoidů z embryonálních kmenových buněk je v současnosti velkým etickým tématem a v této práci se jím zabývat nebudeme. Naopak organoidy získané z ASC a iPSC jsou velmi populární. [1]

PSC buňky jsou získané napodobením sekvenčních interakcí probíhajících během jejich vývoje *in vivo*. Buňky PSC také mají větší potenciál, který umožňuje přímou diferenciaci organoidů podobajících se mnoha dospělým tkáním. Vyšší potenciál také umožňuje koordinovanou generaci buněk více zárodečných listů (to zajišťuje větší variabilitu vznikajících tkání). [2]

Dospělé kmenové buňky, tedy ASC, jsou získány přímo z tkáně daného orgánu (zde tedy žaludku). Jsou připraveny replikací signálních podnětů nativních k příslušné dospělé tkáni. Tyto buňky jsou epiteliální a neobsahují mikroprostředí dané tkáně, čímž značně omezují svůj potenciál v porovnání s PCS. [2]

Velmi oblíbeným zdrojem dospělých kmenových buněk jsou buňky nazývané PDOs, z anglického patient – derived organoids. Tyto organoidy se získávají přímo z biologického materiálu pacienta. Nejčastěji se jedná o ORISCs, tedy organ-restricted stem cells. Tyto buňky jsou získávány přímo z orgánu pacienta. Velkou výhodou takto získaných buněk je velmi vysoká podobnost tkáně orgánu pacienta s tkání kultivovanou, a tedy i případnou specifitější léčbu pacienta. K získání těchto buněk je třeba buď chirurgického zákroku či využití endoskopie. Následně dochází ke zpracování získané tkáně, a to pomocí enzymů pro extrakci nádorových buněk. Méně se pak využívá získávání buněk z tekutého materiálu. Zde se buňky nazývají CTCs (z angl. Circulating tumor cells) a jsou získávány například z krve či dokonce moči. [1]



Obrázek 1 Zdroje žaludečních kmenových buněk [2]

Žaludek zajišťuje mechanické zpracování a trávení přijaté potravy. Vnitřní strana žaludku je vystlána velmi tlustou vrstvou sliznice shrnuté do řas, ty jsou kryty cylindrickým epitelem se specializovanými buňkami. Mezi tyto buňky patří například mucinózní buňky (produkce mukózy), parientální buňky (produkce kyselin, např. HCl) a hlavní buňky (produkce pepsinogenů). [3] [4]

Velká rozmanitost stavby žaludeční stěny je jeden z důvodů, proč je tvorba žaludečních organoidů složitá. I to je důvodem, proč je získávání kmenových buněk přímo z pacienta výhodnější. Lze tak vytvořit mnohem přesnější model vnitřní stavby žaludeční stěny pacienta a tím nastavit specifickou léčbu pacienta.

Tuto domněnku lze podložit studií teamu Jiao Xu et al, kdy jeho tým získal 39 vzorků žaludeční stěny pacientů (z toho 18 zdravých a 21 vzorků s rakovinou žaludku) z biobanky. Tyto vzorky byly dále kultivovány a byly z nich sestaveny přesnější modely žaludečních organoidů. Na těchto modelech bylo následně provedeno několik klinických testů sensitivity na léky (mimo jiné i na chemoterapeutika) u jednotlivých žaludečních organoidů. Bylo zjištěno, že takto vykultivované organoidy, které stavbou odpovídaly tkáni s rakovinou žaludku, vykazovaly rozdílnou sensitivity na dané léky. [5]

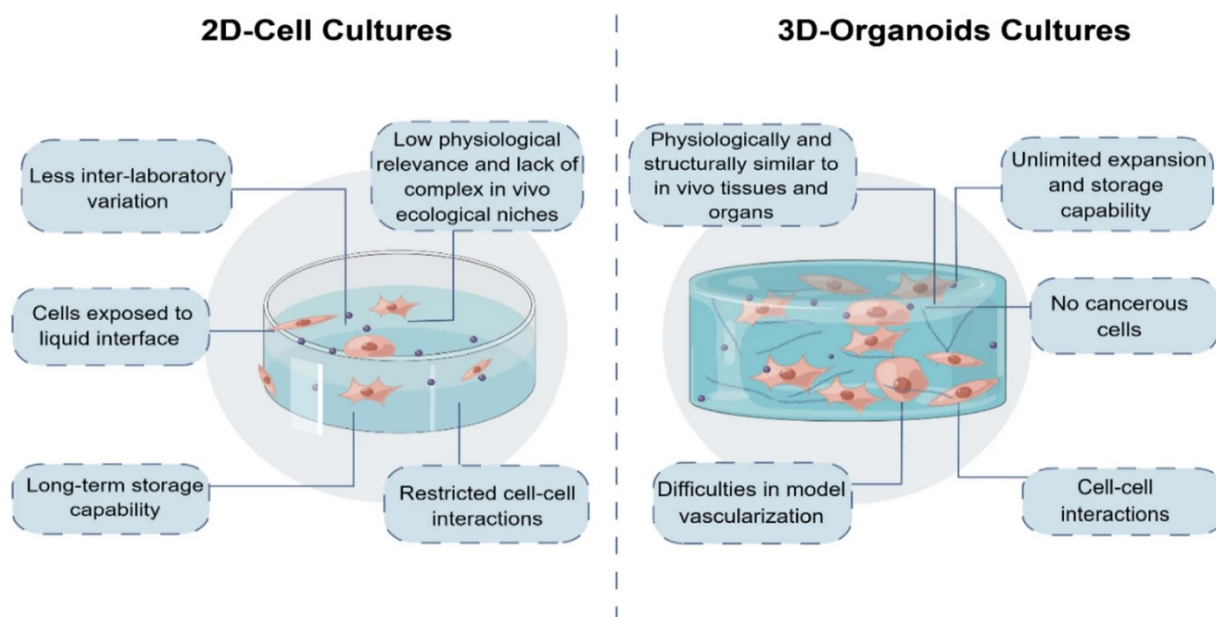
2 Obecný postup kultivace

2.1 Druhy kultivace

V minulosti se pro kultivaci nejčastěji využívaly zvířecí modely. Tento způsob kultivace se ale potkával s četnými otázkami, jako například vysoká cena či etická stránka testů, a výsledky často nebylo možné využít u léčby lidských pacientů. [17]

Vysoké uplatnění *in vivo* kultivace organoidů je při studiích *in vivo* niké kmenových buněk. Simulace signálních cest ve specificky vytvořeném *in vitro* mikroprostředí nám umožňuje pozorovat proliferaci a diferenciaci kmenových buněk. Kultivace žaludečních organoidů se nejčastěji provádí vložením žaludečních žlázek do matrixu (Matrigel) a přidáním variací několika složek (růstové faktory atd.). [1]

Obecně rozlišujeme 2 druhy kultivací, a to 2D a 3D. U 2D kultivací se využívá rovný povrch (př. Petriho miska, mikroskopické sklíčko). Tento způsob kultivace je nejčastěji využíván především při klinických testech a v biotechnologiích. Velmi důležitá je při 2D kultivaci produkce biologických látek (jedná se především o monoklonální protilátky či proteiny). Tyto buňky mohou být následně geneticky upravovány pro produkci specifických proteinů, které jsou sbírány a dodatečně čištěny, aby vytvořily finální produkt. [17,18,19, 20] I přes to, že 2D kultivace je velmi hojně využívaná a přispěla k mnoha poznatkům o vnitřních pochodech buněk, i zde lze najít velkou škálu odchylek buněčných odpovědí. [21]



Obrázek 2 Základní rozdíly 2D a 3D kultivace [21]

Při 2D kultivaci se využívá plochého povrchu jako mechanické podpory pro buňky (př. Petriho miska). To zajišťuje podobný přísun nutrientů a růstových faktorů buňkám, díky čemuž dochází k podobné fázi proliferace všech buněk. Tento systém ovšem neudává rostoucím buňkám jejich tvar, což je problém, protože tvar buněk nám ovlivňuje bioaktivitu *in vivo*. Proto se do matrigelu přidávají mechanické části jako malé ostrůvky, mikrojamky a mikrosloupky. Jednou možností využití je sendvičová kultivace. Ta se využívá při kultivaci hepatocytů, kdy se vrstva hepatocytů vloží mezi dvě vrstvy kolagenu. Další možností je pak mikrovzorkování. Při něm se přímo na ploché ploše tvoří různé vzory a modifikace. Tím vzniká 2D mikroprostředí s unikátními biochemickými faktory, topografií a mechanickou zátěží buněk. [21] Ghuloum et al. využili právě mikrovzorkování při osteogenezi mezenchymálních kmenových buněk. Tato studie propojuje osteogenezi a změnu topografie mikroprostředí přidáním polymerových částic. Bylo zjištěno, že přidáním polymerových mikročástic dochází k podpoře proliferace kmenových buněk. [22] Poslední možností mechanické úpravy matrigelu je modifikace tuhosti. [21] Engler et al. provedl studii, kdy na různě tuhých matrixech pozoroval kmenové buňky. Na měkkém gelu s kolagenem (ten napodoboval mozkovou tkáň) vykazovali mezenchymální buňky charakter neuronů. Na tužším gelu, který napodoboval elasticitu svalů, byly pozorovány buňky podobné myoblastům a na nejtuhších gelech se objevil charakter osteoidů. [23]

Druhou možností je kultivace kmenových buněk v trojrozměrném (3D) mikroprostředí. Tvorba a distribuce interakcí v systému buňka-buňka či buňka-ECM ovlivňují základní chování

buněk, čímž je ovlivňováno i chování určitých orgánů. [21] 3D kultivační techniky jsou založené na aplikaci a vývoji dvou druhů matrixu, a to syntetického a přírodního. Nejčastěji používaným matrixem je matrigel. Je to přírodní matrix získávaný z basálních membránových proteinů Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) chondrosarkomu myši. Syntetické matrixy jsou tvořené polymerními materiály získané pomocí bioinženýrství. Jejich výhodou je porézní struktura a stabilní mechanické vlastnosti. [1] Při porovnání buněčných shluků při 3D kultivaci si můžeme povšimnout výrazného rozdílu růstu buněk uprostřed matrigelu a na jeho okrajích. To je způsobeno vznikajícím nutričním gradientem a hromaděním odpadních látek. Povrch matrigelu obsahuje nejvyšší počet proliferací buněk, vnitřek matrigelu pravý opak. Existuje několik technik pro 3D kultivaci. Jednou z možností je kultivace v biopolymerním skeletu. Mezi nejvíce využívané přirozené biopolymery patří kyselina hyaluronová, želatina či kolagen. Méně často se poté setkáváme s biopolymery nepocházejícími ze savců. Především se jedná o chitosan či alginát. Další možností je předpřipravená skelet. Ten nabízí přizpůsobené biochemické složení a elasticitu matrixu. Mohou být vytvořeny 3D tiskem, lyofilizací či jiným způsobem. Jednou z možností je také využití hydrogelů. Oproti předpřipraveným skeletům jsou hydrogely hojně využívány, a to především pro jejich schopnost kapsulace buněk. Také poskytují vodu (ta je velice podobná složení tkáňové vody) a jsou lehce přizpůsobitelné biochemické a mechanické části. [21]

2.2 Složení kultivačního média

Pro kvalitní kultivaci žaludečních organoidů získaných z rakovinných tkání pacienta je třeba nejdříve izolovat žlázy žaludeční stěny. Pro izolaci lze využít dvou metod: první metoda je mechanická. Jednotlivé buňky se získají jemným seškrábnutím z tkáně do kultivační misky. U druhé, častěji využívané metody, se využívá enzymatická aktivita buněk. Enzymy využívané pro enzymatický rozklad buněk se liší v závislosti na podmínkách a druhu rozkládaných buněk. [1]

