

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Využití chemoterapie pro zvýšení exprese molekul souvisejících s aktivitou  
imunitního systému

Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Skálová**  
Osobní číslo: **C21475**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Využití chemoterapie pro zvýšení exprese molekul souvisejících s aktivitou imunitního systému**  
Téma práce anglicky: **The Use Of Chemotherapy To Increase The Expression Of Molecules Related To The Activity Of The Immune System**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

1. Stručně popsat vývoj hematopoézy.
2. Popsat mnohočetný myelom – diagnóza, léčba.
3. Popsat imunoterapeutické přístupy a možnosti zvýšení aktivity imunitních buněk.

### Experimentální část:

1. Testování vybrané chemoterapie na myelomové linie – sledování proliferace a viability.
2. Sledovat zvýšení exprese genů asociovaných s imunitní odpovědí pomocí qPCR.
3. Ověření výsledků na proteinové úrovni.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní odborná literatura dostupná v databázích WoS, Medline, Sciencedirect. Odborné monografie a další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Monika Holubová, Ph.D.**  
Laboratoř nádorové biologie a imunoterapie,  
Biomedicínské centrum, Univerzita Karlova, Lékařská  
fakulta v Plzni

Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití chemoterapie pro zvýšení exprese molekul souvisejících s aktivitou imunitního systému jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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 4. 5. 2023

Bc. Jana Skálová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. a Mgr. Monice Holubové, Ph.D. v roli konzultanta za cenné profesionální rady, připomínky, odborné vedení práce a čas, který mi věnovaly. Dále děkuji Lékařské fakultě v Plzni, že jsem mohla v Biomedicínském centru, konkrétně v laboratoři nádorové biologie a imunoterapie, provést svůj výzkum. V neposlední řadě své rodině, přátelům, a hlavně příteli za jejich podporu po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Předkládaná diplomová práce se zabývá terapií mnohočetného myelomu, který představuje nádorové onemocnění kostní dřeně vycházející z maligních plazmatických buněk. Zkoumá účinky chemoterapeutik bortezomibu, ixazomibu a carfilzomibu v různých koncentracích na myelomové linie RPMI-8226 a H929. Efekt jednotlivých látek je v první řadě sledován na základě míry proliferace a viability buněk po aplikaci chemoterapie a dále pomocí exprese genů (MICA a MICB) asociovaných s imunitní odpovědí NK buněk. K hodnocení míry exprese je použita qPCR analýza, jejíž výsledky jsou ověřeny na proteinové úrovni metodou průtokové cytometrie. Cílem práce je identifikace vhodného typu a koncentrace chemoterapie pro navazující experimenty s kombinovanou imunoterapií *ex vivo* připravenými NK buňkami.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

bortezomib, ixazomib, carfilzomib, mnohočetný myelom, NK buňky, imunoterapie

## **TITLE**

The Use of Chemotherapy To Increase The Expression Of Molecules Related To The Activity Of The Immune System

## **ANNOTATION**

The master thesis deals with the therapy of multiple myeloma, which is a bone marrow tumour arising from malignant plasma cells. It investigates the effects of the chemotherapeutics bortezomib, ixazomib, and carfilzomib at various concentrations on the myeloma cell lines RPMI-8226 and H929. The impact of individual agents is firstly measured by the cell proliferation level and cell viability after chemotherapy treatment and then by gene expression (MICA and MICB) associated with the immune response of NK cells. The qPCR analysis is used to assess the expression level, and the results are verified at the protein level by flow cytometry. The thesis aims to identify the appropriate type and concentration of chemotherapy for follow-up experiments with *ex vivo* NK cell-prepared combination immunotherapy.

## **KEYWORDS**

bortezomib, ixazomib, carfilzomib, multiple myeloma, natural killer cells, immunotherapy

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	10
SEZNAM TABULEK .....	11
SEZNAM ZKRATEK .....	12
ÚVOD .....	15
TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1 HEMATOPOÉZA .....	16
1.1 Lokalizace hematopoézy .....	16
1.2 Vývoj krevních komponent.....	16
1.2.1 Leukopoéza .....	17
1.2.1.1 Lymfopoéza .....	17
1.3 Poruchy vývoje krevních elementů .....	20
1.3.1 Poruchy leukocytárního systému .....	20
1.3.1.1 Kvantitativní poruchy .....	21
1.3.1.2 Kvalitativní poruchy .....	21
1.4 Hematologické malignity .....	22
1.4.1 Akutní leukémie.....	23
1.4.1.1 Akutní lymfoblastové leukémie.....	23
1.4.2 Lymfoproliferativní syndrom .....	23
1.4.2.1 Hodgkinův lymfom.....	24
1.4.2.2 Non-Hodgkinův lymfom.....	24
1.4.2.3 Chronická lymfatická leukémie .....	25
1.4.2.4 Vlasatobuněčná leukémie .....	25
1.4.3 Malignity z plazmatických buněk.....	25
1.4.3.1 Waldenströмова makroglobulinemie.....	26
2 MNOHOČETNÝ MYELOM .....	27
2.1 Etiopatogeneze .....	27
2.2 Patofyziologie .....	27
2.3 Klinické příznaky .....	28
2.4 Laboratorní diagnostika .....	29
2.4.1 Průkaz kostních ložisek .....	29
2.4.2 Počet plazmocytů a jejich morfologie v kostní dřeni .....	30
2.4.3 Stanovení M-Ig v krvi a v moči .....	31
2.4.4 Další laboratorní stanovení .....	32
2.5 Léčba.....	33

2.5.1	Netransplantační chemoterapie – monoterapie.....	34
2.5.2	Netransplantační chemoterapie – polychemoterapie .....	35
2.5.3	Intenzivní vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací krvetočivné tkáně .....	35
2.5.4	Konsolidační léčba.....	36
2.5.5	Udržovací léčba v době remise .....	36
2.5.6	První až třetí relaps nebo rezistence na první léčebnou linii .....	37
2.5.6.1	Alogenní transplantace krvetočivné tkáně .....	37
2.5.7	Rezistentní relaps na veškerou dostupnou a pro pacienta vhodnou léčbu .....	38
2.5.8	Podpůrná léčba.....	38
2.6	Informace k vybraným látkám k léčbě mnohočetného myelomu .....	38
2.6.1	Cytostatika .....	38
2.6.2	Inhibitory proteazomu.....	39
2.6.3	Imunoterapeutika .....	41
2.6.4	Kortikoidy .....	42
2.6.5	Bisfosfonáty .....	43
3	PROTINÁDOROVÁ IMUNITA.....	44
3.1	Nádorové antigeny .....	44
3.1.1	Antigeny specifické pro nádory .....	44
3.1.2	Antigeny asociované s nádory .....	45
3.2	Protinádorové imunitní mechanismy .....	45
3.2.1	Imunitní dozor.....	45
3.3	Mechanismy, jimiž se nádory brání před rozpoznáním .....	48
4	IMUNOTERAPEUTICKÉ PŘÍSTUPY A MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ AKTIVITY IMUNITNÍCH BUNĚK .....	50
4.1	„Nespecifická“ stimulace imunitních mechanismů .....	50
4.2	Potlačení makrofágů typu M2.....	50
4.3	Imunoterapie dendritickými buňkami .....	50
4.4	Zlepšení antigen-prezentující funkce nádorových buněk .....	51
4.5	Protilátky proti TSA a TAA .....	51
4.6	Protilátky blokující tlumivé receptory T-lymfocytů .....	52
4.7	Bispecifické protilátkové konstrukty .....	52
4.8	Adoptivní T-buněčná terapie.....	52
4.9	Chimérické antigenní receptory .....	53
4.10	Nádorové vakcíny .....	54
4.11	Kombinovaná imunoterapie .....	54



4.11.1	Kombinace monoklonálních protilátek ovlivňující kontrolní body imunitní odpovědi.....	54
4.11.2	Kombinace monoklonálních protilátek ovlivňujících kontrolní body imunitní odpovědi s dalšími imunomodulačními léky .....	55
4.11.3	Kombinace imunoterapie s chemoterapií (chemoimunoterapie) .....	55
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....		58
5	CÍLE PRÁCE.....	58
6	METODIKA PRÁCE .....	59
6.1	Rozmražení buněčných linií.....	59
6.2	Aplikace chemoterapie na buněčné linie.....	60
6.2.1	Příprava destičky pro IncuCyte®.....	62
6.2.2	Příprava destiček pro průtokovou cytometrii a testy molekulární genetiky ...	62
6.3	Měření viability buněk na průtokovém cytometru.....	63
6.4	Zamražení buněčné suspenze v lyzačním roztoku .....	64
6.5	Izolace RNA.....	64
6.6	Syntéza cDNA.....	65
6.7	Testování primerů pomocí real-time PCR (qPCR) .....	67
6.8	Hodnocení qPCR.....	69
7	VÝSLEDKY .....	71
7.1	Viabilita buněk .....	71
7.1.1	Myelomová RPMI-8226 linie .....	71
7.1.2	Myelomová H929 linie .....	71
7.2	Vizualizace proliferace buněk na přístroji IncuCyte®.....	72
7.3	Exprese genů asociovaných s imunitní odpovědí .....	74
7.3.1	Myelomová RPMI-8226 linie.....	74
7.3.2	Myelomová H929 linie .....	77
7.4	Stanovení povrchové exprese pomocí průtokové cytometrie .....	81
7.4.1	Myelomová RPMI-8226 linie .....	81
7.4.2	Myelomová H929 linie .....	83
8	DISKUZE .....	85
ZÁVĚR .....		89
POUŽITÁ LITERATURA .....		90
SEZNAM PŘÍLOH.....		98

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Lymfopoéza – T-lymfocyty [10].....	18
Obrázek 2: Lymfopoéza – B-lymfocyty [10] .....	19
Obrázek 3: Vzor elektroforézy sérových proteinů u zdravého pacienta a např. u pacienta s mnohočetným myelomem [25] .....	26
Obrázek 4: Boční RTG snímek lebky pacienta s MM [32] .....	30
Obrázek 5: Vazba MICA/B ligandu s NKG2D receptorem [53].....	47
Obrázek 6: Nastavení teplotního programu qPCR .....	69
Obrázek 7: Ukázka snímku z přístroje IncuCyte® .....	72
Obrázek 8: Počet živých buněk po aplikaci bortezomibu (RPMI-8226).....	73
Obrázek 9: Počet živých buněk po aplikaci ixazomibu (RPMI-8226) .....	73
Obrázek 10: Počet živých buněk po aplikaci carfilzomibu (RPMI-8226).....	74
Obrázek 11: Exprese MICA po aplikaci bortezomibu (RPMI-8226).....	75
Obrázek 12: Exprese MICB po aplikaci bortezomibu (RPMI-8226).....	75
Obrázek 13: Exprese MICA po aplikaci ixazomibu (RPMI-8226) .....	76
Obrázek 14: Exprese MICB po aplikaci ixazomibu (RPMI-8226) .....	76
Obrázek 15: Exprese MICA po aplikaci carfilzomibu (RPMI-8226).....	77
Obrázek 16: Exprese MICB po aplikaci carfilzomibu (RPMI-8226).....	77
Obrázek 17: Exprese MICA po aplikaci bortezomibu (H929).....	78
Obrázek 18: Exprese MICB po aplikaci bortezomibu (H929) .....	78
Obrázek 19: Exprese MICA po aplikaci ixazomibu (H929) .....	79
Obrázek 20: Exprese MICB po aplikaci ixazomibu (H929).....	79
Obrázek 21: Exprese MICA po aplikaci carfilzomibu (H929).....	80
Obrázek 22: Exprese MICB po aplikaci carfilzomibu (H929).....	80
Obrázek 23: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci bortezomibu (RPMI-8226).....	81
Obrázek 24: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci ixazomibu (RPMI-8226).....	82
Obrázek 25: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci carfilzomibu (RPMI-8226) .....	82
Obrázek 26: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci bortezomibu (H929).....	83
Obrázek 27: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci ixazomibu (H929) .....	84
Obrázek 28: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci carfilzomibu (H929).....	84

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Referenční meze krevního obrazu u dospělých [3] .....	20
Tabulka 2: Aplikace chemoterapie na MM buňky (bortezomib R1).....	61
Tabulka 3: Mapa obsazených pozic 96-jamkové destičky pro IncuCyte® analýzu.....	62
Tabulka 4: Mapa obsazených pozic 48-jamkové destičky se vzorky pro qPCR a flowcytometrickou analýzu (řada B = 24hod inkubace, řada D = 48hod inkubace).....	63
Tabulka 5: Mix pro reverzní transkripci .....	66
Tabulka 6: Teplotní program pro reverzní transkripci.....	66
Tabulka 7: Příprava zásobních mixů pro 96-jamkovou qPCR destičku.....	68
Tabulka 8: Úmrtnost buněk myelomové linie RPMI-8226 (%) .....	71
Tabulka 9: Úmrtnost buněk myelomové linie H929 (%) .....	71

## SEZNAM ZKRATEK

7-AAD .....	7-aminoactinomycin D
ADCC .....	buněčná toxicita závislá na protilátkách, antibody-dependent cellular toxicity
AL .....	akutní leukémie
ALL.....	akutní lymfoblastová leukémie
APC.....	antigen prezentující buňky, antigen presenting cells
B2M .....	$\beta$ -2-mikroglobulin
BCMA.....	antigen zrání B-lymfocytů, B-cell maturation antigen
BCG vakcína.....	vakcína z bakterie <i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
BCR .....	B-buněčný receptor, B-cell receptor
BiTEs .....	biospecifické T-lymfocytární struktury, bispecific T-cell engagers
CAR .....	chimérický antigenní receptor, chimeric antigen receptor
CD znaky .....	povrchové diferenační antigeny, cluster of differentiation
cDNA.....	komplementární deoxyribonukleová kyselina, complementary deoxyribonucleic acid
CLL.....	chronická lymfatická leukémie, chronic lymphocytic leukemia
CRAB.....	skupina klinických příznaků pro mnohočetný myelom: hyperkalcémie, renální insuficience, anémie a poškození kostí, hypercalcemia, renal dysfunction, anaemia, bone involvement
Ct .....	cyklus prahové hodnoty, cycle of threshold
CT .....	výpočetní tomografie, computed tomography
CTLA-4.....	cytotoxický T-lymfocytární antigen 4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina, deoxyribonucleic acid
F/R primer.....	„přední“/„zadní“ primer, forward/reverse primer
FBS .....	fetální hovězí sérum, fetal bovine serum
Fab fragment .....	fragment vázající antigen, antigen-binding fragment
Fc fragment .....	krystalizující fragment, crystallizing fragment
FDA .....	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Food and Drug Administration
FISH.....	fluorescenční hybridizace in situ, fluorescent in situ hybridisation
Fv .....	variabilní fragment, variable fragment
GFP .....	zelený fluorescenční protein, green fluorescent protein