Takto získané buňky se nejčastěji kultivují v prostředí Matrigelu. Matrigel je solubilizovaný přípravek získaný z myšího sarkomu. Tento přípravek obsahuje mimo jiné řadu růstových faktorů a velkou škálu proteinů. To buňkám poskytuje látky, které potřebují k růstu. Patří mezi ně například glukosa či neesenciální aminokyseliny. Důležitými složkami Matrigelu jsou také epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastický růstový faktor 10 (FGF10), R-spondin-1, Noggin, Wnt-3a, inhibiční molekuly gastrinu, A83-01 a SB202190. [2]

V živých buňkách je nastavena rovnováha mezi normální funkcí buňky a buněčnou smrtí. Tato rovnováha je závislá na okolním prostředí buňky, kdy i při nejmenších změnách může docházet k buněčné smrti apoptózou. A právě epidermální růstový faktor je jedním z nejdůležitějších extracelulárních faktorů pro udržení této rovnováhy. EGF se váže na speciální rodinu receptorů ErbB a tím vyvolává specifické apoptické reakce. Tyto reakce jsou závislé mimo jiné na koncentraci EGF v okolním prostředí. Pokud je koncentrace EGF menší, tak je buňka více náchylná k apoptóze. A právě schopnost EGF zabraňovat apoptóze využívají rakovinné buňky. Rakovinné buňky mají schopnost odolávat prostředím navozujícím apoptózu, což je i vlastnost, kterou EGF „ukradnou“ (EGF buňce poskytuje signál pro její přežití). Pro úspěšné zneškodnění rakovinných buněk poté dochází pomocí zaměření signálních cest EGF. Díky tomu dochází v buňkách k apoptóze a jsou tak citlivé vůči radiaci a chemoterapii. [7]

Fibroblastický růstový faktor 10 (FGF10) hraje hlavní roli při vývoji orgánů a homeostáze. V některých knihách je nazýván také keratinocytární růstový faktor 2 (KGF2). Aktivuje především receptory FGFR2b a FGFR1b a tím podporuje fosforylaci a intracelulární signály. FGF10 nacházíme v mezenchymálních buňkách. Podporuje morfogenezi a mimo jiné i diferenciaci a proliferaci tkání. [7] [8]

Noggin je protein poprvé izolovaný z žab rodu *Xenopus*. Je zodpovědný za růst kostí, svalových, a především nervových tkání. Při růstů tkání je důležitá rodina kostních morfogenetických proteinů (BMP). Ty, díky jejich schopnosti regulace proliferace a diferenciaci, hrají zásadní roli při vývoji a růstu mnoha druhů tkání v organismu. Jejich působení je velmi přísně regulováno mnoha protagonisty a antagonisty. Jedním z antagonistů je právě protein Noggin. BMP se váží na specifické membránové receptory a tím vznikají nové signální cesty. A právě tyto cesty jsou buď podporovány či regulovány. Jejich regulace probíhá pomocí Nogginu, který se naváže přímo na BMP receptory a tím zamezí navázání BMP. Nové studie se také zabývají neuroprotektivními schopnosti Nogginu při ischemii, kdy Noggin podporoval myelinizaci v ischemickém mozku. To, zdali Noggin podporuje myelinizaci bylo analyzováno použitím ^1H nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. Tou bylo zjištěno, že buňky léčené s přídatkem Nogginu inhibovaly projevy ischemie, a naopak zvyšovaly koncentraci aminokyselin a glukosy v extracelulárním prostředí. [9] [10]

Wnt-3a je protein, který je velmi důležitý při vývoji nervové soustavy. Nejčastěji se vyskytuje v dorsální části míšní tkáně (zde dochází k regulaci tvorby a diferenciaci neuronů). [11] Výše jsem se věnovala kostnímu morfogenetickému proteinu a jeho vlivu na funkci proteinu ogginu.

Jedním z důležitých proteinů BMP je BMP-2. BMP-2 je chondrogenní protein. Zvýšením koncentrace tohoto proteinu dochází ke zvýšení hladiny proteinu β -katenin. Tento protein je spojovaný s přenosem signálu Wnt kaskády a tím nasvědčuje k možnému funkčnímu propojení mezi BMP-2 a Wnt signálními cestami. [12] Toto propojení může podporovat tvorbu nádorových buněk. Zde je tedy jasně viditelné propojení mezi produkcí Wnt-3a proteinu a BMP, případně BMP-2.

Proteiny v rodině R-spondin je skupina 4 lidských sekrečních proteinů spojených s aktivací β -kateninu. Tato skupina proteinů hraje hlavní roli při růstu, diferenciaci, migraci a funkci kmenových buněk. Pro kultivaci se využívá R-spondin 1. Nedávný výzkum ukázal, že pokud dojde k nadměrné expresi toho proteinu dochází k aktivaci β -kateninu v gastrointestinálních kmenových buňkách a tím dochází ke zmírnění projevů způsobených chemoterapií. [13]

A83-01 je inhibitor I. typu TGF- β receptoru. Tyto receptory vážou růstové faktory (například i BMP) a tím omezují epitel-mezenchymální tranzici. Předchozí studie potvrdily pozitivní vliv A83-01 na proliferaci buněk. [14]

Jako jednou z posledních složek matrigelu, kterou se tu budu zabývat, je SB202190. SB202190 je selektivní inhibitor MAP kinázy. Tyto kinázy se účastní například mitózy, buněčné diferenciace či apoptózy. Tyto proteinkinázy jsou aktivované mitogenem p38. [15] [16]

3 Vznik rakoviny žaludku

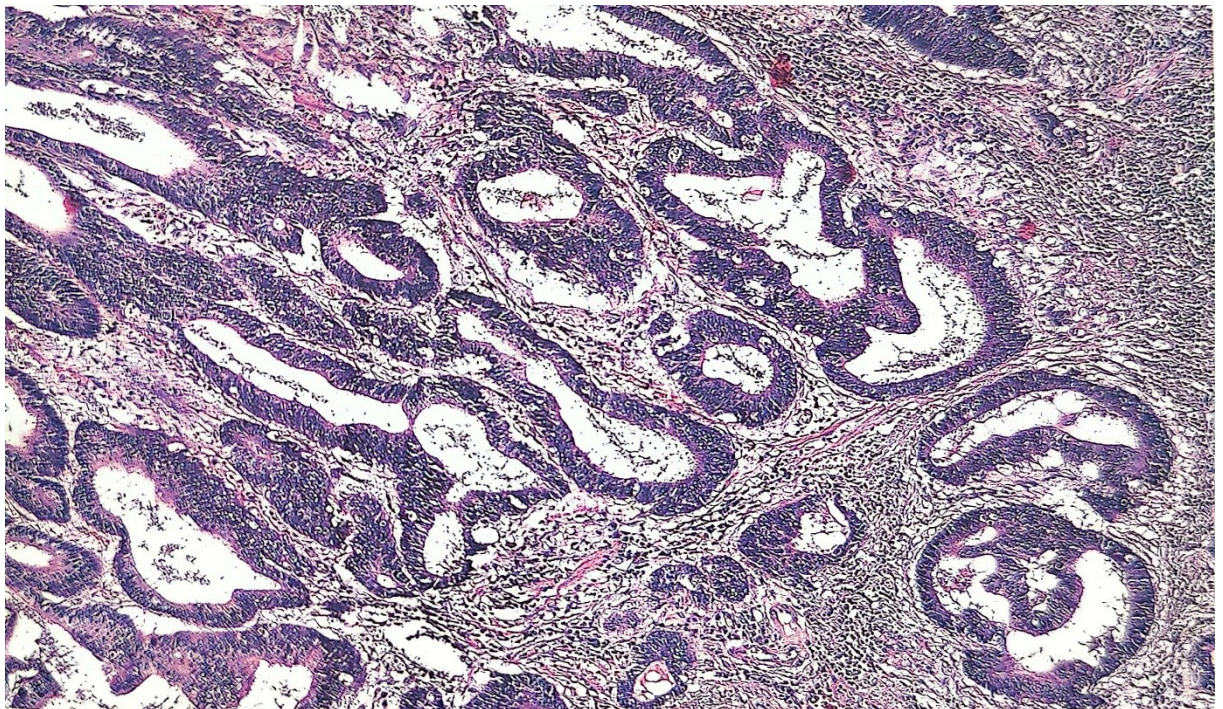
Rakovina žaludku je podle nejnovějších dat Světové zdravotnické organizace (WHO) šestou nejčastější formou rakoviny na světě (na prvním místě je rakovina prostaty). [24] Žaludeční epitel je poškozen mnoha environmentálními a endogenními stresy, které jsou následně spravovány dynamickou homeostázou řízenou žaludečními kmenovými buňkami. K již zmíněnému poškození může dojít vlivem mikrobu *Helicobacter pylori*, požíváním alkoholu a mimo jiné i kouřením. Všechny tyto vlivy způsobují metaplázii, přesněji spasmolytickou metaplázii exprimující polypeptid (SPEM). [25]

3.1 Klasifikace rakoviny žaludku

Z biologického i genetického pohledu je rakovina žaludku velmi různorodá. Zde musím zmínit výrazný rozdíl proximální a distální části žaludku. Tento fakt je podporován výrazným histologickým i molekulárním rozdílem těchto částí. Díky vysoké heterogenitě je možné klasifikovat různé druhy rakoviny žaludku. Nejčastěji využívanou klasifikací je Laurénova.

Ta nám GC rozděluje podle morfologie, epidemiologie, progresu, recidivy či genetických profilů. Podle této klasifikace je GC rozdělena na intestinální, difúzní, smíšenou a neurčenou. Intestinální rakovina je nejčastějším typem GC. Je lokalizována v distální části žaludku a její tumory pevně přiléhají na okolní tkáň. [28] Tento typ je charakteristický žlázovým vzhledem tkáně podobným karcinomu tumoru tlustého střeva. [26] Difúzní typ nalézáme u zhruba třetiny všech případů. Charakteristická pro ni je špatná přilnavost tumorů k okolním tkáním, což je spojováno s mutacemi CDH1 genu. CDH1 gen kóduje protein e-cadherin, který zajišťuje přilnavost buněk. [28] Difúzní typ nalézáme v poškozených částech žaludeční tkáně, kde rostou buď samostatně či v menších skupinách buněk, a narušují jejich obnovu. [26] Výskyt tohoto typu GC je závislý mimo jiné na genetických predispozicích jedince. U smíšených a neurčených typů rakoviny žaludku nelze přesně určit k jakému typu patří. [28]

Ke klasifikaci rakoviny žaludku lze využít i klasifikaci dle organizace WHO. Ta ji rozděluje na tubulární, papilární, mukosní, málo přilnavé a smíšené karcinomy. Při porovnání těchto klasifikací nenalezneme žádné významné odchylky. Hlavním rozdílem je to, že klasifikace WHO je založena výhradně na histopatologických vlastnostech, kdežto Laurénova především na vlastnostech morfologických. [28]



Obrázek 3 Dobře diferenciovaný intestinální typ GC [28]

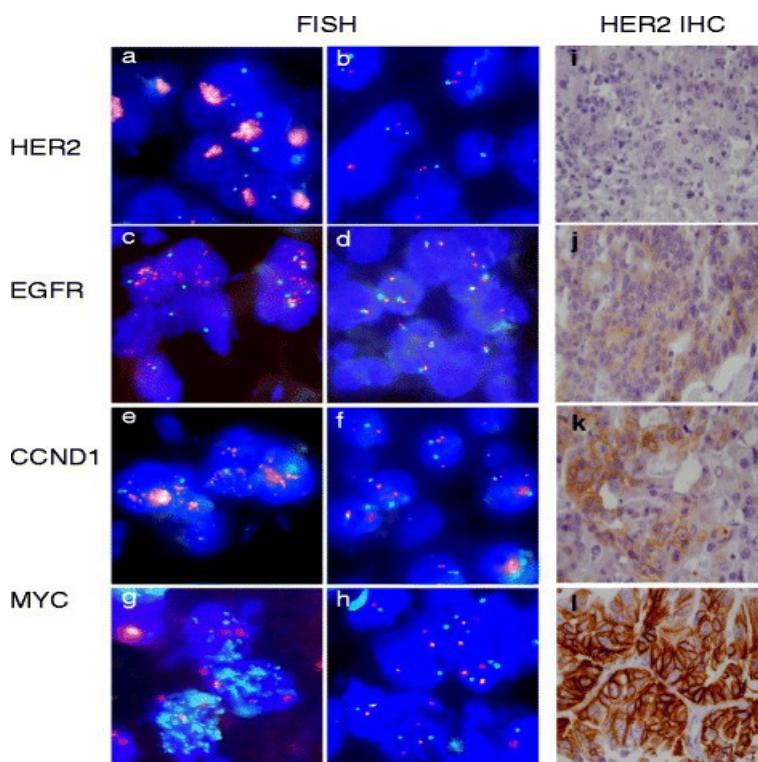
Tumor žaludečního karcinomu často vykazuje organoidní vlastnosti, a to nezávisle na jeho histologickém vzhledu. U intramukózních karcinomů vykazujících organoidní diferenciaci

můžeme nádorové buňky sledovat v horních vrstvách (lamina propria), kde kryjí epiteliální část tkáně. V nižších vrstvách nacházíme glandulární či mukózní typy nádorových buněk. Střední vrstva je složena z nedospělých nádorových buněk bez diferenciačních markerů. Toto rozdělení organoidů je velmi důležité, protože narušení intramukózní organoidní diferenciacce je zásadní pro invazi karcinomu do submukózních tkání. [31] O rozdělení potenciálních buněčných markerů rakoviny žaludku se zajímal tým Fujimori et al. [31]. V jejich výzkumu figurovalo 104 případů pacientů s rakovinou žaludku (z nich bylo 68 případů časně fáze rakoviny a 36 pokročilých případů). Vzorky byly získány chirurgicky. Ihned po zákroku byly inkubovány po dobu 1 hodiny při 37°C v roztoku obsahujícím 2 mg/ml bromodeoxyuridinu (ten se využívá pro studování proliferace buněk v živých tkáních a mimo jiné i k diagnostice rakoviny), kdy okolní tlak byl 3 atmosféry a obsahoval 95 % O₂ a 5 % CO₂. Poté fixovány 1 hodinu v 70 % ethanolu, dehydratovány, vyčištěny v xylenu a zality v parafínu. Pro zvýraznění a identifikaci vzorků bylo použito alciánové modři. Modře zbarvené části buněk tvořily povrchové mukózní buňky, naopak hnědě zbarvené buňky byly buňky žlázové mukózní. Při hodnocení výsledků byly karcinogenní buňky nalezené v jednotlivých vzorcích rozděleny do 7 skupin, šlo o rozdělení závisící na jejich histochemických podobnostech s normální tkání. V jedné buňce bylo nalezeno i několik různých druhů karcinogenních faktorů. V intestinálním typu rakovinných buněk byl pozorován protein pepsinogen I. Pepsinogen I pozitivní buňky byly také pozitivní pro pepsinogen II a muciny. Pepsinogen II pozitivní buňky byly pozorovány u 25 ze 104 případů (25 %). Nejčastěji byly nalezeny ve fundické či pylorické části žaludku. Bez ohledu, zdali se jednalo o difúzní či intestinální typ karcinomu, organoidní diferenciacce byla nalezena v pouze intramukózní nádorové tkáni, nikoli však v nádorové tkáni zasahující do jiných částí žaludeční stěny a byla rozdělena na dva hlavní typy – žaludeční a metaplastickou intestinální rakovinu žaludku. [31]

3.2 Metody pro zjišťování přítomnosti markerů rakoviny žaludku

Pro molekulární analýzu jsou nejčastěji využívány dva přístupy, a to buď detekce změn genů či exprese proteinů v tkáni. Pro analýzu změny genů je nejčastěji využívána amplifikace genů. Pro zjištění se využívají metody jako *in situ* hybridizace (ISH) – buď fluorescenční ISH (FISH), chromogenní ISH (CISH) nebo ISH se stříbrem (SISH). Méně používanou metodou je pak real – time PCR nebo sekvenování nové generace (NGS). [28] NGS zahrnuje několik důležitých kroků. Prvním je fragmentace DNA, kdy pomocí mechanických metod či enzymatickému trávení dochází k rozkladu námi mířené DNA na krátká segmenty (většinou o velikosti 300-500 bp). Mezi mechanické metody patří například sonikace, tedy využití zvuku.

Dalším krokem je příprava sekvenační knihovny. Zde dochází k úpravám DNA segmentů tak, aby každý vzorek byl specifický k danému pacientovi – vytváří se tedy takzvaná index (často je ukončen oligonukleotidy, ty zabraňují dalšímu sekvenování). Takto vzniklý index je poté podroben samotnému sekvenování. Vzorek ze sekvenační knihovny je nahrán na sekvenční matici a tím začíná paralelní sekvenování vzorku. Získané sekvenční informace jsou následně zpracovávány pomocí počítačového softwaru. Ten zahrnuje určování bází či identifikaci a anotaci jejich různých variant. Během tohoto procesu je sekvenování genomu pacienta porovnáváno s lidským genomem a tím se získávají informace o případných mutacích. Velkou výhodou NGS je schopnost analyzovat stovky až tisíce cílů najednou. Znamená to tedy, že veškeré mutace způsobené nádorovým onemocněním mohou být odhaleny v jednom testu. [35]



Obrázek 4 Zobrazení nádorových markerů metodou FISH a IHC. [40]

Pro expresi proteinů v tkáni je nejčastěji využíváno imunohistochemie (IHC). V určitých situacích se dá pro posouzení jednoho markeru využít více metod. Typickým příkladem tohoto markeru je protein HER2, kde analýzou amplifikace genu využitím metody ISH (nejčastěji FISH či SISH) a exprese proteinů pomocí imunohistochemie, dochází k výběru pacientů pro léčbu pomocí anti-HER2 terapie. [28]

4 Markery

Marker je obecně definován jako molekula, kterou nacházíme v tělních tekutinách, či tkáních, a indikuje normální či abnormální procesy probíhající v těle. Sledování markerů se využívá při sledování změny tkání z normálních zdravých na tkáně abnormální. Změny markerů mohou nastat hned při několika situacích, jako například u modifikací zárodečných linií, somatických mutací, transkripčních změn či epigenetických modifikací. Již bylo identifikováno mnoho markerů a mnoho z nich je považováno za možné markery nádorové. [25]

4.1 *Helicobacter pylori*

Jak již bylo řečeno, nejčastějším faktorem vzniku rakoviny žaludky jsou nemoci blízce spojené s nákazou mikrobem *Helicobacter pylori*, a to především chronická gastritida, atrofie žaludečního epitelu, střevní metaplazie a dysplazie (preneoplastické léze). [26] Wongsuwankert et al [27] zkoumali vzorky žaludečních biopsií, slin a plaku získaných z ústní dutiny u 11 zdravých pacientů, 15 pacientů s gastritidou a 15 pacientů s rakovinou žaludku. V odebraných vzorcích analyzovali pomocí kultivace a real-time PCR výskyt *Helicobacteru pylori* (pomocí výskytu *cagA* a *vacA* genů). [26] *CagA* hraje důležitou roli při karcinogenezi GC. Díky své schopnosti inhibice specifických proteinů (mimo jiné proteinů apoptických) slouží jako onkogenní faktor při aktivaci rakovinné signální cesty. [29] *VacA* gen je jeden z faktorů virulence *Helicobacter pylori*. Jedná se o toxin schopný formovat póry díky čemuž dochází k tvorbě vezikul v žaludečních buňkách. Také produkuje protein, který může způsobovat supresi aktivace T-lymfocytů a podporovat vznik zánětlivých reakcí. Tento gen má velmi variabilní stavby, což podporuje jeho postavení jako faktoru virulence [30] U pacientů s rakovinou žaludku byla jasná převaha výskytu *Helicobacteru pylori* u obou vyšetření. [26]

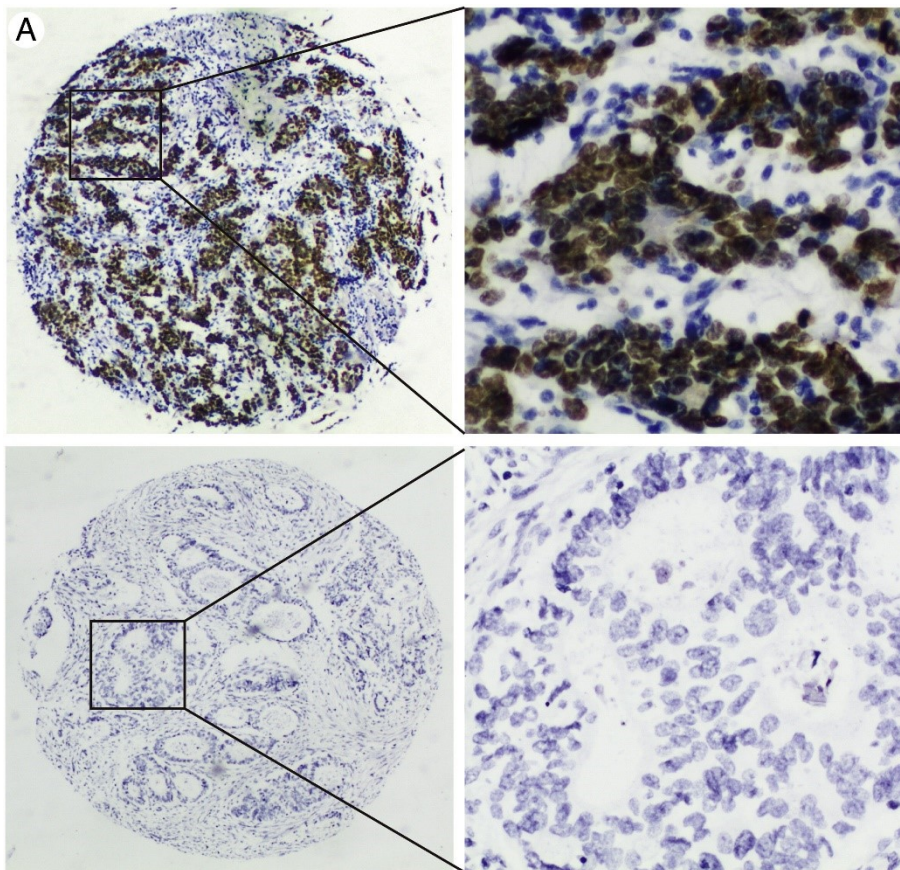
4.2 Rakovina žaludku způsobená virem Epstein-Barrové