HCC .....	hepatocelulární karcinom, hepatocellular carcinoma
HCL .....	vlasatobuněčná leukémie, hairy cell leukemia
HEPES pufr.....	kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová
HL .....	Hodgkinův lymfom
HLA .....	lidský leukocytární antigen, human leukocyte antigen
HSC.....	hematopoetická kmenová buňka, hematopoietic stem cell
IFN- $\gamma$ .....	interferon $\gamma$
Ig .....	imunoglobulin
IgA/G/M.....	imunoglobulin A/G/M
IgH .....	těžký řetězec imunoglobulinu, immunoglobulin heavy chain
IL .....	interleukin
ISS.....	Mezinárodní inscenační systém, International Staging System
KIR receptor .....	inhibiční receptor NK buněk, killing inhibitory receptor
KO.....	krevní obraz
LAK buňky .....	lymfokiny aktivovaní zabíječi, lymphokine activated killers
M1/M2 .....	typy aktivovaných makrofágů
MICA/B .....	povrchový glykoprotein příbuzný rodině MHC glykoproteinů I. třídy (sekvence A/B), MHC class I polypeptide-related sequence A/B
M-Ig .....	monoklonální imunoglobulin
M-IgG .....	monoklonální imunoglobulin G
M-IgM.....	monoklonální imunoglobulin M
MM .....	mnohočetný myelom
MP režim.....	režim kombinované léčby melfalan-prednison
MPT režim .....	režim kombinované léčby melfalan-prednison-thalidomid
MR .....	magnetická rezonance
mRNA.....	„messengerová“ ribonukleová kyselina, messenger ribonucleic acid
N/C poměr.....	nukleo/cytoplazmatický poměr
NHL .....	non-Hodgkinův lymfom
NK buňky.....	přirození zabíječi, natural killer cells
NKG2D .....	aktivační receptor patřící do rodiny NKG2-
qPCR.....	kvantitativní polymerázová řetězová reakce, quantitative polymerase chain reaction (= PCR v reálném čase, real-time PCR)
PBS .....	fosfátový pufr, phosphate-buffered saline

PD-1 .....	antigen 1 programující buněčnou smrt, programmed cell death 1
R1/2/3.....	replikát 1/2/3
RLT pufr .....	RNA lyzační pufr
RNA.....	ribonukleová kyselina, ribonucleic acid
rRNA.....	ribosomální ribonukleová kyselina, ribosomal ribonucleic acid
RS buňky.....	Reed-Sternbergovy buňky
RTG .....	rentgen
SLAMF7 .....	člen 7 rodiny signálních lymfocytárních aktivačních molekul, signaling lymphocytic activation molecules family member 7
SLL .....	lymfom z malých lymfocytů, small lymphocytic lymphoma
TAA .....	antigeny asociované s nádory, tumour-associated antigens
T <sub>C</sub> -lymfocyty .....	cytotoxické T-lymfocyty
TCR.....	T-buněčný receptor, T-cell receptor
TGF-β.....	transformující růstový faktor β, transforming growth factor β
T <sub>H</sub> -lymfocyty .....	pomocné T-lymfocyty, helper T-cells
TIL buňky .....	nádor infiltrující lymfocyty, tumour infiltrating lymphocytes
tRNA.....	transferová ribonukleová kyselina, transfer ribonucleic acid
TSA.....	antigeny specifické pro nádory, tumour-specific antigens
VAD režim.....	režim kombinované léčby vinkristin-adriamycin-dexametazon
VEGF.....	vaskulární endotelový růstový faktor, vascular endothelial growth factor
WHO.....	Světová zdravotnická organizace, World Health Organization
WM .....	Waldenströmova makroglobulinémie

## ÚVOD

Mnohočetný myelom je i přes neustálý vývoj léků a léčebných strategií stále nevléčitelná hematologická malignita. Je charakterizovaná zvýšenou proliferací a akumulací abnormálních plazmatických buněk. Cílem protinádorové terapie je dosažení remise nemoci, přičemž se uplatňuje několikero komplexních terapeutických postupů. Účelem léčby je jednak ničení patologických buněk a jednak řešení komplikací, které jsou důsledkem nemoci. Navíc je nutné počítat i s nežádoucími účinky léčiv, kterých se při léčbě projevuje celá řada, a to v závislosti na senzitivitě pacienta.

Předkládaná diplomová práce se zabývá stanovením míry exprese ligandů MICA a MICB na buňkách mnohočetného myelomu v závislosti na koncentraci aplikované chemoterapie pomocí real-time PCR.

Vedle chemoterapie se lze čím dál častěji setkat s možností využití imunoterapie či kombinované léčby (chemoterapie + imunoterapie). Bylo pozorováno, že protirakovinná účinnost některých chemoterapií je částečně způsobena stimulací imunitního systému k eliminaci nádorových buněk. Z toho vyplývá, že kromě přímého účinku chemoterapie na nádorové buňky jsou některé látky schopny i účinku nepřímého, a to prostřednictvím indukovaných NK buněk. Na nádorovou buňku tedy působí více než jeden mechanismus končící její apoptózou.

V posledních dvou desetiletích zlepšily své klinické výsledky u pacientů s mnohočetným myelomem nové látky zvané jako inhibitory proteazomu. Jedná se například o účinnou látku bortezomib, ixazomib nebo carfilzomib.

Cílem této diplomové práce bylo stanovení vhodné koncentrace zmíněných chemoterapeutik k využití v imunomodulační terapii s důrazem na schopnost NK buněk eliminovat nádorové buňky pomocí jejich cytotoxických mechanismů. NK buňky jsou vrození přirození zabíječi, kteří hrají důležitou roli v protinádorovém imunitním dozoru. Na rozdíl od jiných buněk imunitního systému nevyžadují NK buňky specifický nádorový antigen pro rozpoznání cíle. Taktéž se ukázalo, že je možné tyto buňky stimulovat k větší reaktivitě právě zvýšenou expresí ligandů MICA a MICB. NK buňky mají na svém povrchu příslušný NKG2D receptor, který je schopen tyto stresem indukované proteiny rozpoznat a zahájit cytotoxickou reakci vůči nádorovým buňkám.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 HEMATOPOÉZA

Pro zajištění všech funkcí krve je nezbytná neustálá produkce zralých krevních buněčných komponent. Proces tvorby krevních buněk je označován jako hematopoéza (krvetvorba). Je to dynamický a přísně regulovatelný děj, který zajišťuje dozrávání přibližně 10 miliard buněk denně tak, aby byly jejich absolutní i relativní počty v periferní krvi, tkáních a lymfatickém systému přizpůsobeny aktuálním potřebám organismu [1, 2].

### 1.1 Lokalizace hematopoézy

Primární místa hematopoézy se v průběhu života mění. Krvetvorba člověka má dvě odlišné fáze – prenatalní (předporodní) a postnatalní (poporodní). Obecně se dá prenatalní krvetvorba rozdělit na tři období – mezoblastové, hepatolínéální a medulární období. V období mezoblastového vývoje je lokalizována nejprve do oblasti krevních ostrůvků ve žlutkovém váčku. Asi ve 4. týdnu života se primitivní cévy žlutkového váčku propojí s cévním systémem embrya. Mezoblastové období trvá asi do 10. týdne nitroděložního vývoje. Zároveň se po 6. týdnu objevuje hematopoéza v hepatocytech a vzápětí i slezině (hepatolínéální období). Nakonec tento úkol přejímá kostní dřěň, tzv. medulární hematopoéza, která začíná okolo 4. měsíce těhotenství [2, 3, 4].

U dospělého člověka probíhá vývoj a dozrávání krevních buněk v kostní dřěni (tzv. medulární hematopoéza) a v lymfatické tkáni v lymfatických uzlinách. Medulární hematopoéza je zachována zejména v tělech obratlů, hrudní a pánevní kosti. Játra a slezina si zachovávají reziduální schopnost hematopoézy, která může být za určitých okolností aktivována i v dospělosti – tzv. extramedulární hematopoéza. K opětovné aktivaci může dojít za patologických stavů, např. při hemolýze, myeloproliferativním onemocnění apod. Hematopoéza má u zdravého člověka velkou rezervu, dle potřeby může mnohonásobně (až 10×) zvýšit produkci jednotlivých krevních elementů [1, 3, 5].

### 1.2 Vývoj krevních komponent

Hlavním hematopoetickým orgánem je kostní dřěň. Je zde přítomen „pool“ hematopoetických kmenových buněk (HSC, hematopoietic stem cell). Protože dávají za vznik všem typům krevních buněk, jsou často označovány jako pluripotentní hematopoetické kmenové buňky. HSC mají schopnost jednak dělit se na zralejší multipotentní progenitorové buňky a jednak udržovat v kostní dřěni stálý počet těchto prekurzorů (sebeobnova). Současná



sebeobnova a diferenciacie je zajištěna asymetrickým dělením, při kterém vzniká jedna dceřiná buňka identická s mateřskou a více diferencovaná buňka dceřiná. Progenitorové buňky jsou pak schopné se rozdělit na rostoucí specializované buňky, což je proces, který se opakuje a nakonec vede ke zralým leukocytům (bílé krvinky), erytrocytům (červené krvinky) i trombocytům (krevní destičky) [3, 6, 7].

Principem hematopoézy je tedy postupná proliferace a diferenciacie HSC do buněk progenitorových, prekurzorových a dále do zralých (maturovaných) buněk. Tato řada dělení vytváří větvení jednotlivých vývojových drah a dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu dceřiných buněk. HSC dává vzniknout dvěma typům progenitorů – lymfoidnímu a myeloidnímu. Společný lymfoidní progenitor diferencuje během lymfopoézy do dalších prekurzorových buněk, jejichž diferenciacie a proliferace vede ke vzniku zralých B-lymfocytů, T-lymfocytů a NK buněk (přirození zabíječi, natural killer cells). V průběhu myelopoézy vzniká ze společného myeloidního progenitoru zbytek leukocytů, erytrocyty a megakaryocyty. Na jaký typ buněk se HSC a progenitorové buňky rozdělí rozhodují do značné míry specifické signální faktory jako jsou hemopoetické růstové faktory (hemopoetiny), nervové a humorální vlivy a přívod látek potřebných pro krvetvorbu [1, 6, 8, 9].

### 1.2.1 Leukopoéza

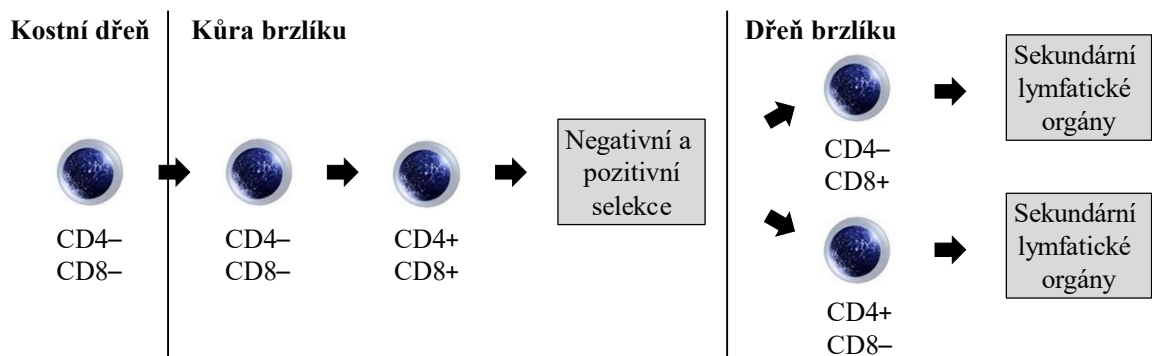
Leukopoéza je proces zodpovědný za tvorbu leukocytů neboli bílých krvinek. Každý typ bílé krvinky vzniká ze samostatné prekurzorové buňky. Leukocyty lze rozdělit na granulocyty a agranulocyty. Neutrofil, eozinofil a bazofil jsou nazývány jako granulocyty kvůli cytoplazmatickým granulím, jejichž zbarvení dává těmto buňkám charakteristický vzhled v krevních nátěrech. Mezi agranulocyty se pak řadí lymfocyty a monocyty. Lymfocyty jsou jediné krevní elementy, které vznikají v lymfoidní řadě, ostatní leukocyty vznikají ze společného myeloidního progenitoru [3, 6].

#### 1.2.1.1 Lymfopoéza

Produkce nových lymfocytů neboli lymfopoéza je vzhledem k zásadním regulačním funkcím lymfocytů v imunitních pochodech poměrně složitý vývoj. Probíhá nejdříve v primárních lymfoidních tkáních – kostní dřevina a brzlík. Zralé buňky opouštějí primární lymfatické orgány krevní cestou a osidlují tzv. sekundární lymfatické orgány (lymfatické uzliny, slezina a slizniční lymfatická tkáň), v nichž se lymfocyty setkávají s antigeny [3, 6].

Část populace lymfoidních multipotentních buněk migruje prostřednictvím cirkulace krve do brzlíku, kde se dále diferencují na **T-lymfocyty** (odvozeno od lat. slova *Thymus*,

brzlík). Kromě lokalizace diferenciacce se od sebe jednotlivé lymfocyty liší specifickými povrchovými CD znaky (cluster of differentiation) na buněčných membránách. Všechny zralé T-lymfocyty nesou povrchový marker CD3+. Vývoj těchto buněk se časně rozděluje do dvou odlišných subpopulací, a to na cytotoxické T-lymfocyty (T<sub>C</sub>-lymfocyty, CD8+) a helperské neboli pomocné T-lymfocyty (T<sub>H</sub>-lymfocyty, CD4+). Dozrávající T-lymfocyty neboli thymocyty procházejí přísnou selekcí. Tento dozrávající proces přečká jen asi 1–2 % buněk (pozitivní selekce). Ostatní T-lymfocyty, zejména ty, které by byly schopny rozlišit vlastní antigeny, jsou likvidovány apoptózou (negativní selekce). Po vyplavení do oběhu setrvávají T-lymfocyty po různě dlouhou dobu v obvodové krvi a poté přecházejí do lymfatických tkání, odkud se zase mohou vracet zpět do krevního oběhu. Většina T-lymfocytů přežívá několik měsíců až let, malá část jen krátce (10–20 dní). Následující Obrázek 1, představuje zjednodušený vývoj T-lymfocytů včetně CD znaků [6, 9, 11].

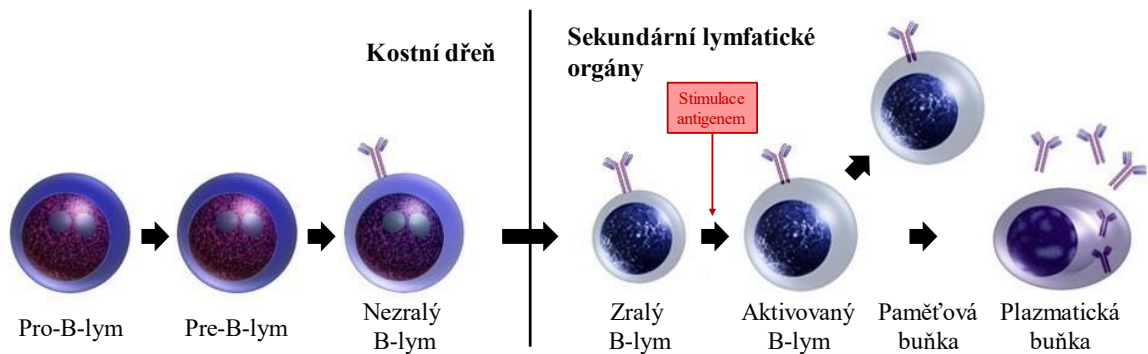


Obrázek 1: Lymfopoéza – T-lymfocyty [10]

První zobrazenou buňkou je dvojitě negativní (CD4-CD8-) T-lymfocytární prekurzor. Prekurzor vstupuje do brzlíku, kde dozraje ve dvojitě pozitivní thymocyt (CD4+CD8+). Thymocyty, které podlehnou pozitivní selekci, vstupují do medulární části (dřevě) brzlíku buď jako zralé T<sub>C</sub>-lymfocyty (nahore) nebo T<sub>H</sub>-lymfocyty (dole). Zralé T-lymfocyty mohou následně vycestovat do sekundárních lymfatických orgánů.