Menší část žaludeční rakoviny vzniká nákazou virem Epstein-Barrové (EBV). [28] EBV je všudypřítomný virus, kterým se nakazí zhruba 90 % veškeré populace. Latentní infekce EBV je spojena s několika typy neoplastických a pár epiteliálních malignancí, mimo rakovinu žaludku i s nasofaryngeálním karcinomem. Zhruba 10 % všech případů GC je způsobeno právě díky přítomnosti EBV. GC způsobená přítomností EBV v těle pacienta má několik speciálních charakteristik, například převahu u mužů či preferovanou lokaci v proximální a spodní části žaludku. Podle Laurenova rozdělení se jedná především o difuzní typ s relativně příznivou prognózou. Na základě jasných charakteristik GC způsobenou EBV TGCA nedávno navrholo

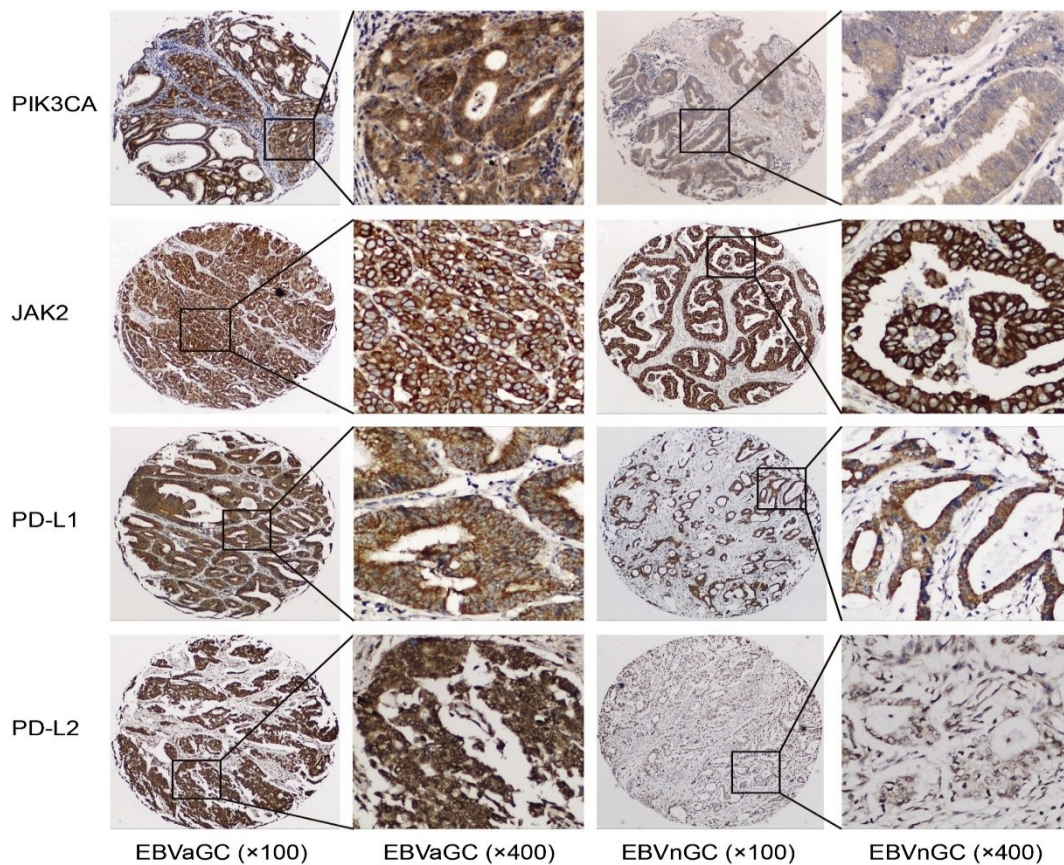
novou molekulární klasifikaci GC, a to na EBV-pozitivní, mikrosatelitní nestabilitu, genomově stabilní a chromosomálně nestabilní typ. [32] U pacientů s pozitivním výsledkem na EBV se velmi často vyskytují mutace určitých genů, a to především PI3K/Akt/mTOR signálních cest. Přesněji se jedná o PIK3CA, ARID1A, JAK2 a BCOR. PIK3CA (katalytická podjednotka alfa fosfatidylinositol-4,5-bifosfát 3-kinázy) signály se mimo jiné podílejí na správném růstu, migraci a proliferaci buněk. [28] Při aktivaci cesty PI3K dochází k fosforylaci fosfatidylinositolu 4,5-bifosfátu (PIP2) na fosfatidylinositol 4,5-trifosfát (PIP3). Tímto následně nastává fosforylace Akt protein kinázy, což je zakončeno regulací několika aktivit, mimo jiné právě i proliferace, růstu či přežití buněk. [32] Některé studie také potvrdily korelaci mezi JAK2, CD - 274, PDCD1LG2 a ERBB2. [28]

Janus kináza 2 (JAK2) je všudypřítomná nереceptorová tyrosinkináza. Ta má schopnost fosforylovat signální převodníky a aktivátory transkripce proteinů. Tím jsou převáděny veškeré signály putující z povrchu buňky do jádra a eventuálně může dojít i k regulaci transkripce genů souvisejících s proliferací či apoptózou buněk. [32]

CD-274, také známý pod zkratkou PD-L1 (programmed death ligand 1), je velmi důležitý pro kostimulování PD-1/PD-L1, PD-L2 dráhy. Ty hrají důležitou roli při úniku tumorových buněk imunitnímu systému. PD-1 na cytotoxických T-buňkách interaguje se svými ligandy PD-L1 a PD-L2 (ty jsou expresovány některými zánětlivými elementy a neoplastickými buňkami). Právě tyto interakce jsou využívány nádorovými buňkami jako mechanismus k uniknutí detekce imunitním systémem. Exprese PD-L1 byla dokázána ve velkém spektru maligních tumorů (uroteliální karcinomy, nádory krku a hlavy, ...) nebo u maligních melanomů. [28] Vysoká exprese PD-L1 v nádorových buňkách se ukazuje jako velmi důležitý mechanismus pro jejich únik před imunitním systémem. [32] Ve své studii Dong et al [32] studovali expresi a prognostické vlastnosti dříve zmíněných signálních cest a proteinů. Studovali vzorky od 855 pacientů, kteří podstoupili gastrektomii. Využili metodu ISH a imunohistochemické obarvení. ISH potvrdilo výskyt EBV v nádorových buňkách (hnědé části, viz. Obr.4.). PIK3CA, JAK2, PD-L1 a PD-L2 byly lokalizovány především v cytoplazmě nádorových buněk. EBV pozitivní případy ukazovaly silnější zabarvení PIK3CA a PD-L2 než EBV negativní. [32]



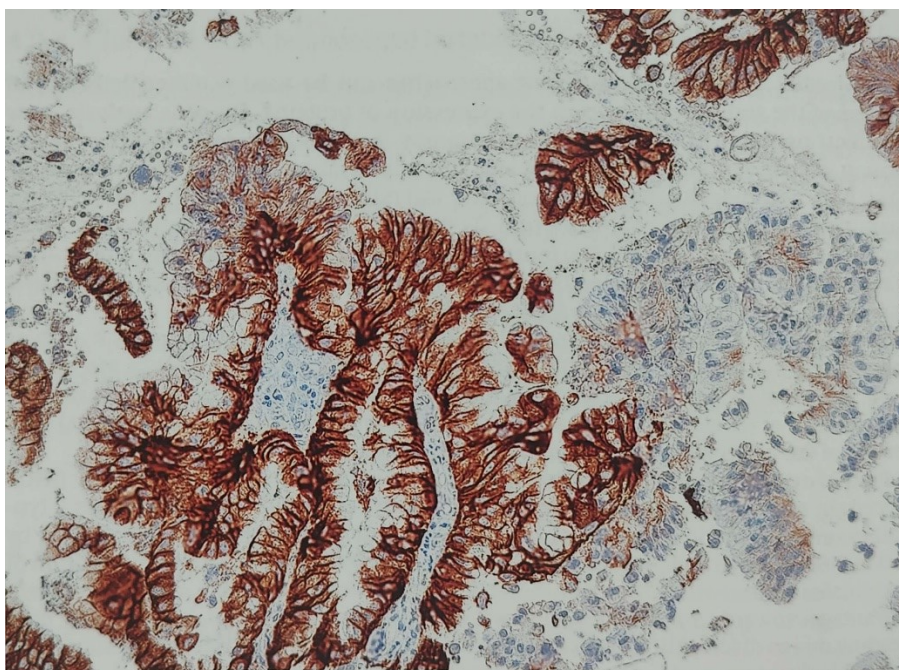
Obrázek 5 IHC obarvení nádorových buněk (hnědé). [32]



Obrázek 6 Zobrazení vybraných nádorových markerů pomocí IHC. [32]

4.3 Protein HER2

ERBB2 kóduje protein HER2 na 17. chromozomu. [28,34] Tento protein je jedním ze 4 členů rodiny epidermálního růstového faktoru (společně s HER1, HER3, HER4). Ten aktivuje PI3K/Akt signální cesty a tím hraje roli v proliferaci, adhezi a diferenciaci buněk. Několik studií dokazuje, že vysoká exprese tohoto proteinu je spojena zejména s intestinálním typem nádoru a méně často pak s typem difúzním. Proč je různá pozitivita tkáně na HER2 proteiny v různých histologických částech žaludku rozdílná zatím není známo. [28]



Obrázek 7 Imunohistochemická detekce proteinu HER2 (hnědě zbarvené tumorové buňky připomínají písmeno "U") [28]

Tým Ma et al [33] nedávno zjistil, že kombinace HER2 a PD-1 inhibitorů při léčení pokročilé fáze rakoviny žaludku má synergický efekt. Pacientovi s HER2 pozitivní rakovinou žaludku se po operaci navrátily rakovinné útvary a metastáze po podstoupení chemoterapie a radioterapie. Jako druhá fáze léčení byl pacientovi nasazen lék trastuzumab (humanizovaná monoklonální protilátka IgG1) kombinovaný s paclitaxelem vázaným s albuminem. Paclitaxel zneškodňuje nádorové buňky zamezením normálního rozpadu mikrotubulů při buněčném dělení. Albumin slouží jako taková „Dopravní služba“. Podání této kombinace prodloužila pacientovi život o 9 měsíců. Pro třetí fázi léčby byl ponechán trastuzumab. Byl ovšem kombinován s camrelizumabem a apatinibem. I přes to, že pacient dva později jmenované léky kvůli vedlejším účinkům přestal brát, byl jeho život prodloužen o zhruba 10 měsíců. Díky pozitivnímu vlivu na inhibitorů byl do léčby zahrnut další inhibitor, a to inhibitor PD-1 (společně s pokračujícím podáváním trastuzumabu). I to zajistilo prodloužení života pacienta o 4 měsíce.

Léčba pomocí trastuzumabu je zvolena pouze u určitého počtu pacientů. Aby tato léčba byla prospěšná, musí být přítomen právě protein HER2. Bohužel, GC je příklad maligního nádorového onemocnění s vysokým stupněm heterogenity (alespoň co se týče přítomnosti HER2 proteinu), jejíž výsledkem je přehodnocení postupů používaných u rakoviny prsu (tumory obsahují také HER2). Hodnocení výskytu HER2 proteinu z několika vzorků získaných gastrektomií nabízí k vyšší přesnosti predikce vhodnosti pacienta pro léčbu anti-HER2 terapií

než testování vzorku získaným endoskopickou biopsií. Při hodnocení výskytu HER2 proteinů pouze ze vzorků získaných z bioptického materiálu může dojít k falešně negativním, méně často k falešně pozitivním výsledkům. Testování malých bioptických vzorků na HER2 by mělo být provedeno resekci či vzorku odebraném přímo z metastáze. [28]

4.4 Narušení systému oprav chybného párování (MMR) a mikrosatelitní instabilita (MSI)

Narušení systému oprav chybného párování (MMR) hraje důležitou roli při začínající GC. Mezi klíčové geny MMR patří MSH2, MLH1, MSH3, MSH6, PMS1 a PMS2. Mezi další geny patří například EXO1, TREX1 či TP73. Hlavní rolí MMR systému je identifikace a následná oprava inkompatibilního párování bazí DNA vzniklých při její replikaci a rekombinaci. Jakékoliv nedostatky tohoto systému způsobují mikrosatelitní instabilitu (MSI). [36] Mikrosatelity jsou krátké sekvence DNA opakovaně se vyskytující v lidském genomu. Díky své vysoké repetitivitě mají větší náchylnost k mutaci. [37] Ty se nám jeví jako strukturní nadbytek či naopak ztráta v jednoduchých opakovaných sekvencích DNA. Akumulace takto vzniklých chyb zvyšuje počet spontánních mutací celých genomů a tím dochází k inaktivaci tumor supresivních genů a následné karcinogenezi. [36] Analýzu funkce MMR systému je prováděna imunohistochemicky, a to použitím protilátek proti čtyřem hlavním komponentům MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6). U speciálních případů je nutné využít i molekulární analýzu mikrosatelitů. [28] S vývojem NGS dochází i k vývoji alternativních výpočetních metod k odvozování MSI pomocí dat mířených buď přímo na určitou DNA, exom či genom (MSIsensor, ...). Ostatní metody využívají ortogonální predikční metody založené na expresi genů nebo kombinaci úrovní metylace DNA a mutací v genech MMR systému. [37] Na základě tohoto předpokladu představil tým Santamarina-García et al [37] prediktivní metodu pro analýzu MSI s potenciálem pro využití i u tekutých vzorků. Metoda je založena na predikci MSI pomocí metylace DNA. Tým testoval 388 vzorků získaných z TCGA. I přes původní plán využití pouze u kolorektální rakoviny, tým zjistil i úspěch u detekce GC. Ve studii je ovšem doporučeno bližší prozkoumání možnosti využití této metody pro GC. Výhodou detekce metylace DNA je menší šance získání zkreslených výsledků (například somatickými mutacemi získanými z normální tkáně či benigním onemocněním).

MSI GC je častěji diagnostikována u starších pacientů, a to v distální části žaludku. Jak již bylo řečeno, inaktivací MMR systému dochází k poruše opravných mechanismů a k akumulaci různých mutací genomu. Tyto nesourodé mutace jsou zodpovědné za zvýšení neoantigenů. Neoantigeny jsou proteiny s abnormální konformací, které systém rozpoznává jako cizí

struktury, čímž dochází k vyvolání imunitní odpovědi organismu. Čím více je v těle neoantigenů, tím vyšší je pravděpodobnost, že budou identifikováni antitumorovým imunitním systémem. Nádory s vyšším počtem neoantigenů lépe odpovídají na léčbu inhibitory, například ipilimumab. Tím se pacienti s MSI pozitivními tumory stávají kandidáty pro tento typ léčby. Prevalence GC způsobené MSI tvoří zhruba 10 % všech případů je nelogické testovat každý případ GC na tento typ (ať už imunohistochemicky či molekulárně). Vyšetření pacientů na MSI může také sloužit jako jeden z hlavních prognostických markerů. [28]

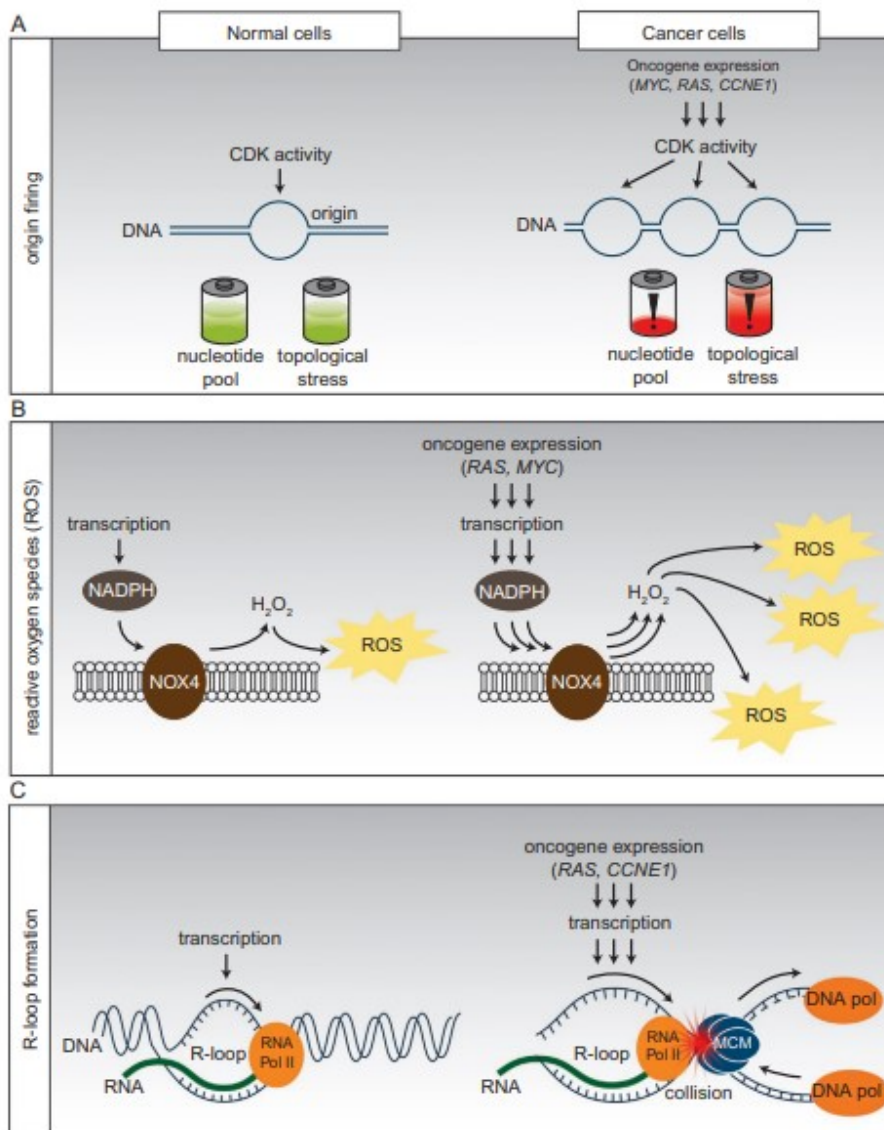
4.5 Genomově nestabilní typ rakoviny žaludku

Genomově nestabilní rakoviny jsou charakterizovány progresivními ztrátami a zisky fragmentů chromozomů a akvizicí komplexního genomového přeskupení, díky čemuž dochází k neúspěšné léčbě. Tyto typy rakovin často vykazují vysokou agresivitu. Při replikaci je buňka vystavena vysokému stupni replikačního stresu, stejně tak vysoké možnosti poruchy replikační vidličky. Replikační stres se projevuje například zpomalením či zasekávající se samotnou replikací. Vysoký stres způsobuje chromosomální nestabilitu a tím podporuje vznik rakovinných buněk, což představuje hrozbu pro životaschopnost buněk. Buňky s vysokým replikačním stresem si našly cestu, jak se s ním vypořádat. Při replikaci se buňka dostává do takzvané intra-S fáze (také kontrola replikace). Zde dochází ke zpomalení replikace a tvorbě dlouhých jednovláknitých DNA. Ty jsou následně rychle zakryté replikačním proteinem. Zpomalení replikace je nejspíše způsobováno výskytem mnoha onkogenů. Nejdříve spojovaným onkogenem se vznikem replikačního stresu je MYC. Patří do rodiny transkripčních faktorů (tam patří mimo jiné i C-MYC, N-MYC a další). Při vzniku karcinomů se nejvíce zmiňují C-MYC, N-MYC a L-MYC. Onkogen MYC musí být nejdříve aktivován. K tomu slouží jeho vazebný partner MAX. Nadměrná exprese tohoto genu podporuje růst buněk, ale zároveň brání jejich diferenciaci. Zvyšující se hodnoty exprese MYC jsou také spojovány s poškozením DNA a s tím souvisejícím narušením kontroly replikace DNA. MYC je také jedním z hlavních faktorů vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Reaktivní formy kyslíku negativně ovlivňují vznik lézí DNA.

Druhým onkogenem přispívajícím ke zvýšenému replikačnímu stresu je cyklin E. Cyklin E se podílí na tranzici z fáze G1 do fáze S při vývoji buněk a to tím, že váže a zvyšuje aktivitu CDK2 (cyklin-dependentní kináza 2). Zvýšené hodnoty cyklinu E způsobuje neefektivní formaci prereplikačního komplexu, čímž způsobí neideální začátek replikace.

Posledními za zmínění stojícími onkogeny jsou ty z rodiny RAS. Rodina RAS GTPáz se skládá ze tří genů: H-RAS, K-RAS a N-RAS. RAS funguje jako transduktor mezi receptorem tyrosin kinázou a mitogen aktivovanou proteinkinázovou kaskádou. Toto spojení aktivuje transkripční procesy. Isoformy RAS byly zjištěny v několika typech rakovin. Mechanismus působení RAS systému je stále málo pochopen.

Při terapiích buněk s vysokým replikačním stresem se tedy nejčastěji zaměřují již zmíněné kompenzační mechanismy a tím se zvýší efekt chemoterapeutik. [37,38]



Obrázek 8 Zobrazení různých vlivů na vznik replikačního stresu buňky. [38]

4.6 Chromosomálně nestabilní typ rakoviny žaludku

Genomové změny mohou být ve formě bodových mutací (substituce báží, jejich delece či vklad jiných nukleotidů), chromosomálních změn (fúze chromozomů, jejich translokace, duplikace, delece, změny počtů chromozomů nebo vkládání nových segmentů). Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, tyto změny ovlivňují velké množství protoonkogenů a tumor supresivních genů.

Maligní tumory mohou být charakterizovány větším počtem abnormálních genomových změn nazývaných genomová nestabilita. Zde si ale musíme dát pozor na pojmy. Nádorová buňka je nazývána genomově nestabilní, pokud se počet genomových změn navyšuje velmi rychle za krátký časový interval. A právě tato nestabilita je rozdělena do dvou druhů – mikrosatelitní (MSI) a chromosomální (CIN). Mutace vyskytující se ve vysokých počtech v mikrosatelitních částech DNA sekvence nazýváme mikrosatelitní. Pokud se takovéto změny objeví na chromosomálním levelu, jedná se o nestabilitu chromosomální. CIN je stále výjimečným fenoménem s rozbíhajícími se definicemi – někteří ji nazývají aneuploidií či polyploidií. Co přesně způsobuje CIN je předmětem debat – někteří tvrdí, že CIN je výsledkem narušení onkogenů a tumor supresivních genů. CIN fenotyp může být způsoben dysfunkcemi třech buněčných procesů, a to nepřesná chromosomální segregace při mitóze, defekt kontroly buněčného cyklu či replikační stres. [39]

Bod pro kontrolu mitózy, také znám jako SAC (spindle assembly checkpoint, kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka), má mnoho funkcí při mitóze. SAC kontroluje správné připojení chromozomů v kinetochorách k mikrotubulům mitotických vřetének. Pokud tak není, dochází k jeho aktivaci a mitóza je pozastavena. [39]