Zbytek lymfoidní řady zůstává v kostní dřevě a dává vzniknout **B-lymfocytům** (odvozeno od lat. slova *Bursa Fabricii*, imunitního orgánu u ptáků, kde byly B-lymfocyty poprvé objeveny). Během svého vývoje procházejí B-lymfocyty několika stádii (viz Obrázek 2). V první fázi vývoje pro-B-lymfocytu v kostní dřevě přeskupují své imunoglobulinové geny. Tato fáze není závislá na antigenu, ale na interakcích s buňkami kostní dřevě. Výsledkem první fáze je nezralý B-lymfocyt, který nese antigenní receptor ve formě povrchového imunoglobulinu M (IgM). Tyto nezralé B-lymfocyty pak opouštějí kostní dřevě a končí v sekundárních lymfatických orgánech, kde po stimulaci cizím antigenem dokončí svůj

proces zrání. Zralé B-lymfocyty, které jsou v posledním stádiu stimulovány a aktivovány setkáním se specifickým cizím antigenem, proliferují a diferencují se na paměťové a plazmatické buňky vylučující protilátky. Na rozdíl od B-lymfocytů, které mají Ig (imunoglobuliny) vázané na povrchu, Ig plazmatických buněk jsou cytoplazmatické, protože jsou vytvářeny k sekreci. Přechod v jednotlivá vývojová stádia je opět spojen s masivním úhynem nespotřebovaných nebo poškozených buněk. Většina B-lymfocytů přežívá 10–20 dnů [6, 9, 12].



Obrázek 2: Lymfopoéza – B-lymfocyty [10]

*Během vývoje B-lymfocytů dochází k četným změnám v tvorbě CD znaků (CD změny nejsou vyobrazeny). Po dokončení vývoje v oblasti kostní dřeně jsou B-lymfocyty vyplavovány do sekundárních lymfatických orgánů (např. do sleziny). Tam se B-lymfocyty setkávají s cizím antigenem, čímž jsou stimulovány k aktivaci a přeměně buď na paměťové, nebo plazmatické buňky.*

T-lymfocyty a B-lymfocyty jsou částečně schopny sebeobnovy. Lymfoidní buňky kolující v periferní krvi jsou v tzv. klidovém stavu. Po setkání s cílovými antigeny (může jít o infekční agens, tumory nebo i tělu vlastní nepatologické antigeny v případě autoimunitních onemocnění) se lymfocyty aktivují a mění se v lymfoblasty. Lymfoblasty jsou zpravidla větší než lymfocyty a mají zvýšenou rychlost syntézy RNA (ribonukleová kyselina, ribonucleic acid) a proteinů. Mohou dále proliferovat a vyvíjet se v tzv. efektorové formy lymfocytů v podobě paměťových buněk (B-lymfocyty i T-lymfocyty), plazmatických buněk (B-lymfocyty) nebo cytotoxických buněk (T-lymfocyty). V krvi ani v hemopoetických orgánech nelze, kromě plazmatických buněk, morfologicky rozlišit jednotlivé lymfocyty a jejich vývojová stádia. K rozlišení se využívá hlavně jejich povrchových znaků a imunologických vlastností [6, 8, 9].

Třetí subpopulace lymfocytů, kam se může společný lymfoidní progenitor diferenciovat, jsou **NK buňky**. Jsou to velké buňky podobné lymfocytům s výraznou granulární cytoplazmou. Na rozdíl od ostatních lymfocytů nezprostředkovávají NK buňky adaptivní antigenně specifickou imunitu. Jsou schopny působit cytotoxicky na buňky infikované virem nebo některé nádorové buňky a tím je rychle zabíjet. Hlavním signálem je pro NK buňky změna exprese povrchových molekul buněk. Jejich granula obsahují lysozomální enzymy, granzymy a perforiny, které jsou schopny porušit cytoplazmatickou membránu cílové buňky a tím vyvolat její lýzu. Po aktivaci NK buňky také rapidně uvolňují širokou škálu cytokinů, které slouží k formování adaptivních imunitních reakcí [6, 9, 13].

### 1.3 Poruchy vývoje krevních elementů

Pro uvedení této kapitoly je k dispozici Tabulka 1 zobrazující zastoupení jednotlivých krevních buněk u dospělých jedinců v periferní krvi za normálních podmínek.

*Tabulka 1: Referenční meze krevního obrazu u dospělých [3]*

Typ buněk		Počet buněk / l
Erytrocyty	Ženy	$3,8-5,2 \times 10^{12}$
	Muži	$4,0-5,8 \times 10^{12}$
Leukocyty		$4,0-10,0 \times 10^9$
Neutrofilní segmenty		$2,0-7,0 \times 10^9$
Neutrofilní tyče		$0,05-0,15 \times 10^9$
Lymfocyty		$0,8-4,0 \times 10^9$
Monocyty		$0,08-1,20 \times 10^9$
Eozinofily		$0,0-0,5 \times 10^9$
Bazofily		$0,0-0,2 \times 10^9$
Trombocyty		$150-400 \times 10^9$

#### 1.3.1 Poruchy leukocytárního systému

Vzhledem k tomu, že mají bílé krvinky vcelku krátké časové rozpětí v periferní cirkulaci, mohou být změny v množství nebo kvalitě konkrétních buněk velmi výrazné. Pokud je buněčná linie zvýšena, přípona použitá ke zvýšení je „-cytóza“ nebo „-filie“. Naopak přípona používaná pro označení poklesu buněčné linie je „-penie“. Kromě kvantitativních změn leukocytů existují taktéž choroby způsobené kvalitativními změnami (v morfologii nebo funkci) leukocytů [2, 8].

### 1.3.1.1 Kvantitativní poruchy

Jakékoli snížení či zvýšení určitého typu buněk signalizuje jedinečnou reakci organismu na různé infekce nebo jiné podněty. Tyto stavy jsou obvykle přechodné a jakmile se základní stav samovolně vyřeší, většinou se počty vrátí k normálu [8].

Neutropenie je snížení počtu neutrofilních granulocytů v periferní krvi pod  $1,5 \times 10^9/l$  (u dospělých). Termín agranulocytóza se využívá pro extrémní snížení či úplnou absenci této populace. Klinicky závažným problémem bývají polékové neutropenie, které vznikají v důsledku celé řady mechanismů po expozici různým léčivům. Naopak příčinou neutrofilii mohou být infekce, záněty, obezita či těhotenství [3].

K odhalení eozinopenie je nezbytné znát absolutní počet eozinofilů. Příčinou jsou závažné zánětlivé reakce a infekce, při nichž dochází k uvolňování adrenalinu. Významnějším nálezem je eozinofilie, kdy počet eozinofilů v periferní krvi přesahuje hodnoty  $0,5 \times 10^9/l$ . Příčinou může být velká škála onemocnění, např. dermatitidy, alergická, virová nebo parazitární onemocnění, ale i různé typy nádorových onemocnění [5].

Bazopenie provází například akutní revmatické horečky a léčbu kortikosteroidy. Bazofilie je běžně spojována s chronickou myeloidní leukémií, ale také s alergickými reakcemi nebo infekcemi [3, 5].

Lymfopenie je pokles lymfocytů v periferní krvi pod  $1 \times 10^9/l$ , který působí jako nezávislý prediktor infekce. V souvislosti s lymfopenií je třeba rozlišovat, zda se jedná o pokles T-lymfocytů nebo B-lymfocytů. Nejčastější příčinou bývají maligní onemocnění. Absolutní počet lymfocytů cirkulujících v periferní krvi se liší v závislosti na věku. U malých dětí ve věku od 1 do 4 let je normální, že mají relativní lymfocytózu. Vedle početních změn je však nutné také brát v potaz i morfologické a funkční odchylky leukocytů. Zdaleka nejběžnějším onemocněním vykazující variace v lymfocytech je infekční mononukleóza. Mezi další příčiny lymfocytózy se řadí různé virové i bakteriální infekce [3, 8, 16].

Monocytopenie je definována jako hladina monocytů pod  $0,1 \times 10^9/l$ . Je pozorována u případů aplastické anémie, těžkých tepelných poraněních nebo kortikoterapii. Více častá je monocytóza (více než  $1 \times 10^9/l$ ), která může být pozorována u celé řady patologických stavů. Nejčastějšími příčinami jsou chronické infekce, jako např. tuberkulóza, ne/hematologické malignity a další [17].

### 1.3.1.2 Kvalitativní poruchy

Kvalitativní změny bílých krvinek probíhají buď v jádře, nebo v cytoplazmě. Tyto změny jsou klasifikovány jako vrozené nebo získané, přičemž získané vady jsou pozorovány

mnohem častěji. Pečlivé přezkoumání krevního nátěru pacientů odhalí mnohé z diskutovaných změn. Například kromě zvýšení počtu segmentovaných neutrofilů, které vedou k neutrofilii nebo posunu doleva, mohou být při rozvoji infekce pozorovány toxické změny leukocytů. Mezi ně řadíme toxickou granulaci, toxickou vakuolizaci a přítomnost Döhleho tělísek [8].

Toxická granulace je nadměrná granulace co do množství a intenzity. V neutrofilech se obvykle objevují shluky toxických granulí a někdy je granulace tak velká, že připomíná bazofilní granule. Společně s toxickou vakuolizací, kdy se v cytoplazmě objevují velké či malé vakuoly, provází infekce a septické stavy [5].

Döhleho tělíška neboli inkluze jsou sytě modré útvary vyskytující se v blízkosti cytoplazmatické membrány. Jsou často pozorovány u neutrofilů, monocytů a méně často i lymfocytů. Jejich výskyt doprovází infekce, popáleniny či léčba cytostatiky. Někdy je lze pozorovat i v průběhu nepatologických stavů, jako je těhotenství [8].

Jaderné abnormality leukocytů zahrnují stav zvaný hypersegmentace (více než 5 jaderných segmentů), který je obvykle pozorován u megaloblastických procesů nebo při nedostatku vitamínu B12 [5].

## **1.4 Hematologické malignity**

Hematologické malignity jsou choroby vznikající z hemopoetických buněk buď zcela nezralých, kdy odchylka začíná již v kmenových buňkách, nebo z buněk na určitém stupni vývoje. Je to tzv. klonální vývoj, kdy v jedné buňce vznikne změna v genetické výbavě, která představuje pro buňku růstovou výhodu. V dceřiných buňkách se tato odchylka opakuje, a tak vzniká populace nádorových komponent, která je postupně díky svým vlastnostem schopna utlačovat normální krvetvorbu [3].

Hematologická nádorová onemocnění lze třídit na nemoci myeloidní a lymfoidní. Myeloidní vycházejí z myeloidní kmenové buňky, ze které za normálních okolností vznikají erytrocyty, granulocyty, monocyty a trombocyty. Lymfoidní nádory vycházejí z lymfoidní linie (T-lymfocyty a B-lymfocyty, NK buňky). Další dělení malignit rozlišuje nádory akutní a chronické. Akutní onemocnění vede ke smrti nemocného obvykle v týdnech až měsících, zatímco chronické umožňuje přežití v měsících až letech. Vzhledem k zaměření této práce budou dále popsány pouze lymfoidní malignity [3].

### **1.4.1 Akutní leukémie**

Akutní leukémie (AL) jsou neoplastické poruchy hematopoézy, které jsou zapříčiněny maligní transformací krvetvorných buněk v časném stádiu jejich vývoje. Příčiny AL jsou z velké části neznámé. Nicméně předpokládá se, že zvýšený výskyt AL může způsobovat dlouhodobé vystavení ionizujícímu záření nebo např. benzenu ve vzduchu. Některé léky používané k léčbě rakoviny, jako jsou např. alkylační činidla, jsou také spojovány se zvýšeným výskytem AL [18].

#### **1.4.1.1 Akutní lymfoblastové leukémie**

Akutní lymfoblastová leukémie (ALL) je maligní onemocnění, které se vyvíjí v důsledku mutace lymfoidních prekurzorových buněk, které mají svůj původ v kostní dřeni nebo brzlíku, v určité fázi zrání. Leukemické buňky se trvale hromadí v intramedulárních a extramedulárních místech a neustále soutěží s normální tvorbou a funkcí hematopoetických buněk. To má za následek anémii, trombocytopenii, neutropenii, stejně jako přemnožení lymfoblastů ve tkáních jako jsou játra, slezina, lymfatické uzliny atd. [8].

ALL převažuje u dětí a představuje asi 80 % případů AL v dětství. Vrchol incidence bývá mezi 3.–5. rokem věku. Druhé maximum incidence bývá ve věku nad 80 let. ALL u dospělých jsou prognosticky závažnější a vyžadují agresivnější kombinovanou léčbu [2].

Na základě exprese markerů na buněčném povrchu se ALL dělí podle WHO (Světová zdravotnická organizace, World Health Organization) na dva odlišné podtypy: B-lymfoblastové leukémie (B-ALL), představující přibližně 85 % případů a T-lymfoblastové leukémie (T-ALL), které tvoří přibližně 15 % případů. U B-lymfoblastové leukémie je časté postižení i jiných tkání než periferní krve a kostní dřene, jedná se o centrální nervový systém, uzliny, játra nebo slezinu. T-ALL často postihuje brzlík, při rychlém růstu takto lokalizované masy může být prvním projevem onemocnění dechová tíseň, není vzácný pleurální výpotek. Může taktéž postihovat i další tkáně, zde jsou nejčastější infiltrace kůže, tonzil, jater nebo sleziny [3, 20].

### **1.4.2 Lymfoproliferativní syndrom**

Lymfoproliferativní poruchy zahrnují ty poruchy lymfocytů, u kterých dochází ke klonální, maligní proliferaci různých stádií vývoje B-lymfocytů, T-lymfocytů, případně NK buněk. Mají-li tato onemocnění původ v nezralých, tzv. prekurzorových buňkách (lymfoblasty), pak jde o lymfoblastické leukémie. To již bylo diskutováno v kapitole o akutních leukémiích [3].

Lymfoproliferativní stavy postihují lymfatické tkáně, tzn. uzliny, játra, slezinu a také kostní dřev, případně mohou vznikat i v extralymfatických orgánech. Tyto stavy jsou nazývány lymfomy. V případech, kdy jsou nádorové buňky od počátku onemocnění v periferní krvi, mluvíme obvykle o leukémiích. Rozdíly mezi lymfomy a leukémiemi se často stírají, protože lymfom může leukemizovat a leukémie naopak tvořit tumoriformní léze. Do lymfoproliferativních poruch se řadí i poruchy plazmatických buněk. Každá z těchto skupin má několik společných rysů. Tato onemocnění postihují především osoby vyššího věku, jsou chronické, postupují pomalu a většina komplikací souvisí s oslabenou imunitní schopností [8].

#### **1.4.2.1 Hodgkinův lymfom**

Hodgkinův lymfom (HL), zvaný také jako lymfogranulom, představuje významné lymfoproliferativní onemocnění vycházející z lymfatické tkáně. Je to jeden z nejčastějších lymfomů (představuje asi 30 % všech lymfomů) u mužů ve věkové skupině kolem 20 let. Vznikají většinou v krčních uzlinách, přičemž si pacienti stěžují na bolest v této oblasti. Jedinci, kteří byli v minulosti vystaveni viru Epstein-Barrové mohou být zranitelnější vůči HL [8].