5 Kultivace žaludečních organoidů

5.1 Izolace buněk

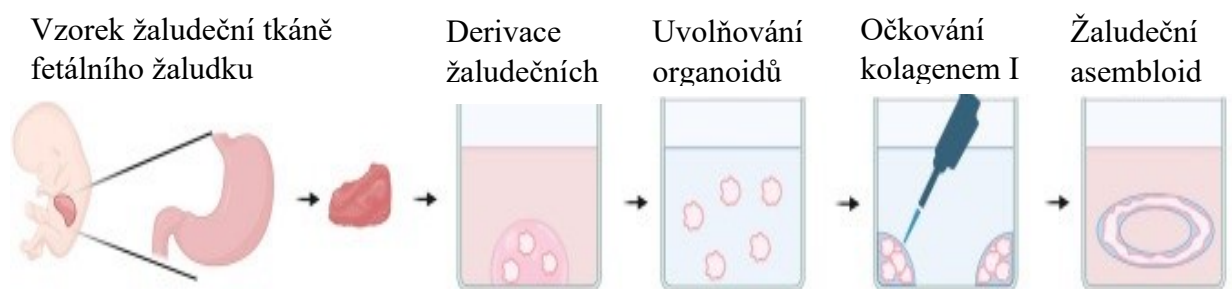
Kultivace žaludečních organoidů je prováděna izolací buněk z žaludeční tkáně, a to buď lidské či myší. Před izolací žaludeční tkáně je zapotřebí sterilizace všech námi používaných nástrojů (v autoklávu či pomocí 100 % isopropylu). Ke kultivaci je potřeba odebrat minimálně 1 cm² tkáně, a to buď resekci či biopsií. Získaný lidský materiál se ihned po odebrání vkládá do ledového bazálního média, kde je ponechán až do samotné izolace. [41]

Získaný vzorek tkáně vložíme do Petriho misky a zalijeme předem připraveným ledovým chelačným činidlem (například HBSS), tím tkáň několikrát promyjeme. [41] Tkáň lze případně

nakrájet na dílky velké zhruba 5 mm, to zajistí lepší promytí. Promyjeme zhruba 10x, dokud nebude supernatant zcela průhledný. Poté tkáň inkubujeme po dobu 30 minut při 37°C na třepačce. [43] Pokud jsme tkáň nerozřezali na menší části je nutné ji nejprve očistit od tukové tkáně, svalových vrstev či cév. Následně ji přeneseme do nové suché Petriho misky a pomocí pinzety odstraníme mukózní sliz a mukózní vrstvu pomocí stereomikroskopu. Takto upravený vzorek opět omyjeme v ledovém chelatačním roztoku a rozkrájíme na dílky o velikosti zhruba 5 mm². [41] Uvedený postup lze provést i obráceně, to znamená, že tkáň rozkrájenou na dílky velikosti zhruba 5 mm² převedeme z Petriho misky do konické misky a přilejeme 10 ml ledového chelatačního roztoku. Tkáň promýváme, dokud není supernatant čirý. Poté necháme tkáň inkubovat ve 20 ml chelatačního roztoku společně s 10 mM EDTA po dobu 10 minut. Během této doby nádobu lehce nakláníme, a to zhruba každé 2 minuty. Čas a teplota inkubace mohou být optimalizovány – pro žaludeční buňky myši je optimální doba 30 minut při 4 °C a pro lidské 10 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci přendáme dílky na čistou Petriho misku. Tu položíme pod mikroskop, vložíme na ní sklíčko a hledáme nepoškozenou tkáň. Po nález optimální části na mikroskopické sklo tlačíme a sklíčko pomalu posouváme po povrchu izolované tkáně. Tím dochází k uvolnění žaludečních žláz. Ty následně posbíráme a zalijeme 30ml basálního média. Velké kusy necháme usednout ke dnu nádoby a supernatant se žlázkami odebereme do dvou 15 ml nádob. Ty poté centrifugujeme po dobu 5 minut při 4°C a 200 otáčkách/minutu. Po centrifugaci se zbavíme supernatantu, vzniklou peletu uchováваме v chladu. [41,42]

V první kapitole jsem se zmínila o možnosti kultivace žaludečních organoidů z embryonálních buněk. Tým okolo Benedetti et al [45] kultivoval fetální gastrické organoidy. Tyto organoidy byly získané z tkáně po terminaci těhotenství (v čase mezi 8–21 týdnem po početí), a to chirurgicky. Získané organoidy byly pasážovány každý týden. Fetální organoidy byly získány seškrábnutím z misky a promytím ADMEM/F12 (složením odpovídá DMEM/F12) s penicilinem a streptomycinem, 10 mM HEPES a 2mM Glutamax. Poté byly resuspendovány v 1ml TrypLE Express a inkubovány 5 minut při 37°C. Po uplynutí inkubační doby byl TrypLE inaktivován a buňky centrifugovány a usušeny. Takto připravené buňky byly následně opět resuspendovány v přiměřeném objemu Matrigelu, naočkovány do kapiček o objemu zhruba 30 µl a celá destička byla převrácena a kapky ponechány gelovatět po dobu 30 minut v inkubátoru. Médium pro fetální žaludeční organoidy bylo měněno každé 3 dny. Toto médium, mimo již zmíněné ADMEM/F12, obsahuje také X N-27 bez vitamínu A, N-acetylcystein, WNT-3A, R - spondin, Noggin, epidermální růstový faktor, gastrin a další růstové faktory. Po

kultivaci připravených organoidů následovalo formování asembloidů. Asembloidy jsou shluky dvou či více organoidů. K formování byl vytvořen hydrogel z 0,75 mg/ml kolagenu I (získaného z kolagenu I z krysího ocasu). Tento hydrogel byl upraven tak, aby měl fyziologické pH i salinitu. Tento hydrogel se po dobu formování připravoval vždy čerstvý a byl uchováván na ledě, dokud nebyl přidán k organoidům. Po uplynutí sedmi dní od naočkování byly jednotlivé buňky uvolněny z Matrigelu přidáním roztoku pro obnovení buněk (Cell Recovery Solution™) a inkubací 45 minut na ledě. Poté byly organoidy centrifugovány při 100 g po dobu 5 minut. Po centrifugaci byly buňky promyty ledovým PBS pufrem k odstranění zbytkového Matrigelu. Takto připravené buňky byly resuspendovány v přiměřeném množství roztoku kolagenu I (200 μ l na jednu jamku) a naočkovány na destičku do tvaru kruhu. Destička byla následně inkubována 30 minut při 37°C. Po uplynutí doby inkubace byl asembloid silou odstraněn přidáním celkově 1 ml kolagenového média. Toto médium bylo měněno každé 3 dny (doba obměny byla závislá na replikaci buněk). Experiment byl vyhodnocen 10 dní od naočkování buněk. Vyhodnocení bylo provedeno imunofluorescenčním obarvením buněk. K dobrému uchycení imunofluorescenční látkou byly organoidy inkubovány v roztoku pro obnovu buněk po dobu 45 minut při 4°C. Poté byly organoidy posbírány, promyty PBS a převedeny do 1,5 ml nádoby předem potažené 1 % BSA. Resuspendovány byly ve 40 % PFA (látka sloužící k obarvení buněk), v tom byly ponechány 20 minut při stálém otáčení. PFA bylo následně odstraněno a nahrazeno 0,1 M NH₄Cl. Takto připravená suspenze pak byla 1 hodinu inkubována při rotaci pro zmenšení autofluorescence pojící se s vznikajícím aldehydem. Následně byly organoidy skladovány v roztoku PBS s 1 % penicilinem a streptomycinem až do samotného barvení. [45]

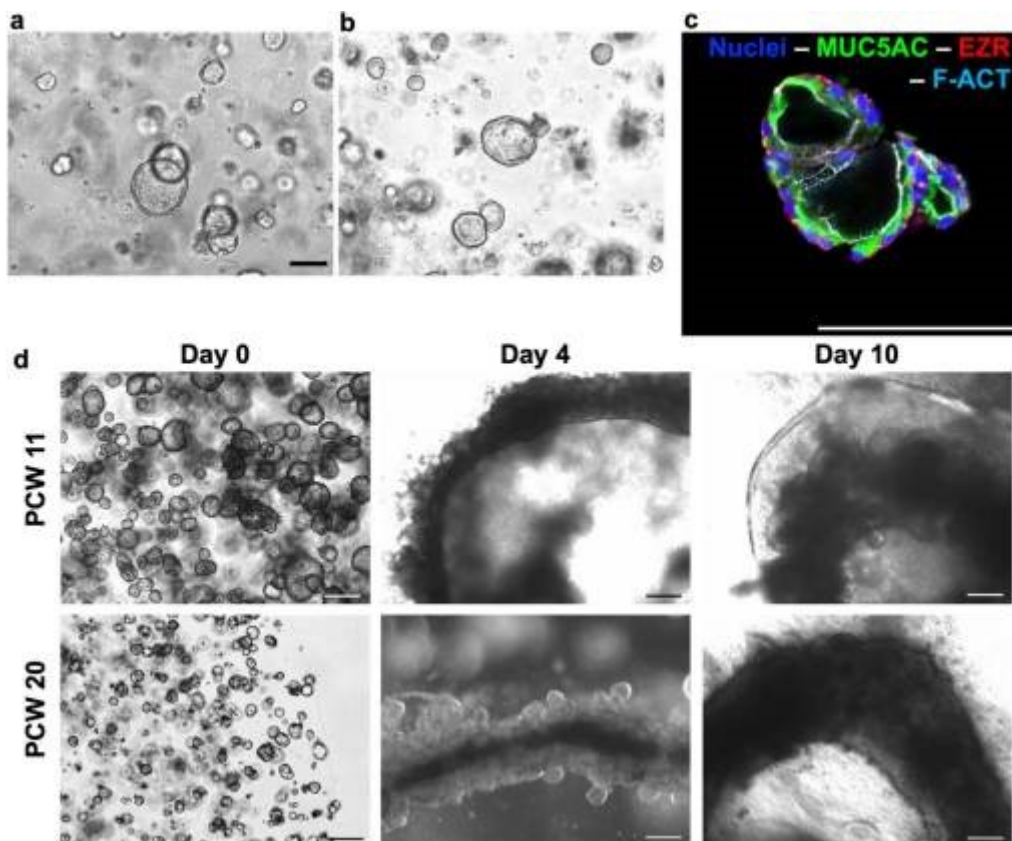


Obrázek 9 Příprava fetálních žaludečních organoidů. [45]

Fetální žaludeční organoidy a asembloidy byly následně blokovány a byl k nim vložen 0,5% Triton X-100 spolu s 1% BSA v PBS roztoku po dobu 2 hodin (pro asembloidy 1 hodinu) při pokojové teplotě. Primární protilátky (Chromogranin A, Mucin 5A, Mucin 5AC, Mucin 6, ...)

byly naředěny (1:100) a inkubovány společně s organoidy po dobu 24 hodin při 4°C za krouživého pohybu. To stejné bylo následně provedeno se sekundárními protilátkami (AlexaFluorR anti-mouse 488, AlexaFluor anti-rabbit 568, ...). Inkubace sekundárních protilátek byla zhruba 12 hodin. Fetální žaludeční organoidy byly přemístěny na skleněný dno Petriho misky těsně přes analýzou. Fetální žaludeční asembloidy byly naneseny na non-DAPI médium. [45]

Vyhodnocení bylo prováděno u dvou druhů kultivovaných organoidů, a to u organoidů s různou fází fetálního vývojem – terminace proběhla 11 týdnů (rané) a 20 týdnů (pozdní) od početí. Imunofluorescence potvrdila přítomnost polarizovaných epiteliálních buněk s F-aktinem. V malém množství byl pozorován i marker ezrin. Ten hraje velkou roli při organizaci cytoskeletu (sestavuje membránové proteinové komplexy s aktinem). Žaludeční specifita vyrostlých organoidů je vyjádřena žaludečním markerem mucin-5AC. Ten se nacházel na luminálních částech organoidů. [45]



Obrázek 10 Organoidy a asembloidy pod mikroskopem (a, b, d) a imunofluorescenčním mikroskopem (c). [45]

Na obrázku můžeme pozorovat vyhodnocení imunofluorescence a zobrazení organoidů a asembloidů pod mikroskopem. V rámečcích a,b jsou znázorněny 6 dní staré fetální organoidy.

Obrázek c nám zobrazuje snímek pořízený imunofluorescenčním mikroskopem. Zeleně je znázorněn mucin 5AC, červeně ezrin, F-aktin pak světle modře a jádra tmavě modře. Zcela zformované organoidy byly využity jako startovací bod pro kultivaci asembloidů. Organoidy byly nejprve disociovány na samostatné buňky, naočkovány do Matrigelových kapek a nechány růst 7 dní. Právě výsledky růstu asembloidů vidíme v části d na obrázku výše. V prvním řádku jsou asembloidy rostoucí z buněk získaných z fetálního plodu terminovaného 11 týden po početí a ve druhém 20 týdnů po početí. Po analýze vykultivovaných asembloidů pomocí imunofluorencence zjistili přítomnost žaludečního mucinu 6 a mucinu 5AC. Nalezeny byly také enteroendokrinní buňky. Pomocí RT-PCR analýzy byla zjištěna rozdílná exprese mezi buňkami ranými a pozdními. Rané asembloidy měli tendenci snižování koncentrace markerů a zvyšování výskytu mucinů. Naopak pozdní asembloidy zvyšovali výskyt kmenových buněk a enteroendokrinních buněk. [45]

Mimo stručnější popis kultivace žaludečních organoidů tato studie potvrdila i fakt, že využití asembloidů je výhodnější. Při porovnání organoidů a asembloidů je jasnou výhodou komplexnost právě asembloidů. Ta nám umožňuje jednodušší přístup k lumenu, čímž zjednodušeje testování specifických léčiv. [45]

5.2 Kultivační média a matrixy

Kultivační média a matrixy jsou hlavními faktory konstrukcí organoidů. Kultivační médium je základním materiálem pro získávání a udržování organoidů získaných z tkání. Obecně je kultivační médium složeno z modernější DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) obohaceným B27, GlutaMax, HEPES (biologický pufr) a penicilinem či streptomycinem. Dalšími komponenty mohou být růstové faktory či antagonisté signálních cest, to záleží na typu kultivované tkáně. Tyto speciální komplementy jsou produkovány především mezenchymálními buňkami. Pro gastrointestinální organoidy se ke kultivačnímu médiu přidává N-acetyl-L-cystein, WNT3a, R-spondin, Noggin, gastrin a mnoho dalších komplementů. Jako bazální matrix je využíván Matrigel. Ten musí být neustále zmrazen či na ledě. Skladuje se při teplotě -20°C a před použitím se musí pomalu rozmrazit na ledě.[43]

Gao et al [44] použili šest různých typů kultivačních medií. Základem všech kultivačních medií byly DMEM/F12, GlutaMax, a penicilin se streptomycinem. Lišily se hlavně přidanými komponenty. Pro kultivaci žaludečních organoidů bylo použito kultivační médium číslo 5 – zde byl navíc přidán R-spondin1, Wnt3A, Noggin, gastrin a další komplementy. [44]

Pro vytvoření 2D monovrstvy organoidů nejprve musíme pokrýt vnitřek čtyřjamkových titračních destiček 250 μ l Matrigelu naředěným 1:40 pomocí DPBS při 37°C minimálně 3 hodiny. Po 3 hodinách jsme do každé takto připravené jamky naočkovali 100 000 buněk a přidali 500 μ l kultivačního média. Po dobu prvních tří dnů bylo do jamek přidáváno 10 μ l Y – 27632 (inhibitor proliferace, růstu, atd.). Kultivační médium se poté měnilo každé 3 dny. Pasážování kultivovaných buněk bylo prováděno, když buněčné pokrytí jednotlivých jamek dosáhlo minimálně 80 % a to tak, že médium bylo odsáto a monovrstva buněk byla promyta. K takto připraveným jamkám bylo přidáno zhruba 200 μ l TrypLEk podpoření jejich úplného trávení a destičky byly inkubovány při 37°C po dobu 10. K zastavení trávení bylo po 10 minutách využito zhruba 500 μ l DMEM/F12, vzniklý roztok centrifugován 5 minut při 500 g a resuspendován. [44]

Pro kultivaci pomocí metody 3D si připravíme mikrotitrační destičku s 96 jamkami. Předem jsme resuspendovali zhruba 5000 buněk v kultivačním médiu a smíchali s 5x objemem Matrigelu. Celkový objem takto připravené suspenze by měl být zhruba 8 μ l v jedné jamce. Takto připravená suspenze byla přidána do jamek mikrotitrační destičky a inkubována 37°C po dobu 10 minut. To je doba potřebná ke ztuhnutí Matrigelu. Buňky byly následně kultivovány v 200 μ l média. [44] Některé studie uvádí trochu jiné postupy. Tým okolo Bartfelda et al [41] uvádí postupy hned dva. V první alternativě obsadili 6 jamek mikrotitrační destičky, a to tak, že suspendovali peletu v 60 μ l bazálního matrixu. Poté připravili 5 sterilních 1,5 ml zkumavek obsahujících 50 μ l bazálního matrix, všechny zkumavky byly neustále uloženy na ledě. Do takto připravených zkumavek poté přenesli 10 μ l mixu žaludečních žlázek a bazálního matrixu do první zkumavky a pečlivě to promíchali. Z takto připravené suspenze odebrali opět 10 μ l a napipetovali do zkumavky druhé. Stejný proces opakujeme pro všechny zkumavky. Alternativou tohoto postupu byla kultivace vypočítaného obsahu žlázek na jednu jamku. Zde opět došlo k resuspenzi pelety v 10 ml bazálního média. 50 μ l bylo odebráno a kápnuto na čistou Petriho misku. Zde byl spočítán počet žlázek pod mikroskopem. Do nové 15 zkumavky bylo převedeno 400 buněk, ty byly následně centrifugované 5 minut. Po zcentrifugování byl odstraněn supernatant a přidáno dalších 200 μ l bazálního matrixu. Ať již byl zvolen jakýkoliv způsob, finální kroky kultivace jsou stejné. Vzali mikrotitrační destičku se 24 jamkami vytemperovanou na 37°C. Do středu každé jamky přenesli 50 μ l suspenze žaludečních žlázek s bazálním matrixem a vrátili ji do inkubátoru. Tím dojde zhruba po 10 minutách k vytvoření jakési kostry. Mezitím si připravili médium se všemi zvolenými růstovými faktory. Po vyjmutí

z inkubátoru opatrně přidali 500 μ l média s růstovými faktory do každé z jamek. Toto médium bylo měněno každé 3 týdny. [41]

Závěr

Hlavním cílem různých technik pro kultivaci žaludečních organoidů je nalézt univerzální postup. V současnosti je k dispozici technik hned několik. Mezi nejpoužívanější techniky patří 2D a 3D kultivace. Už několika týmům, a to především japonským vědcům, se podařilo vytvořit fungující žaludeční organoidy z biopsií pacienta. Tyto organoidy poté využili k určení neoptimálnější terapie pacienta. Takto mířené terapie byly schopné pacientovi prodloužit život o měsíce, v jistých případech i o roky. Mezi neméně důležitý druh kultivace nejenom žaludečních organoidů patří také sféroidy. Ty se využívají především pro testování léků před jejich klinickým využitím.

Úplně novou technikou kultivace žaludečních organoidů, i organoidů obecně, jsou asembloidy. Ty jsou tvořené shlukem organoidů, který následně lépe simuluje mikroprostředí námi zvolených specifických buněk. To dovoluje přesnější simulace pro vznik tumoru, případně pro předpokládání chování buněk. Již několik týmů potvrdilo pozitivní výsledky studií právě asembloidů, čímž jasně otevřeli další diskusi na toto téma.

I přes velmi časově a finančně náročnou tvorbu organoidů je kultivace velmi slibným krokem k pochopení mechanismu vzniku nádorových onemocnění a jejich následnou léčbou.

Seznam literatury

- [1] HUO, Chengdong; ZHANG, Xiaoxia; GU, Yanmei; WANG, Daijun; ZHANG, Shining et al. Organoids: Construction and Application in Gastric Cancer. Online. *Biomolecules*. 2023, roč. 13, č. 5. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom13050875>. [cit. 2024-01-12].
- [2]] LI, H., H. LIU a K. CHEN. Living biobank-based cancer organoids: prospects and challenges in cancer research. *Cancer Biology and Medicine*. 2022, 19(7), 965-982 [cit. 2024-01-12].
- [3] JANTAREE, Phatcharida; YU, Yanfei; CHAITHONGYOT, Supattra; TÄGER, Christian; SARABI, Mohsen Abdi et al. Human gastric fibroblasts ameliorate A20-dependent cell survival in co-cultured gastric epithelial cells infected by *Helicobacter pylori*. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2022, roč. 1869, č. 12. ISSN 01674889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119364>. [cit. 2024-01-25].
- [4] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [5] XU, Jiao; GONG, Jin; LI, Mengyang; KANG, Ye; MA, Jinrong et al. Gastric cancer patient-derived organoids model for the therapeutic drug screening. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2024, roč. 1868, č. 4. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2024.130566>. [cit. 2024-01-28].
- [6] HENSON, Elizabeth S. a GIBSON, Spencer B. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. Online. *Cellular Signalling*. 2006, roč. 18, č. 12, s. 2089-2097. ISSN 08986568. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.05.015>. [cit. 2024-01-28].
- [7] SCHLESSINGER, Joseph. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Online. *Cell*. 2000, roč. 103, č. 2, s. 211-225. ISSN 00928674. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00114-8). [cit. 2024-01-28].
- [8] ROCHAIS, Francesca a KELLY, Robert G. Fibroblast growth factor 10. Online. *Differentiation*. 2023. ISSN 03014681. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2023.100741>. [cit. 2024-01-25].

- [9] ROBERT, Charly; KERFF, Frédéric; BOUILLENNE, Fabrice; GAVAGE, Maxime; VANDEVENNE, Marylène et al. Structural analysis of the interaction between human cytokine BMP-2 and the antagonist Noggin reveals molecular details of cell chondrogenesis inhibition. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2023, roč. 299, č. 2. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102892>. [cit. 2024-02-14].
- [10] LEE, Jueun; SHIN, Jin A.; LEE, Eun-Mi; NAM, Miso a PARK, Eun-Mi. Noggin-mediated effects on metabolite profiles of microglia and oligodendrocytes after ischemic insult. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023, roč. 224. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115196>. [cit. 2024-02-14].
- [11] GAO, Kai; SHAO, Wenbo; WEI, Tian; YAN, Zihan; LI, Nianhu et al. Wnt-3a improves functional recovery after spinal cord injury by regulating the inflammatory and apoptotic response in rats via wnt/ β -catenin signaling pathway. Online. *Brain Research*. 2024, roč. 1822. ISSN 00068993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148637>. [cit. 2024-03-03].
- [12] FISCHER, Leslie; BOLAND, Genevieve a TUAN, Rocky S. Wnt-3A Enhances Bone Morphogenetic Protein-2-mediated Chondrogenesis of Murine C3H10T1/2 Mesenchymal Cells. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, roč. 277, č. 34, s. 30870-30878. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109330200>. [cit. 2024-03-03].
- [13] LIU, Qiong; ZHAO, Ying; XING, Hui; LI, Lin; LI, Rongxia et al. The role of R-spondin 1 through activating Wnt/ β -catenin in the growth, survival and migration of ovarian cancer cells. Online. *Gene*. 2019, roč. 689, s. 124-130. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.098>. [cit. 2024-03-03].
- [14] YU, Meng; WANG, Long; HU, Yue; LIAN, Zhi-min a HUA, Jin-lian. ALK Family Inhibitor A83-01 Promotes the Proliferation of Mouse Male Germline Stem Cells (mGSCs) Under Serum- and Feeder-Free Conditions. Online. *Journal of Integrative Agriculture*. 2013, roč. 12, č. 10, s. 1839-1846. ISSN 20953119. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60413-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60413-X). [cit. 2024-03-06].