Diagnostika se provádí na základě buněčných rysů pozorovaných v biopsii lymfatických uzlin. V nátěru periferní krve ani kostní dřevě diagnostické buňky nejsou pozorované. Podstatou nemoci je přítomnost Reed-Sternbergových buněk (RS buněk) a Hodgkinových buněk, jakožto jejich mladších prekurzorů. Ty vznikají z poškozených B-lymfocytů, které unikly apoptóze [19].

Do skupiny HL patří dvě odlišné jednotky. Většinu případů tvoří klasický HL a výjimečným nálezem je nodulární HL s predominancí lymfocytů. Dle WHO klasifikace krevních chorob se pak klasický HL rozděluje na: subtyp nodulární sklerózy, subtyp smíšené buněčnosti, na lymfocyty bohatý Hodgkinův lymfom a na subtyp lymfocytární delecce. Liší se v lokalizaci nalezených RS buněk v uzlinách a bolestivostí těchto uzlin [19].

#### **1.4.2.2 Non-Hodgkinův lymfom**

Non-Hodgkinovy lymfomy (NHL), jsou všechny ostatní lymfomy, které nejsou hodgkinského typu. Od HL se NHL liší morfologickým i biologickým chováním a klinickým průběhem. Je třikrát častější než HL a vyskytuje se ve všech věkových kategoriích. Může se projevovat jako nebolestivé postižení krčních lymfatických uzlin a může se rozšířit i do gastrointestinálního a dýchacího systému, kůže, jater a sleziny. Rozsah šíření může být více sporadické a lymfomové buňky lze nalézt i v periferní krvi [2, 8].



Některé z non-Hodgkinových lymfomů jsou uvedeny v dalších kapitolách.

#### **1.4.2.3 Chronická lymfatická leukémie**

Chronická lymfatická leukémie (CLL, chronic lymphocytic leukemia) je způsobena klonální proliferací B-lymfocytů a je nejčastější chronickou leukémií s předností mužů oproti ženám. Medián věku při stanovení diagnózy je 65 let. U tohoto typu leukémie se předpokládá genetická predispozice [8].

Plurální termín „chronické lymfatické leukémie“ se používá pro širší skupinu nemocí, jež se charakterizují akumulací vyzrálých B-lymfocytů s postupnou infiltrací kostní dřeně, mízních uzlin, sleziny, a nakonec se rozlévají do periferní krve. V krevním nátěru jsou nacházeny převážně malé zralé B-lymfocyty s úzkým lemlem cytoplazmy a kondenzovaným jádrem bez jadérka. Vzhledem k tomu, že jsou tyto lymfocyty velmi fragilní, zjišťujeme v nálezu velké množství jaderných stínů a rozpadajících se buněk [3, 19].

Buňky CLL mají charakteristický imunofenotyp definovaný koexpresí znaků CD5, CD19 a CD23. K odlišení CLL od ostatním lymfoidních malignit může dobře posloužit znak CD200, který je u CLL silně exprimován [22, 23].

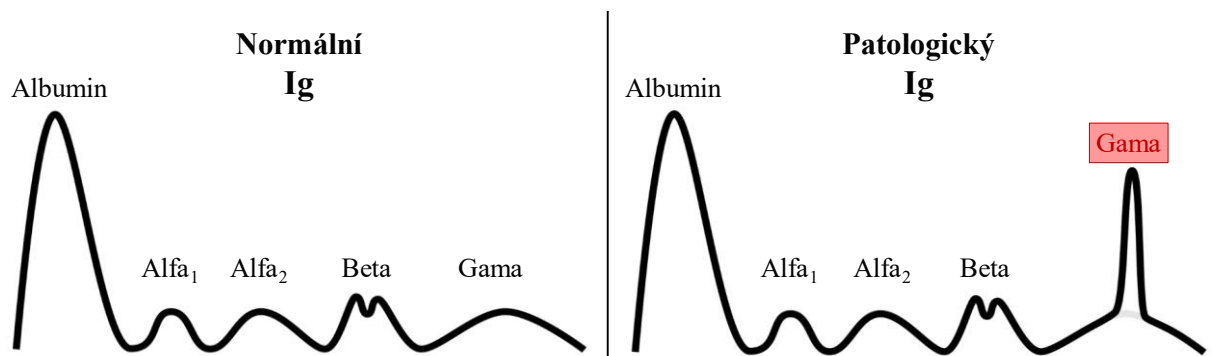
Identický imunofenotyp má i onemocnění s názvem lymfom z malých lymfocytů (SLL, small lymphocytic lymphoma). Zásadním rozdílem mezi SLL a CLL je nesplnění kritéria pro lymfocytózu v periferní krvi u SLL [24].

#### **1.4.2.4 Vlasatobuněčná leukémie**

Vlasatobuněčná leukémie (HCL, hairy cell leukemia) je vzácná B-lymfocytová malignita, která je odvozena od vlasových výběžků mononukleárních buněk. Klíčovou morfológickou entitou je tedy křehce vypadající mononukleární buňka s vláskovitými výběžky cytoplazmy. Představují přibližně 50 % buněk pozorovaných v nátěru periferní krve. Tyto buňky nakonec infiltrují kostní dřeň a slezinu, což vede k trombocytopenii [8].

#### **1.4.3 Malignity z plazmatických buněk**

Malignity z plazmatických buněk jsou klonální proliferativní onemocnění B-lymfocytů, respektive plazmatických buněk, které jsou charakterizovány zvýšenou sekrecí jednoho homogenního Ig produktu. Vytvořený patologický Ig zobrazuje při elektroforéze takřka identický výsledek jako Ig zdravého člověka. Rozdílem je zřetelně viditelný vysoký vrchol pro gama řetězec imunoglobulinu, tzv. M-komponenta (viz Obrázek 3) [21].



Obrázek 3: Vzor elektroforézy sérových proteinů u zdravého pacienta a např. u pacienta s mnohočetným myelomem [25]

Normální a patologický (abnormální) Ig vykazují rozdíl v podobě vysokého vrcholu gama řetězce imunoglobulinu, tzv. M-komponenta.

Kromě mnohočetného myelomu, který bude popsán v samostatné kapitole, se do malignit plazmatických buněk dá zařadit i Waldenströмова makroglobulinémie (WM).

#### 1.4.3.1 Waldenströмова makroglobulinémie

Waldenströмова makroglobulinémie je dle WHO definována jako lymfoplazmocytární lymfom infiltrující kostní dřeň, který produkuje monoklonální imunoglobulin M (M-IgM). Tato definice jasně odlišila WM od jiných lymfoproliferativních jednotek, které také mohou produkovat M-IgM [19].

V periferní krvi může být nálezem lymfocytóza s přítomností malých B-lymfocytů, plazmocytoidních lymfocytů a plazmatických buněk. Kromě postižení kostní dřeně může mít pacient zvětšenou slezinu, játra a lymfatické uzliny [21].

U WM se předpokládají genetické vlivy, protože až u 20 % nemocných jde o familiární výskyt. Pacienti bývají starší, bez ohledu na pohlaví. Ačkolí u těchto pacientů neexistuje žádný jedinečný profil příznaků specifických pro WM, většina z nich má bolesti hlavy, závratě, zrakové problémy a vážné problémy s koagulací. Vzhledem k tomu, že je IgM velká molekula, má schopnost obalovat krevní destičky, bránit jejich funkci, interferovat s koagulačními faktory a způsobit potenciální neurologické a trombotické komplikace [8].

## 2 MNOHOČETNÝ MYELOM

Mnohočetný myelom (MM), někdy označován také jako plazmocytární myelom, je lymfoproliferativní onemocnění charakterizované klonální proliferací a akumulací neoplasticky transformovaných plazmatických buněk v kostní dřeni. Infiltrací kostní dřene těmito patologickými buňkami je zapříčiněn postupný útlak fyziologické hematopoézy. Pro stanovení diagnózy MM je nezbytně nutné prokázat přítomnost klonální populace plazmatických buněk v kostní dřeni. Pro MM je typická přítomnost M-Ig v periferní krvi (séru) a/nebo v moči. Dle přítomnosti imunoglobulinu lze MM dělit na sekrenující a nesekrenující typ. MM je dále spojený s postižením skeletu a destrukcí kosti ve formě osteolytických lézí nebo osteoporózy [19, 21, 26, 27].

### 2.1 Etiopatogeneze

Mnohočetný myelom představuje jednu ze tří nejčastějších hematologických malignit a jeho incidence je 4,8/100 000. To znamená, že každý rok onemocní přibližně 5 osob na 100 000 obyvatel. Medián věku v době diagnózy se pohybuje mezi 65–70 lety [28].

Rozvoj onemocnění u pacienta zásadně ovlivňuje jeho genetická výbava. Bylo pozorováno, že až u 36 % pacientů s MM se vyskytuje abnormální chromozom 13. Aberace na tomto chromozomu zahrnují monozomii, delece nebo translokace. Pacienti s MM a s chromozomálním poškozením mají horší prognózu, vyšší rychlost akcelerace onemocnění a snížené přežití [29].

Dále se předpokládá, že ke klonální proliferaci plazmatických buněk přispívá několik environmentálních a pracovních faktorů. Mezi ně patří vystavení radioaktivnímu záření, práce zahrnující používání organických rozpouštědel, práce s toxiny, např. v textilním průmyslu, a jakékoli další povolání, které může primárně nebo sekundárně vystavit člověka chemikáliím, pesticidům nebo herbicidům [30].

### 2.2 Patofyziologie

Maligní mutace vzniká na úrovni lymfocytu, který proliferuje a vyžívá do patologických plazmocytů, které jsou na rozdíl od fyziologických plazmatických buněk dlouhověké. Tyto plazmocyty sekrenují četné cytokiny, které způsobují projevy nemoci (B-příznaky), viz kapitola Klinické příznaky (str. 19).

Zvýšená aktivita plazmatických buněk dále vede k odpovídající zvýšené aktivitě osteoklastů. Osteoklasty jsou velké mnohjaderné buňky v kostní dřeni, které absorbují kostní

tkáň. Opačnou funkci mají osteoblasty, které kostní tkáň opět „dostávají“ a společně se podílejí na remodelaci neboli přestavbě kostí. Za fyziologických podmínek je funkce osteoblastů přísně regulována. Při zvýšené „nekontrolované“ aktivitě osteoklastů je úbytek kostní hmoty nevyhnutelný a tato patologie obvykle vyvolává u pacientů s MM nejčastější příznak – bolest kostí. Sérový vápník je také značně zvýšen v důsledku úbytku kostní hmoty a tato událost může vést k selhání ledvin nebo tvorbě ledvinových kamenů [8].

Myelomové buňky ve většině případů vytvářejí monoklonální imunoglobulin (M-Ig), a to buď kompletní molekulu, nebo pouze lehké řetězce. Obvykle je to imunoglobulin G (IgG). M-Ig se může v organismu chovat interně, tzn. projevuje se pouze svými fyzikálními vlastnostmi – ovlivnění viskozity. Hyperviskozita v plazmě způsobuje komplikace jako je rozmazané vidění nebo bolesti hlavy. Často však způsobuje vlastní patologické projevy, když se váže na určité antigeny (nervová vlákna – neuropatie, depozita v ledvinách – nefropatie) či zasahuje do rovnováhy fyziologických dějů (hyperkoagulace či hemoragická diatéza) [8, 19].

Detekce M-Ig se daří pomocí imunofixace u 93 % nemocných, klasickou elektroforézou se podaří M-Ig prokázat asi v 80 % případů. U 20 % pacientů s MM není tvořena celá molekula M-Ig, ale jsou produkovány pouze monoklonální lehké řetězce. Tyto řetězce jsou metodou imunofixace prokazovány obvykle jen v moči. V séru se jejich průkaz klasickou elektroforézou nedaří pro jejich nízkou koncentraci. Proto je nutno při podezření na MM vyšetřit metodou imunofixace nejen krev, ale i moč [19].

Někteří nemocní trpí tzv. nesekrečním MM, kdy ani v séru, ani moči není M-Ig pomocí imunofixace prokázán. Jedná se asi o 3 % případů, u kterých se však někdy podaří novou metodou analýzy prokázat volné lehké řetězce v krvi [19].

V důsledku přebytku lehkých řetězců (kappa a lambda,  $\kappa$  a  $\lambda$ ) mohou někteří jedinci s MM tvořit zvláštní protein, zvaný Bence-Jonesova bílkovina. Nachází se v moči v důsledku snížené filtrační schopnosti ledvin, někdy vyvolané hyperkalcémií z vápníku uvolněného při „ničení“ kostí [8].

### **2.3 Klinické příznaky**

Klasickou trojici příznaků tvoří únava (v důsledku anémie), bolesti kostí (v důsledku zvýšené aktivity osteoklastů) a opakované infekce (v důsledku oslabené imunity). Příznaky se obvykle zpočátku nevyvíjejí, ale jak se počet patologických plazmatických buněk zvyšuje, pacient zaznamenává první příznaky a jejich postupné zhoršování. Při prvním vyšetření pacienta s bolestmi zad nebo anémií je ve skutečnosti diagnóza MM často přehlédnuta. Ještě

větší problém to je u pacientů, kteří trpí i jiným onemocněním, např. postmenopauzální osteoporóza nebo revmatoidní artritida [8, 31].

Postižení kostí provází chronické bolesti zad a u 70 % pacientů s MM se časem rozvine jedna nebo více patologických zlomenin. Nejzávažnější komplikace je zlomenina obratle, jeho dislokace nebo stlačení s následnou kompresí míchy. To způsobuje neurologické funkční poruchy horních a/nebo dolních končetin [19].

Častým příznakem může být renální selhání. V důsledku zvýšené infiltrace lehkých řetězců M-Ig do proximálních tubulů nejsou tyto tubulární buňky schopné zpracovat veškeré infiltrované množství a vrátit je zpět do oběhu, jako se to děje při fyziologických stavech. Nezpracované lehké řetězce se pak dostávají do moči. Zvýšená koncentrace lehkých řetězců v tubulech však ve svém důsledku poškozuje tubulární buňky a vznikají tak poruchy tubulárních funkcí. Prevencí úplného selhání ledvin je udržování diurézy nad 3 litry [19].

Dalšími příznaky může být již zmíněná anémie, trombocytopenie, neutropenie, zvyšování viskozity vlivem M-Ig, ale i trombocytopenie v důsledku interakce lehkých řetězců M-Ig s trombocyty. Cytopenie je výjimečně jediným projevem MM, kdy ostatní příznaky v ojedinělých případech chybí [19].

## **2.4 Laboratorní diagnostika**

Laboratorní diagnostika by se dala rozdělit na 3 pomyslná hlavní stádia. Jedná se o průkaz přítomnosti kostních lytických ložisek, zvýšeného počtu plazmocytů v kostní dřeni a stanovení M-Ig v krvi a v moči [19].

### **2.4.1 Průkaz kostních ložisek**

Jelikož bolesti kostí bývají první stížností pacienta, mělo by být provedeno rentgenové (RTG) snímkování. Obvykle je snímkována pouze bolestivá oblast a při zkoumání RTG snímků se klade důraz na pečlivou kontrolu na nadměrnou osteopenii a lytické léze. Na obrázku níže lze tyto léze z RTG snímku zřetelně poznat (Obrázek 4). Může být zjištěna i fraktury kostí, u kterých se pak zjišťuje jejich původ. Pokud nepředcházel úraz, který mohl zlomeninu způsobit, vzniká podezření na patologickou frakturu v důsledku poruchy kostní tkáně [19].

Pokud po provedení dalších screeningových vyšetření (budou uvedeny v dalších kapitolách) vznikne podezření, že by potíže nemocného mohly souviset s MM, provádí se screeningové snímkování skeletu (lebka, krční, hrudní, bederní páteř, žebra, pánev a stehenní a pažní kost). Dále se snímkuje bolestivé oblasti, které nejsou v rámci screeningu běžné [19].



*Obrázek 4: Boční RTG snímek lebky pacienta s MM [32]*

*Obrázek výše představuje typický obraz mnohočetných ostře ohraničených lytických lézí různé velikosti. Ložiska jsou označena šipkami.*

Nevýhodou RTG je nízká senzitivita, kdy je pro zviditelnění ložiska nutný až několikanásobný úbytek kostní tkáně. Mnohdy je tedy přítomna bolest způsobená osteolýzou bez zřetelného nálezu na RTG snímku. To je situace, kdy je indikováno zobrazení metodou magnetické rezonance (MR) nebo výpočetní tomografie (CT, computed tomography). Nahrazení rentgenu za celotělovou MR není z kapacitních důvodů zatím možné. Pomocí MR je možné rozeznat patologickou infiltraci kostní dřeně a odlišit ji od fyziologické kostní dřeně podstatně dříve, než vznikne závažné poškození kostní struktury. CT je vhodná jako metoda volby pro zobrazení těch částí skeletu, které nelze jinak dobře zviditelnit klasickým RTG snímkem (např. lopatky, žebra, hrudní kost) [19, 32].

Z hlediska diferenciální diagnostiky a indikace k zahájení terapie MM je nezbytné odlišit asymptomatickou („doutnající“) a symptomatickou formu MM. U doutnajícího myelomu, nejsou přítomna osteolytická ložiska a pacient je zcela asymptomatický [33].

#### **2.4.2 Počet plazmocytů a jejich morfologie v kostní dřeni**

V historii se počet plazmocytů stanovoval pouze z roztěru aspirátu kostní dřeně na sklíčku. Kostní dřeň byla získávána metodou sternální punkce. Tato metoda je stále hojně využívána, má však několik úskalí. Při provádění sternální punkce se vždy do aspirátu dostane určité množství periferní krve, která naředí buňky kostní dřeně. Výsledný počet klonálních plazmatických buněk nemusí tedy vždy dosáhnout 10 %, jakožto diagnostického hraničního nálezu pro MM. Pokud je ovšem podezření na MM, následuje v současnosti další test – histologické hodnocení válečku kostní dřeně, který se získává trepanobiopsií z lopaty

kosti kyčelní. Histologické vyšetření dále umožňuje stanovit dle exprese kappa a lambda lehkých řetězců v plazmocytech jejich klonalitu [19].

Zmnožené plazmatické buňky mohou vypadat jako normální plazmocyty s nízkým nukleo/cytoplazmatickým poměrem (N/C poměr). Mají excentricky uložené jádro bez jadérek, které má hutný chromatin a objemnou silně bazofilní cytoplazmu. Cytoplazma má v Golgiho zóně výrazné projasnění, které naléhá přímo na jádro. Kromě takovýchto normálně vypadajících plazmocyty mohou být přítomny i jejich morfoloogicky méně zralé formy. Mohou být patrná jadérka, jemný chromatin a vysoký N/C poměr [3].

Plazmatické buňky se objevují ve shlucích a mohou se jevit i jako dvoujaderné nebo s bizarní strukturou. U některých se dokonce mohou vyvinout bezbarvé inkluze zvané Russellova tělíčka nebo jiné krystalické vměstky. Jsou to více či méně homogenní vakuoly různé velikosti i počtu a v May-Grünwald-Giemsovo barvení mají vzhled modrých, fialových či růžových sférických inkluzí. Někdy však během barvicí procedury dochází k jejich rozpuštění a pak se nebarví. Cytoplazma může být zcela vyplněna takovýmito inkluzemi, kdy je jádro vytlačeno a někdy i zdeformováno. Tyto buňky připomínají hrozen vína (tzv. grape cells, resp. Mottovy buňky). Mezi atypické úkazy v kostní dřeni patří i plamenné plazmocyty, které se jeví jako plazmatické buňky s nápadným červeno-růžovým zbarvením cytoplazmy při okrajích buňky s obsahem IgA (imunoglobulin A) bohatého na glykoprotein. Při výraznější osteolýze jsou dobře patrné i osteoklasty [3, 8, 21].

Dochází-li k vyplavení plazmatických buněk do periferní krve a počet klonálních plazmocyty dosahuje 20 % v diferenciálním rozpočtu leukocytů, resp. přesahuje-li absolutní počet plazmocyty  $2 \times 10^9/l$ , pak hovoříme o plazmacelulární leukémii [3].

### **2.4.3 Stanovení M-Ig v krvi a v moči**

Každý pacient s podezřením na poruchu plazmatických buněk by měl podstoupit test elektroforézy sérových proteinů a imunofixační elektroforézu pro kvantifikaci a typizaci M-komponenty. M-komponenta může být nejprve detekována rutinní, běžnou elektroforézou jako úzký pík obrázek, typický pro M-Ig, který deformuje normální symetrii vzoru elektroforézy imunoglobulinu, ale jen při dostatečné koncentraci. Standardně se proto vyšetřuje vzorek séra a moči metodou imunofixace. Tato metoda dává kvalitativní výsledek, zda je či není M-Ig přítomen a pokud ano, jakého je typu. Při pozitivním nálezu je následně prováděna elektroforéza s denzitometrickým hodnocením množství M-Ig jak v séru, tak ve vzorku 24hodinové moči. Jeho koncentrace v séru se vyjadřuje v g/l. V moči je doporučeno jej vyjadřovat v g/24 h čili naměřená koncentrace v moči (g/l) vynásobená diurézou [19, 31].

Při stanovení imunoglobulinů kvantitativně je obvykle vyšší koncentrace té imunoglobulinové třídy, do níž spadá M-Ig a zároveň jsou sníženy koncentrace ostatních Ig. Nejčastější je nález IgG, který je zjištěn až u 90 % pacientů. Kritérium pro stanovení diagnózy MM je koncentrace monoklonálního IgG (M-IgG) v séru  $> 30 \text{ g/l}$  a  $> 1 \text{ g/24 h}$  v moči. Dále bývá obvykle přítomen IgA s koncentrací  $> 25 \text{ g/l}$  [21].

Zvýšení rychlosti sedimentace nad  $100 \text{ mm/h}$  (Westergrenova metoda) u jinak zdravého jedince také naznačuje přítomnost M-komponenty. Přibližně 3 % nemocných mají nesekreční formu MM, kdy neoplastické plazmocyty sice M-Ig tvoří, ale nesekredují, takže v séru ani moči je nelze prokázat [21, 31].

Volné lehké řetězce imunoglobulinu a jejich poměr  $\kappa/\lambda$  v séru odráží nevyváženou produkci těchto řetězců klonálním procesem. Referenční rozsah poměru  $\kappa/\lambda$  je 0,25–1,65 [31].

#### **2.4.4 Další laboratorní stanovení**

Další důležité testy pro stanovení stádia a prognózy zahrnuje klasický kompletní krevní obraz (KO), testy funkce ledvin a sérového vápníku [31].

KO může poskytnout důležitá vodítka k diagnóze MM. Jak nemoc postupuje, u pacienta se téměř jistě vyvine normocytární, normochromní anémie. Myelom signalizuje i velmi vysoká hodnota celkové bílkoviny v séru a nízký albumin poukazuje obecně na patologický proces [31, 34].

Ačkoli hladina M-komponenty poskytuje nejdůležitější měřítko nádorové zátěže, měření hladiny sérového  $\beta 2$ -mikroglobulinu bylo také použito ke sledování progresu myelomu.  $\beta 2$ -mikroglobulin je protein, který je vylučován všemi lymfocyty včetně plazmatických buněk v průběhu jejich životního cyklu. Hladiny nad  $3,5 \text{ mg/l}$  svědčí od zvýšení počtu plazmatických buněk, i když M-komponenta není nijak dramaticky zvýšena. Hodnocení  $\beta 2$ -mikroglobulinu je stanoveno dle prognostického systému ISS (Mezinárodní inscenační systém, International Staging System) pro mnohočetný myelom. Vychází ze sérových koncentrací jak  $\beta 2$ -mikroglobulinu, tak i albuminu [31, 35].

Kromě případů se sekrecí pouze lehkých řetězců – tzv. Bence-Jonesova proteinu či nesekrečního MM, nacházíme v periferním krevním nátěru abnormalitu nazývanou jako rouleaux („penízkovatění“) erytrocytů. Na rozdíl od klasické aglutinace je rouleaux nespecifická vazba červených krvinek a v krevním nátěru vypadají jako hromádky mincí. Rouleaux může způsobit falešně snížené počty erytrocytů a falešně zvýšený střední objem erytrocytu [8, 21].



Kritéria poškození orgánů či tkání mnohočetným myelomem popisují kritéria „CRAB“. Je to skupina klinických příznaků pro MM, která zahrnuje hyperkalcémii (hypercalcemia), renální insuficienci (renal dysfunction), anémii (anaemia) a poškození kostí (bone involvement). V případě hyperkalcémie je to hodnota vápníku zvýšená o více než 0,25 mmol/l nad horní limit normálního rozmezí nebo větší než 2,75 mmol/l. Kritérium pro renální insuficienci je snížení clearance kreatininu pod 40 ml/min nebo zvýšení koncentrace sérového kreatininu nad 177  $\mu$ mol/l. Zvýšení hemoglobinu o více než 20 g/l než je dolní limit normy nebo snížení pod 100 g/l jsou příznaky anémie. Jedno nebo více osteolytických ložisek na RTG skeletu už je považováno na kostní postižení v důsledku MM [36, 37].

Vyšetření na průtokovém cytometru má u MM význam především v diagnostice morfologicky atypických forem. Počet plazmocytů v kostní dřeni touto metodou bývá obvykle nižší, než počet zjištěný morfologicky. Příčinou je to, že plazmocyty se vyskytují v trsech, a tak unikají cytometrické detekci. Normální plazmocyty jsou CD19+ CD38+ CD138+ CD45+ a CD56-. Maligní plazmocyty jsou na povrchové znaky velmi bohaté, exprimují silně CD38 a CD138. Na rozdíl od normálních plazmocytů jsou zpravidla CD19 negativní a další B-lymfocytární znaky také chybí, jde např. o CD20 a CD22. Pomocí průtokové cytometrie lze u myelomu stanovit i tzv. labeling index plazmatických buněk. Jde o důležitý prognostický faktor, který vyjadřuje míru jejich proliferační aktivity. Jeho hodnoty udávají procentuální zastoupení buněk v S-fázi buněčného cyklu, tj. buněk aktivně tvořících DNA (deoxyribonukleová kyselina, deoxyribonucleic acid) [21].

S příchodem lepších metod pro stanovení molekulárního fenotypu nádoru se zjišťuje, že specifické přestavby genů mají biologický i prognostický význam. Je-li použita metoda FISH (fluorescenční hybridizace in situ, fluorescent in situ hybridisation), má až 90 % nemocných prokázáno nějakou abnormitu. Pravidlem je aneuploidie se složitými komplexními změnami. Časté jsou také translokace zahrnující lokus pro IgH (těžký řetězec imunoglobulinu, immunoglobulin heavy chain) na 14q32 (chromozom 14, pozice 32 na q raménku) s různými genovými partnery, nejčastěji je to oblast 11q13 nebo 4q16. Tyto translokace jsou pozorovány u 60 % pacientů. Dalšími významnými abnormalitami jsou hyperdiploidie (zmnožení více chromozomů), delece na chromozomech 13 a 17 (p53) nebo úplná ztráta 13q [3, 31].

## 2.5 Léčba

Mnohočetný myelom, podobně jako jiné lymfoproliferativní onemocnění nízkého stupně malignity, je v současnosti dostupnými prostředky nevléčitelný. Cílem léčby je tedy

dosáhnout hluboké a co nejdelší kompletní remise onemocnění (vymizení příznaků a projevů nemoci). Termínem kompletní remise se označuje situace, kdy žádnou dostupnou vyšetřovací metodou nelze zjistit přítomnost zhoubné nemoci v těle, ačkoliv se předpokládá ze zkušeností s průběhem této nemoci u jiných pacientů [32].

Klinické studie uvádějí medián intervalu od stanovení diagnózy asymptomatického (doutnajícího) myelomu do přechodu v symptomatický mezi 12–32 měsíci. Někdy může trvat i několik let a zřídka dochází ke spontánním remisím. V této asymptomatické fázi se doporučuje pouze pravidelné kontrolování a oddálení zahájení léčby. Pouze aplikace bisfosfonátů se ukázala přínosnou již v bezpříznakovém období. Bisfosfonáty sice nevedou k signifikantnímu oddálení přechodu k symptomatické formě, ale nemocní užívající bisfosfonáty již od stanovení diagnózy měli menší kostní postižení, a tedy lepší kvalitu života v době přechodu v symptomatický myelom [19, 32].

Nebylo prokázáno, že by okamžité zahájení cytostatické léčby zlepšilo prognózu oproti zahájení až při příznacích nemoci. Naopak může předčasné zahájení chemoterapie situaci zkomplikovat indukci sekundárního myelodysplastického syndromu. Proto je u MM léčba indikována teprve tehdy, kdy nepochybně dochází k progresi choroby. Jako dostačující rozhodující algoritmus dle současných názorů je RTG průkaz jednoho osteolytického ložiska. Pacienti, kteří jsou zcela bez příznaků, ale mají RTG nález, mají vysoké riziko přechodu v symptomatickou formu MM s mediánem intervalu 8 měsíců. Proto je u nich doporučeno okamžité zahájení léčby. Dalším rozhodujícím algoritmem je splnění kritérií symptomatické fáze onemocnění, kterými jsou známky orgánového poškození označované jako CRAB [19, 32].

Cílem léčby je dosáhnout maximálního poklesu monoklonálního imunoglobulinu. Prognosticky je nejpriznivější dosažení kompletního vymizení patologického M-Ig, ale M-Ig často klesá pouze na určitou hodnotu a na ní zůstává i při dalších léčebných cyklech. Pokud je tato hodnota stabilní po 3 cykly chemoterapie, nemá význam v této léčbě pokračovat. Z toho plyne doporučení pro aplikaci klasické chemoterapie podávat chemoterapii do doby dosažení maximální léčebné odpovědi + další tři měsíce, ale ne déle. Pak se buď léčba ukončí, nebo se zváží agresivnější přístup [31].

### **2.5.1 Netransplantační chemoterapie – monoterapie**

Na rozdíl od ostatních lymfomů a leukémií mnohočetný myelom špatně reaguje na tradiční chemoterapii, která byla úspěšně použita už v šedesátých letech. Nicméně pro

pacienty starší 70 let nebo pacienty s kontraindikací autologní transplantace krvetvorných buněk se jeví tato metoda léčby stále jako nejvhodnější [31].