- [15] WIBLE, Daric J.; PARIKH, Zalak; CHO, Eun Jeong; CHEN, Miao-Der; JETER, Collene R. et al. Unexpected inhibition of the lipid kinase PIKfyve reveals an epistatic role for p38 MAPKs in endolysosomal fission and volume control. Online. *Cell Death & Disease*. 2024, roč. 15, č. 1. ISSN 2041-4889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06423-0>. [cit. 2024-03-06].
- [16] PRAKASH, Jai; SALUJA, Vinay; VISSER, Jan; MOOLENAAR, Frits; MEIJER, Dirk K.F. et al. Bioanalysis and pharmacokinetics of the p38 MAPkinase inhibitor SB202190 in rats. Online. *Journal of Chromatography B*. 2005, roč. 826, č. 1-2, s. 220-225. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.09.005>. [cit. 2024-03-06].
- [17] ZHANG, Yuanhang; LIU, Kai; HE, Huan; XIAO, Hui; FANG, Zhihong et al. Innovative explorations: unveiling the potential of organoids for investigating environmental pollutant exposure. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. 2024, roč. 31, č. 11, s. 16256-16273. ISSN 1614-7499. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32256-7>. [cit. 2024-03-20].
- [18] CHAUBEY, Aditya; ROSS, Kevin J.; LEADBETTER, Ross M. a BURG, Karen J. L. Surface patterning: Tool to modulate stem cell differentiation in an adipose system. Online. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2008, roč. 84B, č. 1, s. 70-78. ISSN 1552-4973. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30846>. [cit. 2024-03-20].
- [19] SILVA-PEDROSA, Rita; SALGADO, António José a FERREIRA, Pedro Eduardo. Revolutionizing Disease Modeling: The Emergence of Organoids in Cellular Systems. Online. *Cells*. 2023, roč. 12, č. 6. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells12060930>. [cit. 2024-03-20].
- [20] CARRILLO-COCOM, L. M.; GENEL-REY, T.; ARAÍZ-HERNÁNDEZ, D.; LÓPEZ-PACHECO, F.; LÓPEZ-MEZA, J. et al. Amino acid consumption in naïve and recombinant CHO cell cultures: producers of a monoclonal antibody. Online. *Cytotechnology*. 2015, roč. 67, č. 5, s. 809-820. ISSN 0920-9069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9720-5>. [cit. 2024-03-20].

- [21] DUVAL, Kayla; GROVER, Hannah; HAN, Li-Hsin; MOU, Yongchao; PEGORARO, Adrian F. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. Online. *Physiology*. 2017, roč. 32, č. 4, s. 266-277. ISSN 1548-9213. Dostupné z: <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>. [cit. 2024-03-20].
- [22] GHULOUM, Fatmah I.; STEVENS, Lee A.; JOHNSON, Colin A.; RIOBO-DEL GALDO, Natalia A. a AMER, Mahetab H. Towards modular engineering of cell signalling: Topographically-textured microparticles induce osteogenesis via activation of canonical hedgehog signalling. Online. *Biomaterials Advances*. 2023, roč. 154. ISSN 27729508. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213652>. [cit. 2024-03-20].
- [23] ENGLER, Adam J.; SEN, Shamik; SWEENEY, H. Lee a DISCHER, Dennis E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Online. *Cell*. 2006, roč. 126, č. 4, s. 677-689. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>. [cit. 2024-03-20].
- [24] *Světová incidence rakoviny*. Online. In: World Health Organisation [WHO]. 2024. Dostupné z: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars-compare-populations?mode=cancer&populations=903_904&group_populations=1&key=total&sort_by=value1. [cit. 2024-05-12].
- [25] WUPUTRA, Kenly; KU, Chia-Chen; PAN, Jia-Bin; LIU, Chung-Jung; LIU, Yi-Chang et al. Stem Cell Biomarkers and Tumorigenesis in Gastric Cancer. Online. *Journal of Personalized Medicine*. 2022, roč. 12, č. 6. ISSN 2075-4426. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jpm12060929>. [cit. 2024-04-03].
- [26] SEPULVEDA, Antonia R.; WU, Ling; OTA, Hiroyoshi; GUTIERREZ, Oscar; KIM, Jong G. et al. Molecular identification of main cellular lineages as a tool for the classification of gastric cancer. Online. *Human Pathology*. 2000, roč. 31, č. 5, s. 566-574. ISSN 00468177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/hp.2000.6684>. [cit. 2024-04-04].
- [27] WONGSUWANLERT, Mutita; TEANPAISAN, Rawee; PAHUMUNTO, Nuntiya; KAEWDECH, Apichat; RUANGSRI, Praphansri et al. Prevalence and virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from oral cavity of non-disease, gastritis, and gastric cancer patients. Online. *Journal of Dental Sciences*. 2024, roč. 19, č. 2, s. 1036-1043. ISSN 19917902. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jds.2023.06.024>. [cit. 2024-04-04].

- [28] LORDICK OBERMANNOVÁ, Radka; LORDICK, Florian a PETRUŽELKA, Luboš (ed.). Multidisciplinary approach to oesophageal and gastric cancer. Medicus. Praha: Current Media, [2018]. ISBN 978-80-88129-40-0.
- [29] WANG, Jinfeng; DENG, Rilín; CHEN, Shuai; DENG, Shun; HU, Qi et al. Helicobacter pylori CagA promotes immune evasion of gastric cancer by upregulating PD-L1 level in exosomes. Online. *IScience*. 2023, roč. 26, č. 12. ISSN 25890042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108414>. [cit. 2024-04-30].
- [30] AL-OUQAILI, Mushtak T.S.; HUSSEIN, Rawaa A.; MAJEED, Yasin H. a AL-MARZOOQ, Farah. Study of vacuolating cytotoxin A (vacA) genotypes of ulcerogenic and non-ulcerogenic strains of Helicobacter pylori and its association with gastric disease. Online. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2023, roč. 30, č. 12. ISSN 1319562X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103867>. [cit. 2024-04-30].
- [31] FUJIMORI, Yoshifumi; AKAMATSU, Taiji; OTA, Hiroyoshi a KATSUYAMA, Tsutomu. Proliferative markers in gastric carcinoma and organoid differentiation. Online. *Human Pathology*. 1995, roč. 26, č. 7, s. 725-734. ISSN 00468177. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90219-8](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90219-8). [cit. 2024-05-01].
- [32] DONG, Min; WANG, Hai-yan; ZHAO, Xiao-xiao; CHEN, Jian-ning; ZHANG, Yi-wang et al. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. Online. *Human Pathology*. 2016, roč. 53, s. 25-34. ISSN 00468177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.02.007>. [cit. 2024-05-22].
- [33] MA, Xiaoting; XUE, Liyan; OU, Kai; LIU, Xiu; CHEN, JunLin et al. Significant effect of posterior line treatment of HER2 positive advanced gastric cancer: A case report. Online. *Heliyon*. 2024, roč. 10, č. 7. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28923>. [cit. 2024-05-23].
- [34] KLEIN-SCORY, Susanne; LADIGAN-BADURA, Svetlana; MIKA, Thomas; VERDOODT, Berlinda; TANNAPFEL, Andrea et al. Liquid biopsy based HER2 amplification status in gastric cancer patients indicates clinical response. Online. *Heliyon*. 2023, roč. 9, č. 11. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21339>. [cit. 2024-05-23].
- [35] DAHUI, Qin. Next-generation sequencing and its clinical application. Online. *Cancer Biology & Medicine*. 2019, roč. 16, č. 1, s. 4-10. ISSN 20953941. Dostupné z: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>. [cit. 2024-05-23].

- [36] ZHU, Haifeng; LI, Xiaoqin; ZHANG, Xiaomei; CHEN, Deyu; LI, Dan et al. Polymorphisms in mismatch repair genes are associated with risk and microsatellite instability of gastric cancer, and interact with life exposures. Online. *Gene*. 2016, roč. 579, č. 1, s. 52-57. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.050>. [cit. 2024-05-24].
- [37] SANTAMARINA-GARCÍA, Martín; BREA-IGLESIAS, Jenifer; BRAMSEN, Jesper Bertram; FUENTES-LOSADA, Mar; CANEIRO-GÓMEZ, Francisco Javier et al. MSIMEP: Predicting microsatellite instability from microarray DNA methylation tumor profiles. Online. *IScience*. 2023, roč. 26, č. 3. ISSN 25890042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106127>. [cit. 2024-05-24].
- [38] SCHOONEN, Pepijn M.; GUERRERO LLOBET, Sergi a VAN VUGT, Marcel A.T.M. Replication stress: Driver and therapeutic target in genomically instable cancers. Online. In: *DNA Repair. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Elsevier, 2019, s. 157-201. ISBN 9780128155592. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.10.006>. [cit. 2024-05-24].
- [39] MALEKI, Saffiyeh Saboor a RÖCKEN, Christoph. Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology. Online. *Neoplasia*. 2017, roč. 19, č. 5, s. 412-420. ISSN 14765586. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.012>. [cit. 2024-05-27].
- [40] STAHL, Phillip; SEESCHAAF, Carsten; LEBOK, Patrick; KUTUP, Asad; BOCKHORN, Maximillian et al. Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer. Online. *BMC Gastroenterology*. 2015, roč. 15, č. 1. ISSN 1471-230X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0231-4>. [cit. 2024-05-27].
- [41] BARTFELD, Sina a CLEVERS, Hans. Organoids as Model for Infectious Diseases: Culture of Human and Murine Stomach Organoids and Microinjection of Helicobacter Pylori. Online. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, č. 105. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/53359>. [cit. 2024-05-27].
- [42] SCHLAERMANN, Philipp; TOELLE, Benjamin; BERGER, Hilmar; SCHMIDT, Sven C; GLANEMANN, Matthias et al. A novel human gastric primary cell culture system for modelling Helicobacter pylori infection in vitro. Online. *Gut*. 2016, roč. 65, č. 2, s. 202-213. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307949>. [cit. 2024-05-27].

[43] YANG, Ruixin a YU, Yingyan. Patient-derived organoids in translational oncology and drug screening. Online. *Cancer Letters*. 2023, roč. 562. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216180>. [cit. 2024-05-27].

[44] GAO, Yuan; DONG, Ji; QI, Shuyue; ZHOU, Xin; WU, Xinglong et al. Establishment and characterization of adult human gastric epithelial progenitor-like cell lines. Online. *Cell Proliferation*. 2023, roč. 56, č. 6. ISSN 0960-7722. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cpr.13355>. [cit. 2024-05-27].

[45] BENEDETTI, Giada; JONES, Brendan C.; SGUALDINO, Francesca; DE COPPI, Paolo a GIOBBE, Giovanni Giuseppe. Generation of human gastric assembloids from primary fetal organoids. Online. *Pediatric Surgery International*. 2024, roč. 40, č. 1. ISSN 1437-9813. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00383-023-05586-9>. [cit. 2024-06-11].