Jedná se o kombinaci tabletového cytostatika melfalanu a prednisonu (režim MP). Pacienti tyto tablety užívají po dobu 4–7 dní v 4–6týdenních cyklech. Tato léčba trvá průměrně 9 měsíců nebo, dle jiného doporučení, do dosažení maximálního poklesu M-Ig neboli dosažení remise onemocnění. Počet neutrofilů by měl být před zahájením léčby větší než  $1 \times 10^9/l$  a počet trombocytů vyšší než  $75 \times 10^9/l$ . Klasická perorální léčba je standardní léčbou pro starší nemocné s méně agresivním onemocněním, kdy není na závadu, že léčebný efekt nastoupí pomaleji. Výhodou tohoto postupu je ambulantní aplikace a velmi dobrá tolerance [19, 32, 38].

V randomizovaných studiích bylo prokázáno, že cyklofosfamid (s nebo bez prednisonu) dosahuje podobných výsledků jako melfalan, a to jak v počtu léčebných odpovědí, tak i v délce přežití. Běžným režimem je opakované nitrožilní nebo perorální podávání cyklofosfamidů v týdenních intervalech s opakovanou jednorázovou perorální dávkou prednisonu podávanou vždy následující den po nitrožilní injekci. Cyklofosfamid je vhodný pro pacienty, kteří byli nejprve směřováni k léčbě melfalanem, ale jejich počet neutrofilů nebo trombocytů nedosahuje požadovaných hladin [19, 32, 38].

### **2.5.2 Netransplantační chemoterapie – polychemoterapie**

Léčebné režimy s dominantním postavením alkylačních cytostatik nepřinášejí jednoznačný prospěch před monoterapií melfalanem (a prednisonem) z hlediska délky přežití. Výhodou je velmi rychlý nástup účinku a je vhodné ji použít pro pacienty, u nichž se neplánuje vysokodávkovaná terapie. Léčba by se měla ukončit až 3 měsíce po dosažení remise [38].

### **2.5.3 Intenzivní vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací krvetvorné tkáně**

U nově diagnostikovaných nemocných dnešní léčebné strategie používají vždy, pokud je to možné, maximální možnou intenzivní léčbu s novými léky. Standardně se využívá u pacientů do 70 let. Výjimečně lze tuto léčbu nabídnout i pacientovi staršímu než 70 let, avšak pokud nemá závažné komorbidity (další onemocnění) a má výbornou celkovou zdatnost [19].

Tato léčba obsahuje několik cyklů indukční chemoterapie, které jsou následně zakončeny vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací kostní dřeně nebo kmenových krvetvorných buněk získaných z periferní krve [32].

Za optimální indukční chemoterapii se považuje režim s bortezomibem a/nebo lenalidomidem nebo thalidomidem, aplikovaný v 2–6 cyklech. Léčba musí proběhnout vždy bez většího poškození kmenových buněk, umožňující následný úspěšný sběr hematopoetických buněk pro nejméně 2 autologní transplantace. Pokračuje se vysokodávkovanou chemoterapií, kdy je optimálním režimem melfalan v dávce 200 mg/m<sup>2</sup>. Následuje jedna až dvě autologní transplantace kostní dřeně. Infuze autologního transplantátu slouží k obnově vlastní krvetvorby pacienta zničené vysokodávkovanou léčbou. Během této indukční fáze se stále aplikují bisfosfonáty, stejně jako v dalších fázích a někdy se užívají doživotně, jsou-li stále přítomná osteolytická ložiska [31, 32].

Režim, který si držel v posledních letech prioritní postavení jako indukční léčba před autologní transplantací, se nazývá VAD. Jedná se o trojkombinaci léků vinkristin-adriamycin-dexametazon. Režim VAD je také vhodný pro pacienty s renální insuficiencí, neboť není nefrotoxický a jeho toxicita se nezvyšuje při renálním selhání. Nevýhodou tohoto režimu je nutnost centrálního katetru a vyšší výskyt nežádoucích účinků glukokortikoidů. Dnes se však neoznačují jako optimální léčebná volba režimy bez nového účinného léku [39].

#### **2.5.4 Konsolidační léčba**

Jednoduchou nebo tandemovou autologní transplantaci lze považovat za konsolidační léčbu. Jiné typy konsolidační léčby jsou rovněž účinné, avšak nejsou hrazeny zdravotní pojišťovnou. Jedná se o režim na bázi léku, který byl nebo nebyl použitý v indukční léčbě [32, 38].

#### **2.5.5 Udržovací léčba v době remise**

Při udržovací léčbě byl dříve využíván interferon alfa. Studie z roku 2002 prokázaly medián prodloužení bezpříznakové fáze 6 měsíců. Aplikace interferonu alfa však u mnoha pacientů snižuje kvalitu života, protože jeho tolerance je velmi individuální a často způsobuje závažné nežádoucí účinky [19, 40].

Doposud nejúčinnějším lékem v udržovací léčbě mnohočetného myelomu je lenalidomid. Léčba je indikována až do progresu onemocnění. Doporučená dávka je 10 mg denně po dobu 2–3 let při dobré toleranci. Pro léčbu v remisi je také vhodný lék zvaný ixazomib, avšak v České republice není jeho úhrada zdravotní pojišťovnou schválena (na rozdíl od lenalidomidu) [38].

## 2.5.6 První až třetí relaps nebo rezistence na první léčebnou linii

Při léčbě relapsu musí intenzita léčby odpovídat agresivitě onemocnění i stavu pacienta a toleranci další léčby. V rámci relapsu lze použít všechny dostupné možnosti. Lze aplikovat klasické chemoterapeutické postupy režimy založené na kombinaci nových léků. Nejlépe však trojkombinace s využitím bortezomib- nebo lenalidomib-základů s přidáním jednoho z nových léků (carfilzomib, ixazomib, daratumumab, elotuzumab) [19, 38].

Indukční léčbu relapsu lze ukončit druhou vysokou dávkou melfalanu (200 mg/m<sup>2</sup> s podporou autologní transplantace (pokud má pacient zamražené vaky s krvetvornými buňkami z první indukční fáze). U agresivních relapsů je vhodné přikročit ihned k vysokodávkované chemoterapii [19].

Pokud nemoc relabuje v intervalu kratším než 1 rok, signalizuje to velmi agresivní onemocnění s nepříznivou prognózou a je třeba použít jiné léky, než byly použity v rámci 1. léčebné linie. U těchto nepříznivých forem relapsu je možné zvážit u mladších jedinců využití alogenní transplantace [38].

### 2.5.6.1 Alogenní transplantace krvetvorné tkáně

Alogenní transplantace, tedy transplantace krvetvorných buněk jiného člověka, je další možností jako pokračování vysokodávkované chemoterapie. Nejčastěji to je HLA (lidský leukocytární antigen/komplex, human leukocyte antigen) kompatibilní sourozenec nebo příbuzenský dobrovolník z registru dárců. Výjimečně se provádí tzv. syngenní transplantace, kdy je dárce jednovaječné dvojče [19].

Na rozdíl od autologní transplantace, jejíž princip spočívá v jednoduchém obnovení krvetvorby po vysokodávkované chemoterapii, je léčebný účinek alogenní transplantace mnohem komplexnější. Alogenní transplantát obsahuje T-lymfocyty dárce schopné rozpoznat přežívající nádorové buňky pacienta (příjemce), které jsou pak likvidovány imunitními mechanismy. Jde o tzv. reakci štěpu proti nádoru, která může bránit relapsu onemocnění. Výhodou je také nepřítomnost původních nádorových buněk v transplantátu, jako je tomu u autologní transplantace [19, 31].

Alogenní transplantace se de facto dá považovat za buněčnou imunoterapii. Nicméně je tento postup velmi omezeně proveditelný vzhledem k celkovému stavu většiny pacientů s MM a častému nedostatku kompatibilního dárce [31].

Medián přežití alogenně transplantovaných pacientů však stále není delší než medián přežití u autologně transplantovaných v důsledku podstatně vyšší mortality. Na základě těchto

údajů je alogenní transplantace považována za vhodnou pro pacienty s časně relabující chorobou, nikoliv pro nově diagnostikované [32].

### **2.5.7 Rezistentní relaps na veškerou dostupnou a pro pacienta vhodnou léčbu**

Pokud pacient nereaguje na veškerou dostupnou léčbu, lze onemocnění MM označit za refrakterní stav a dále podávat pouze paliativní nebo symptomatickou léčbu. Platí, že stejnou léčbu nemá cenu opakovat, pokud od jejího ukončení uběhlo méně než 6 měsíců [38].

### **2.5.8 Podpůrná léčba**

Bisfosfonáty jsou indikovány již od zjištění asymptomatického mnohočetného myelomu. Důležité je zahájit podávání těchto léků ihned při zjištění nemoci a podávat je dlouhodobě. Tyto léky zpomalují odbourávání kostí a mírní bolest. U nemocných, kteří tyto léky dostávají dlouhodobě, probíhá patologická osteolýza podstatně pomaleji. Pacienti mají také výrazně nižší počet patologických fraktur. Dlouhodobé léčebné podávání bisfosfonátů je doporučováno všem pacientům s MM, nezávisle na tom, zda jsou nebo nejsou známky postižení skeletu [32, 38].

U většiny pacientů s myelomem se s progresí onemocnění rozvine symptomatická anémie, tzv. myelomová anémie. Erythropoetin je indikován k léčbě anémie u pacientů s mnohočetným myelomem a chronickým renálním selháním, respektive u všech pacientů s anémií pod 100 g/l [38].

## **2.6 Informace k vybraným látkám k léčbě mnohočetného myelomu**

### **2.6.1 Cytostatika**

**Melfalan** (obchodní název Alkeran) je alkylační činidlo obsahující ve své molekule dvě 2-chlorethylové skupiny, které jsou schopny tvorby reaktivního intermediátu. Díky tomu má melfalan schopnost alkylovat dvě guaninové báze v DNA, čímž vytvoří mezi řetězci jedné DNA pevnou příčnou kovalentní vazbu. Tato vazba zabraňuje oddělení řetězců při replikaci DNA a tím pádem i dalšímu buněčnému dělení. Účinnější, než samotná aplikace melfalanu je jeho kombinace s prednisonem (MP režim) [41].

**Cyklofosamid** (obchodní název Endoxan) je alkylační činidlo, které prokázalo cytotoxický účinek u mnoha druhů nádorů. Podává se jako inaktivní léčivo (proléčivo), jehož metabolizací v játrech vznikají aktivní metabolity – alkylační látky. Tyto látky jsou schopny přenášet alkylové skupiny na DNA během procesu dělení buňky, což brání fyziologické

syntéze DNA. Cyklofosfamid se pravděpodobně zapojuje do S- nebo G2-fáze buněčného cyklu [41].

Cyklofosfamid dosahuje podobných výsledků jako melfalan. Podávání cyklofosfamidu je však méně myelotoxické než léčba melfalanem, a tak může být použito v indukční fázi léčby před sběrem hematopoetických buněk [41].

**Vinkristin** je protinádorová účinná látka ze skupiny alkaloidů získaných z rostliny barvínky *Vinca rosea*. Vinkristin je schopen se vázat na mikrotubulární protein tubulin a blokovat tak dělení buněk. Konkrétněji jeho účinek spočívá v zabránění polymerizaci tubulinu, aby vytvářel mikrotubuly, a navíc vyvolává depolymerizaci mikrotubulů již vytvořených. Vinkristin může také ovlivňovat syntézu RNA a DNA [41].

**Adriamycin**, též znám pod názvem doxorubicin, je cytostatické antibiotikum izolované z kultur *Streptomyces peuceotius*, var. *caesius* a patří do skupiny antracyklinů. Svůj protinádorový účinek uplatňuje prostřednictvím cytotoxických mechanismů s nepříznivým dopadem na syntézu DNA. Toxicita adriamycinu však souvisí především s proliferační aktivitou normální tkáně [41].

### 2.6.2 Inhibitory proteazomu

Jako proteazom, respektive komplex ubikvitin-proteazom, je označován multienzymový komplex odpovědný za řízení degradace intracelulárních specifických signálních proteinů a tím udržení homeostázy uvnitř buněk. Hraje tedy zásadní roli v proteinovém metabolismu buňky, podílí se na řízení buněčného cyklu a apoptózy, reparaci genomové DNA či mezibuněčné komunikaci. Pomocí tohoto děje jsou v buňce za fyziologických podmínek eliminovány chybně transplacované či nesprávně sestavené proteiny. Při inhibici proteazomu nedochází ke zničení signálních molekul, které již svojí úlohu splnily, vzniká signální chaos a v konečné fázi dochází k apoptóze buňky [19].

**Bortezomib** (dostupný v pod obchodním názvem Velcade) je definován jako dipeptidylborát a je specificky navržen tak, aby inhiboval chymotrypsinu podobnou aktivitu proteazomu 26S. Proteazom 26S je velký proteinový komplex zapojený do odbourávání ubikvitinovaných proteinů. Inhibice proteazomu 26S zabraňuje cílené proteolýze a ovlivňuje četnou signální kaskádu v buňkách. Konečným výsledkem této inhibice je odumření nádorových buněk apoptickou cestou. Experimenty ukázaly, že bortezomib je cytotoxický pro různé druhy nádorových buněk a že nádorové buňky jsou citlivější na proapoptotický účinek proteazomové inhibice než buňky normální [14, 42].

V současné době je zatím jeho účinek ověřen u MM, a je dále testován v klinických studiích u dalších lymfoproliferativních onemocnění. Byl původně schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration) v roce 2003 jako léčba relabujícího nebo refrakterního mnohočetného myelomu a jako léčba první volby byl schválen v roce 2008. V České republice se začal používat bortezomib od roku 2005 u vybraných nemocných s relabujícím MM. V roce 2006 byl v České republice registrován pro léčbu relapsu a v roce 2009 pro primoléčbu [38, 42].

Bortezomib se podává intravenózně a používá v kombinaci s velkou řadou léků včetně dexametazonu a prednisonu, melfalanu, doxorubicinu, vinkristinu, thalidomidu a dalších. Kombinované režimy vykazují zásadně vyšší počet léčebných odpovědí oproti monoterapii bortezomibem. Dle názorů expertů České myelomové skupiny by měl být bortezomib používán v trojkombinaci vždy, když je to možné. Výběr dalších dvou léků do kombinace s bortezomibem je vždy na základě fáze onemocnění, kdy má být léčba podána. Např. v indukční léčbě pacientů s dosud neléčeným MM, u kterých je plánovaná vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací krvetvorných buněk, je vhodná kombinace s dexametazonem a thalidomidem. Při léčbě pacientů s dosud neléčeným MM, u kterých se vyskytuje nějaká kontraindikace pro autologní transplantaci, se používá bortezomib v kombinaci s melfalanem a prednisonem [38].

Údaje z *in vitro*, *ex vivo* na zvířecích modelech s bortezomibem naznačují, že bortezomib zvyšuje diferenciaci a aktivitu osteoblastů a inhibuje funkci osteoklastů. Tyto účinky byly pozorovány u pacientů s mnohočetným myelomem při pokročilém osteolytickém onemocnění a léčbě bortezomibem [41].

Kromě indukce apoptózy MM buněk, zvyšují bortezomib expresi specifických ligandů na MM buňkách, které senzibilizují MM buňky k lýze za přítomnosti NK buněk a/nebo T-lymfocytů. Tyto přístupy léčby, včetně dalších možností zvýšení aktivity imunitního systému, budou popsány v samostatné kapitole.

**Ixazomib** (obchodní název Ninlaro) je malá molekula inhibitoru proteazomu druhé generace, která se používá v kombinaci s jinými antineoplastickými látkami k léčbě refrakterního mnohočetného myelomu. Je vysoce specifickým reverzibilním inhibitorem proteazomu 20S a také inhibuje podjednotku podobnou chymotrypsinu. Tento mechanismus nakonec způsobí apoptózu buněk MM [41].

Podává se jako ixazomib-citrát (proléčivo), který se rychle metabolizuje na biologicky aktivní formu, ixazomib. Hlavní výhodou oproti bortezomibu je, že představuje první perorálně biologicky dostupný inhibitor proteazomu [41].



**Carfilzomib** (obchodní název Kyprolis) je nový tetrapeptidický epoxyketonový inhibitor proteazomu, který vykazuje vysokou úroveň selektivity pro unikátní N-terminální místa obsahující threonin na proteazomu 20S, což je proteolytická jádrová částice uvnitř proteazomu 26S. Je velice podobný bortezomibu, ale na rozdíl o něj vykazuje minimální zkříženou reaktivitu oproti ostatním třídám proteáz, což vykazuje nižší toxicitu carfilzomibu [14].

### 2.6.3 Imunoterapeutika

**Thalidomid** byl poprvé uveden na trh koncem padesátých let 20. století jako sedativum. Krátce poté se stal první volbou pro těhotné ženy, jako lék proti nevolnosti. V roce 1961 byl stažen z prodeje po prokázání, že thalidomid způsobuje závažné poškození ještě nenarozených dětí. Způsobil vrozené vady u více než 10 000 dětí po celém světě a je zodpovědný za jednu z největších lékařských katastrof v historii. Mezi nejčastější vady patřila nepřítomnost horních nebo dolních končetin [43, 44].

Znovu se začal používat na přelomu 20. a 21. století jako úspěšná léčba široké škály onemocnění včetně lepry, Crohnovy choroby a mnohočetného myelomu. Průlom v chápání teratogenních účinků thalidomidu umožňují syntézu nových forem thalidomidu, které si zachovávají klinické výhody, ovšem bez teratogenních vedlejších účinků [44].

Přesto je však jeho použití stále svázáno s velkými bezpečnostními opatřeními a musí být dodržovány určité podmínky. Například negativní těhotenský test by měl předcházet vydání thalidomidu ženě, která nesplňuje jiná kritéria pro vydání (např. selhání vaječnicků, Turnerův syndrom, ageneze dělohy apod.) Ženy, které mohou otěhotnět, musí používat jednu metodu antikoncepce alespoň 4 týdny před zahájením léčby, během léčby, a po dobu alespoň 4 měsíců po ukončení léčby [41].

Přesný mechanismus účinku tohoto léku není doposud plně vysvětlen. Má imunomodulační, protizánětlivé a potenciální protinádorové účinky. Studie ukazují, že tyto účinky mohou být spojeny s potlačením nadměrné exprese tumor nekrotizujícího faktoru alfa. Stejně jako bortezomib stimuluje také buňky imunitního systému (T-lymfocyty a NK buňky) [41].

V současné době je možné thalidomid v řadě různých léčebných režimů v rámci indukční, konsolidační i udržovací léčby, a to u primoléčby i u relabujících nemocných. Nejlepší výsledky mají kombinované režimy s dexametazonem/prednisonem a bortezomibem/cyklofosfamidem. Zahájení léčby thalidomidem vyžaduje žádost a hlášení

SÚKL. I kombinace melfalan-prednison-thalidomid (MPT režim) ukázaly prospěch v přežití o přibližně 18 měsíců déle než kombinace MP [38].

Thalidomid je spojován s četnými nežádoucími účinky jako je konstipace, neuropatie, somnolence nebo únava. Kombinace thalidomidu s dexametazonem je spojena s vyšším rizikem žilní trombózy, proto se doporučuje i profylaktická antikoagulace [45].

**Lenalidomid** (obchodní název Revlimid) je analogem thalidomidu. Byl vyvinut ve snaze najít lék více účinný a méně toxický. Předpokládá se, že lenalidomid je vzhledem k četným nežádoucím účinkům thalidomidu lépe snášen. Například v udržovací monoterapii je thalidomid místo lenalidomidu doporučován pouze v případě nedostupnosti lenalidomidu nebo při jeho kontraindikaci či nesnášenlivosti [38].

Lenalidomid inhibuje proliferaci a zvyšuje apoptózu patologických plazmatických buněk u MM. Navíc také zvyšuje imunitní reakce zprostředkované T-lymfocyty a NK buňkami [19].

**Interferon alfa** představuje přirozeně se vyskytující cytokin produkovaný např. T-lymfocyty, které mají antiproliferativní účinek namířený proti nádorovým buňkám. Interferon alfa byl donedávna považován za standard v udržovací léčbě. Výsledky celkové analýzy dat pacientů s MM s udržovací léčbou interferonem alfa prokázaly medián bezpříznakového přežití vyšší o 4 měsíce. Avšak u většiny pacientů se objevují nežádoucí účinky této léčby, u jedné třetiny se jedná o závažné nežádoucí účinky. Dle publikovaných informací se zdá, že pouze u 5–10 % pacientů dochází k zásadnímu prodloužení života vlivem interferonu alfa. Potenciální přínos interferonu se musí vždy zvažovat spolu s jeho nežádoucími účinky [41, 46].

#### 2.6.4 Kortikoidy

**Prednison** patří do skupiny kortikosteroidů a má tak širokospektrální využití. Používá se k systémové léčbě a v závislosti na dávce ovlivňuje metabolismus téměř všech tkání. Při dávkách vyšších, než jsou potřeba pro substituční léčbu, má prednison rychlý antiproliferativní účinek a opožděný imunosupresivní účinek. V případě insuficience kůry nadledvin může prednison nahradit endogenní kortizol, jehož hlavní fyziologickou funkcí je regulace metabolismu sacharidů, proteinů i tuků [41].

**Dexametazon** je vysoce účinný a dlouhodobě působící glukokortikoid. Stejně jako ostatní glukokortikoidy má antialergické, antipyretické a imunosupresivní vlastnosti [41].

Lze použít jako vysokodávkovaná monoterapie pro iniciální léčbu pacientů, u nichž je cytostatická léčba kontraindikována. Častěji je ale znám jako součást režimu léčby VAD

v kombinaci s vinkristinem a adriamycinem. Zároveň se označuje za nejúčinnější komponentou této trojkombinace. Samotný dexametazon je možné podat okamžitě po stanovení diagnózy, aniž by byla ujasněna další strategie a není třeba čekat na zavedení centrálního žilního katetru jako v případě vinkristinu a adriamycinu [38].

### **2.6.5 Bisfosfonáty**

Bisfosfonáty (obchodní název Pamidronát, Lodronát, Bonefos) jsou léčivé přípravky ovlivňující strukturu a mineralizaci kostí. Tyto léky by měly být zařazeny do podpůrné léčby mnohočetného myelomu ihned po zjištění diagnózy, a to i v případě asymptomatického MM [41].

Bisfosfonáty inhibují kostní resorpci zprostředkovanou osteoklasty. Dlouhodobé podávání bisfosfonátů snižuje kostní morbiditu a zlepšuje kvalitu života, snižuje spotřebu analgetik a snižuje frekvenci analgetické radioterapie [41].

### **3 PROTINÁDOROVÁ IMUNITA**

K maligní transformaci buňky může dojít mnoha různými způsoby v důsledku selhání rozmanitých mechanismů regulace buněčného dělení a „sociálního“ chování buněk. Podstatou jsou zhoubné (maligní) buňky, které získaly schopnost nekontrolovatelně se rozmnožovat a pronikat z místa svého vzniku do okolních tkání, kde tvoří druhotné nádory, tzv. metastázy [11, 47].

Strategie ochrany před „odcizelými“ buňkami je založena na jejich identifikaci a následné likvidaci. Identifikace tělu nebezpečných vlastních buněk, které byly původně tolerovány a imunitním systémem chráněny, je založena na odhalení nových antigenních struktur, které se objevují na těchto buňkách v souvislosti se změnou jejich „programu“ [48].

#### **3.1 Nádorové antigeny**

Základním předpokladem rozpoznání nádorových buněk a následného navození protinádorové imunitní reakce je existence specifických povrchových antigenů, které by měly být pouze na nádorových, nikoli na normálních buňkách. Tyto antigeny se dají rozdělit do dvou kategorií: antigeny specifické pro nádory (TSA, tumour-specific antigens) a antigeny asociované s nádory (TAA, tumour-associated antigens) [11, 47].

##### **3.1.1 Antigeny specifické pro nádory**

Antigeny specifické pro nádory (TSA) jsou jen na povrchu nádorových buněk, zatímco normální buňky je neobsahují. Mezi tyto antigeny patří komplexy HLA molekul I. třídy s imunogenními peptidy (fragmenty), respektive produkty abnormální degradace normálních proteinů v nádorové buňce. Tento typ TSA je typický pro chemicky indukované nádory (např. methylcholantrenem) a pro některé leukémie asociované s chromozomálními translokacemi, které produkují specifický abnormální protein [11, 47].

Antigeny specifické pro nádory mohou být i komplexy HLA molekul I. třídy s fragmenty proteinů onkogenních virů. Tyto viry jsou schopny se při infekci zabudovat do náhodného, nefyziologického místa v genomu postiženého jedince. Mezi viry vyvolávající nádory patří například polyomavirus. Do TSA se řadí také abnormální formy glykoproteinů, vznikající připojením molekul kyseliny sialové na konce oligosacharidových řetězců povrchových glykoproteinů nádorových buněk. Tento proces se nazývá glykosylace, konkrétně sialylace. Dále mezi TSA můžeme zařadit i idiotopy myelomů a lymfomů. Tyto druhy nádorových buněk odvozených od B-, resp. T-lymfocytů mají na povrchu klonotypické

BCR (B-buněčný receptor, B-cell receptor), resp. TCR (T-buněčný receptor, T-cell receptor), jejichž vazebná místa jsou specifickými antigenními strukturami [11].

### **3.1.2 Antigeny asociované s nádory**

Antigeny asociované s nádory (TAA) nejsou specifické výhradně pro nádorové buňky, ale nacházejí se i na některých normálních buňkách. Jejich odlišnost spočívá v jejich expresi neboli počtu, v jakém se vyskytují na nádorových a normálních buňkách. Rozdílnost může být i v jejich abnormální časové nebo místní expresi. Stanovení exprese těchto antigenů je využíváno spíše jen jako pomocný diagnostický marker [11].

Mezi nejznámější TAA patří tzv. onkofetální antigeny, které jsou přítomny v normálních embryonálních buňkách. V postnatálním období se však ztrácejí a znovu se objevují na některých nádorových buňkách. Do této skupiny patří např.  $\alpha$ -fetoprotein nebo karcinoembryonální antigen. Jako TAA se mohou označovat některé melanomové antigeny nebo receptory růstového faktoru epitelálních buněk, které se mohou v malém množství vyskytovat i na normálních buňkách [47].

## **3.2 Protinádorové imunitní mechanismy**

Vzhledem k tomu, že maligní buňky jsou odvozeny normálních, sdílejí s nimi velkou část povrchových antigenů, které jsou ovšem imunitním systémem tolerovány. Ani antigenní abnormalita nádorové buňky ještě neznamena, že je imunitním systémem rozeznána a zlikvidována. Pokud však nádorové buňky rozeznány jsou, mohou se na boji s nimi podílet v zásadě všechny hlavní imunitní mechanismy – nespecifické (neutrofily, aktivované makrofágy, NK buňky) i antigenně specifické (opsonizační protilátky aktivující komplement, fagocytózu a buněčnou cytotoxicitu, dále zánětlivé  $T_H$ -lymfocyty a cytotoxické  $T_C$ -lymfocyty) [49].

### **3.2.1 Imunitní dozor**

Imunitní dozor je proces průběžného monitorování imunitního systému za účelem detekce a zničení neoplasticky transformovaných buněk. Pacienti, kteří mají poruchy této specifické buněčné imunity (imunodeficiency), mají zvýšené riziko nádorů vyvolaných viry. To poukazuje na fakt, že antigenně specifické imunitní mechanismy kontrolují přinejmenším tento druh nádorů, respektive spíše primární onemocnění způsobené viry, které mohou vyústit v nádorové přeměny [11, 50].

**Aktivované makrofágy** hrají důležitou roli při fagocytování pozůstatků odumřelých nádorových i normálních buněk. Ve spolupráci s opsonizačními protilátkami jsou schopny

abnormální buňky i aktivně zabíjet. Podílejí se také na vzniku zánětlivých reakcí a jsou podstatnými producenty cytokinů [49].

Existují dva typy aktivovaných makrofágů. První typ, M1, vzniká pod vlivem cytokinu interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Makrofágy M1 produkují hlavně interleukin 12 (IL-12) a efektivně fagocytují zbytky odumřelých buněk. Produkovaný IL-12 stimuluje T-lymfocyty a NK buňky a tím podporuje další rozvoj zánětlivého procesu. Naproti tomu pod vlivem cytokinů IL-4 a IL-13 vznikají z klidových forem makrofágů buňky typu M2. Hlavní funkcí makrofágů M2 je napomáhat hojení a regeneraci poškozených tkání (např. poraněním nebo mikrobiální infekcí). Tento typ produkuje hlavně protizánětlivé cytokiny IL-10 a transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ) [49].

Makrofágy zpravidla ve značném množství infiltrují nádory a jejich role je zde spíše negativní, jelikož to bývají především makrofágy typu M2, které se snaží „zachránit“ nádorem poškozenou tkáň. Makrofágy asociované s nádorem tak docela výrazně podporují růst nádorů, a to včetně buněk primárního nádoru, které mají schopnost metastazovat do jiných tkání [51].

**Cytotoxické T-lymfocyty (T<sub>C</sub>-lymfocyty)** patří k nejdůležitějším imunitním protinádorovým zbraním. Pomocí svých antigeně specifických receptorů (TCR) rozeznávají mimo jiné i některé nádorové buňky a ničí je mechanismy závislémi na těsném kontaktu mezi T<sub>C</sub>-lymfocyty a abnormální buňkou nebo prostřednictvím sekretovaných produktů [52].

Imunitní odpovědi založené na T<sub>C</sub>-lymfocytech (ale i na jiných typech lymfocytů) začínají v lymfatických uzlinách. Antigeně specifické T-lymfocyty musí nejprve rozeznat příslušné komplexy HLA molekul na povrchu antigen prezentujících buněk (APC, antigen presenting cells). Takovými APC mohou být nejčastěji dendritické buňky, makrofágy nebo také aktivované B-lymfocyty. Tyto APC jsou schopny pohltnout antigeny pocházející z nádorových (nebo jiných abnormálních) buněk, rozštěpit je na peptidové fragmenty, které pak vystaví na svém povrchu v komplexu s HLA molekulami [49].

Pokud prekurzorový T-lymfocyt rozezná takovýto antigen na povrchu APC, začne proliferovat a diferencovat na klon zralých efektorových T<sub>C</sub>-lymfocytů. Poruchy účinné prezentace nádorových antigenů jsou jednou z hlavních příčin selhání imunitní obrany proti nádorům [49].

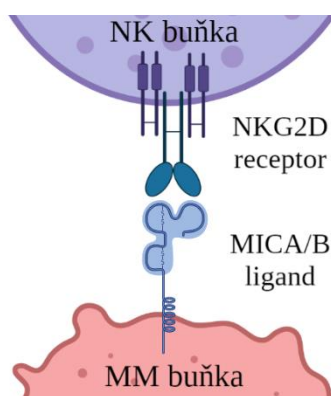
Zralé efektorové T<sub>C</sub>-lymfocyt jsou pak roznášeny krevním oběhem do tkání, kde působí a zabíjí nádorové buňky. Jedním z cytotoxických mechanismů je degranulace cytotoxických granulí z T<sub>C</sub>-lymfocytů, které jsou schopny proniknout do cílové buňky a způsobit u ní apoptickou smrt. Tento proces je umožněn specializovanými lysozomy, které

obsahují protein perforin a proteázy zvané granzymy. Tyto látky jsou obsaženy v již zmíněných granulích. Dalším cytotoxickým mechanismem je interakce mezi proteinem zvaným Fas ligand na povrchu T<sub>C</sub>-lymfocytů a příslušným receptorem na povrchu abnormální buňky (apoptický receptor). Tato interakce navodí v cílové buňce apoptické mechanismy [49].

**NK buňky** jsou popsány jako lymfocyty, které jsou schopny zabít rychle, bez předchozí stimulace, proliferace nebo diferenciace, některé nádorové a virem infikované buňky. Mechanismy jsou velmi podobné jako u T<sub>C</sub>-lymfocytů. NK buňky nemají žádné antigenně specifické receptory, přesto jsou nádorové a jiné abnormální buňky schopny rozeznat. Tyto patologické buňky mají na svém povrchu abnormálně málo molekul HLA I. třídy, a navíc mají významně více substancí povrchových molekul (např. molekuly související s řetězcem HLA I. třídy – MICA a MICB) [48].

Nepřítomnost nebo málo HLA molekul rozeznají NK buňky díky receptoru KIR (inhibiční receptor NK buněk, killing inhibitory receptor), který mají NK buňky na svém povrchu. Tyto receptory při obsazení ligandem, tj. molekulou HLA, cytotoxickou aktivitu NK buňky inhibují. Naopak při absenci těchto HLA molekul se inhibiční efekt KIR neuplatní [48].

MICA a MICB jsou glykoproteiny příbuzné HLA, se kterými mají podobnou strukturu. Jsou to tzv. stresem indukované ligandy, které jsou rozeznávány receptorem zvaným jako NKG2D receptor (aktivační receptor patřící do rodiny NKG2-). Tyto abnormality na nádorových buňkách jsou signálem pro aktivaci NK buněk k vyliší obsahu jejich cytotoxických granul obsažených v cytoplazmě. Vazbu MICA/B a NKG2D ilustruje Obrázek 5 [48, 52].



Obrázek 5: Vazba MICA/B ligandu s NKG2D receptorem [53]

*Na nádorových MM buňkách se vytvářejí stresem indukované ligandy MICA a MICB. NK buňky jsou schopny tyto ligandy rozeznat za pomoci receptoru NKG2D na svém povrchu. Po vazbě jsou spuštěny cytotoxické mechanismy NK buněk, které nádorové buňky zlikvidují.*

Další způsob identifikace nebezpečných buněk využívá protilátek. NK buňky jsou schopné rozeznat také Fc části (krystalizující fragmenty, crystallizing fragments) protilátek navázaných na povrch nádorových buněk a následně navodit jejich apoptózu. Tento mechanismus se nazývá ADCC (buněčná toxicita závislá na protilátkách, antibody-dependent cellular toxicity) [52].

**Protilátky** se v protinádorové imunitě uplatňují hlavně tak, že se vážou na povrchové nádorové antigeny typu TSA nebo TAA, čímž je opsonizují (označí) a umožní tak jejich napadání fagocyty či NK buňkami (ADCC mechanismus). Uplatnit se může také aktivace komplementu. Protilátky některých izotypů navázané na povrch nádorových buněk mohou aktivovat klasickou cestu komplementu, což vede k opsonizaci, chemotaxi fagocytů, rozvoji zánětlivé reakce a finálně k osmotické lýze nádorových buněk [49].

Někdy může vazba protilátek na určité receptory může vyvolat v takto napadené nádorové buňce apoptózu. Pro vznik kvalitních vysokoafinních protilátek proti antigenům nádoru je důležitá spolupráce B-lymfocytů s pomocnými T-lymfocyty [49].

Z výše uvedených příkladů je zřejmé, že existuje několik možností, jak uchránit organismus před vznikem nádoru. T-lymfocyty a NK buňky neustále kontrolují povrchy buněk buď přímo, anebo podle „vzorků“ přinesených dendritickými buňkami. Jejich cílem je odhalit nádor už v zárodku a zabránit jeho rozšíření. Nádorově „zvrhlé“ buňky vznikají v každém organismu několikrát za život z různých příčin. O tom, že se z první nádorové buňky nevyvine nádor, rozhoduje schopnost imunitního dohledu tuto buňku okamžitě zlikvidovat [48].

### **3.3 Mechanismy, jimiž se nádory brání před rozpoznáním**

Nádorové buňky mají několik různých mechanismů, díky nimž se stávají odolnými nebo nerozpoznatelnými imunitním systémem. Výskyt nádorových antigenů je na nádorových buňkách velmi variabilní. Znamená to, že některé nádorové buňky tyto antigeny vůbec nemají, nebo jich exprimují tak málo, že je imunitní systém de facto ignoruje. Nádorové antigeny podléhají často mutagenním změnám nebo navázáním kyseliny sialové na jejich epitop, čímž se maskuje jejich cizorodost. Mnohé nádory produkují faktory inhibující T-lymfocyty i jiné buňky imunitního systému [54].

Dalším mechanismem úniku před imunitním systémem je již zmíněný snížený počet HLA molekul I. třídy na svém povrchu. Nedostatečný počet těchto HLA molekul je sice signálem pro NK buňky, aby takto změněné buňky usmrtily, na druhou stranu nemohou prezentovat na svém povrchu nádorové antigeny, aby je mohly rozpoznat T<sub>C</sub>-lymfocyty [6].



Faktory produkované některými nádoru přímo inhibují funkce nebo životnost dendritických buněk, jakožto APC buněk. Patří mezi ně oxid dusnatý, který navozuje apoptózu dendritických buněk, nebo IL-10, který omezuje jejich dozrávání [11].

## **4 IMUNOTERAPEUTICKÉ PŘÍSTUPY A MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ AKTIVITY IMUNITNÍCH BUNĚK**

Zvýšení aktivity imunitních buněk je označováno termínem imunostimulace či imunomodulace. Stimulaci přirozené imunity vyvolávají látky přírodního nebo syntetického původu. Mezi klasické specifické imunostimulační látky se řadí vakcíny a jako nespecifické lze označit bakteriální imunomodulátory (produkty bakterií), interferony nebo růstové faktory [2].

Obecně lze takovou imunizaci rozdělit na pasivní a aktivní. Pasivní imunizace spočívá v podání protilátek, které jsou získány imunizací zvířat nebo izolací krve osob, které prodělaly příslušné onemocnění. Jako aktivní imunizace se označuje vakcinace neboli očkování. Jedná se o použití oslabeného či usmrceného mikroorganismu a následné vyvolání imunitní reakce, které může později chránit tělo před mikroorganismem za účasti paměťových buněk [2].

### **4.1 „Nespecifická“ stimulace imunitních mechanismů**

Obecný mechanismus nespecifické stimulace je založen na podpoře základních funkcí imunitního systému (nezávisle na specifitě nádorového antigenu). Mezi nespecifické imunostimulační postupy, které se v klinické praxi používají již řadu let, patří aplikace cytokinů (IL-2 u hematologických malignit) nebo použití látek, které vyvolávají zánětlivou odpověď, např. BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) vakcíny u karcinomu močového měchýře. BCG je oslabená živá bakterie, která vede k aktivaci několika typů imunocytů, které úspěšně likvidují nádorové buňky [55, 57].

### **4.2 Potlačení makrofágů typu M2**

Úspěšnost terapie nádorových onemocnění by mohla být zvýšena kupříkladu odstraněním makrofágů typu M2 z nádorů a jejich nahrazení typem M1. Možnou cestou je zamezení vstupu monocytů, které se v nádoru přeměňují na M2 makrofágy, pomocí protilátek, které jsou schopny blokovat chemokin. Ten monocyty přitahuje a je vytvářen maligními buňkami [56].

### **4.3 Imunoterapie dendritickými buňkami**

Dendritické buňky se vyznačují schopností velmi dobře předkládat antigen T-lymfocytům. Pokroky v laboratorních metodách umožňují izolovat prekurzory dendritických buněk z periferní krve a indukovat jejich zrání. Podstata metody spočívá v *in*

*in vitro* kultivaci těchto prekurzorů společně s nádorovými antigeny (lyzáty apoptických nádorových buněk). Po pohlcení těchto antigenů jsou dendritické buňky aktivovány, maturovány a poté jako protinádorová vakcína vráceny zpět do oběhu pacienta. Využívá se jejich schopnosti dále aktivovat T-lymfocyty a indukovat jejich diferenciaci v efektorové T-lymfocyty [57].

#### **4.4 Zlepšení antigen-prezentující funkce nádorových buněk**

Nádorové buňky se *in vitro* pozmění tak, aby exprimovaly molekuly např. CD80 nebo CD86 nebo produkovaly cytokiny (IL-2). Tím se z nádorových buněk stanou APC buňky, které se následně ozáří nebo ošetří cytostatiky, aby se nemohly dělit. Takto připravené „nádorové“ buňky se buď vrátí pacientovi nebo se *in vitro* ještě kultivují s T-lymfocyty pacienta, čímž se stimulují nádorově specifické klony, které po vpravení do organismu napadají původní nemodifikované nádorové buňky [11].

#### **4.5 Protilátky proti TSA a TAA**

Pro klinické využití těchto protilátek je nutná jejich maximální humanizace, tzn. změna jejich struktury na co nejvíce podobnou lidským protilátkám čímž se minimalizuje jejich imunogenost. Nejčastěji se používají myši humanizované monoklonální protilátky [49].

Na protilátkové molekuly můžou být kovalentně navázány silné účinné toxiny (imunotoxin) nebo radioizotopy (radioimunotoxiny). Když se protilátka s navázaným toxinem naváže na nádorovou buňku a je endocytována, toxin se z protilátky uvolní a indukuje u nádorové buňky nekrózu. Pokud je protilátka vázána na radioizotop, vazba protilátky na nádorovou buňku dodá dávku záření dostatečnou k jejímu usmrcení [6].

Konkrétně použití monoklonálních protilátek v léčbě MM prochází výrazným rozvojem. Zejména daratumumab (anti-CD38) a elotuzumab (anti-SLAMF7) prokázaly výjimečnou efektivitu a jejich vedlejší účinky byly minimální. Daratumumab je humánní monoklonální protilátka vázající se na antigen CD38 exprimovaný preferenčně na myelomových buňkách. Po navázání protilátky na cílový antigen se aktivuje mechanismus protilátkové cytotoxicity. Další možností jako anti-CD38 protilátky je isatuximab, který také dosahuje velmi slibných výsledků. Elotuzumab má duální roli, a to schopnost vázat se na SLAMF7 (člen 7 rodiny signálních lymfocytárních aktivačních molekul, signaling lymphocytic activation molecules family member 7) na myelomových buňkách (opsonizace), ale také na NK buňkách, kde tato vazba působí jako aktivační signál [58, 59, 60].

## 4.6 Protilátky blokující tlumivé receptory T-lymfocytů

Terčem pozornosti se staly i molekuly, které se objevují na T-lymfocytech po aktivaci a které slouží k regulaci imunitní odpovědi, aby se předešlo autoimunitnímu poškození. Jedná se především o receptory CTLA-4 (cytotoxický T-lymfocytární antigen 4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) a PD-1 (antigen programující buněčnou smrt, programmed cell death 1). T-lymfocyty, které exprimují tyto molekuly, mají reakci na okolní podněty a tím i utlumenou protinádorovou imunitní odpověď. Cílem této imunoterapie je zablokování interakce těchto receptorů a ligandů exprimovaných na nádorových buňkách či nádorových asociovaných buňkách monoklonálními protilátkami, respektive jejich „odblokování“ a zvýšení jejich protinádorové aktivity [61].

Jako příklad těchto protilátek lze uvést přípravek ipilimumab, protilátka proti CTLA-4, která je úspěšně používána v monoterapii nebo v kombinaci s chemoterapií u pacientů s melanomem. Jako protilátkou proti PD-1 je používán především nivolumab, opět u pacientů s melanomem, ale i s karcinomem plic [49].

## 4.7 Bispecifické protilátkové konstrukty

Perspektivní metodu zkoumanou v posledních letech představuje použití uměle konstruovaných bispecifických protilátek. Jedno vazebné místo těchto protilátek reaguje s nádorovým antigenem a druhé vazebné místo rozeznává některé molekuly přímo na povrchu T-lymfocytů nebo NK buněk. Jedná se o struktury často nazývané jako BiTEs (biospecifické T-lymfocytární struktury, bispecific T-cell engagers). Výhodou je jejich schopnost přivést nádorové buňky do přímého kontaktu s T-lymfocyty nebo NK buňkami. Nejdříve se využívalo buď celých monoklonálních protilátek nebo jejich Fab fragmentů (antigen vázající fragmenty, antigen-binding fragments). V současné době se ale jeví jako dostatečně použití pouze fragmentů (variabilní fragmenty, variable fragments) příslušných monoklonálních protilátek [49].

Nejvýznamnější cílovou molekulou u MM je BCMA (antigen zrání B-lymfocytů, B-cell maturation antigen), který bývá u myelomových buněk vysoce a specificky exprimován, nicméně však s progresí onemocnění jeho povrchové zastoupení klesá (hlavně z důvodu odstříhování z povrchu) a proto se hledají alternativní antigeny [62].

## 4.8 Adoptivní T-buněčná terapie

Během této terapie probíhá *ex vivo* expanze nádorově specifických T-lymfocytů, získaných z krve nebo přímo z infiltrátu nádoru, s následnou zpětnou infuzí pacientům. Při

použití krve se jedná o tzv. LAK buňky (lymfokiny aktivovaní zabíječi, lymphokine activated killers), které se získávají stimulací T-lymfocytů a NK buněk *in vitro* cytokiny (především IL-2) nebo anti-CD3 protilátkami. Lymfocyty, které byly izolovány přímo z nádorové tkáně (např. z chirurgicky odstraněného nádoru) se označují jako TIL buňky (nádor infiltrující lymfocyty, tumour infiltrating lymphocytes). Po aktivaci buněk *in vitro* pomocí cytokinů se stimulované buňky vrátí zpět do oběhu pacienta. Adoptivní T-buněčná terapie je účinnější, když je pacient před léčbou imunosuprimován a IL-2 je pak podáván systémově [6, 49].

#### 4.9 Chimérické antigenní receptory

Ačkoliv je součástí imunitního systému velké množství klonů lymfocytů, jen malé procento z nich exprimuje receptory vázající nádorové antigeny. Pomocí moderních metod lze však vybavit velký počet T-lymfocytů specifickými receptory. Genetické struktury kódující tyto receptory jsou vytvořeny z úseků DNA kódujících specifické Fc fragmenty monoklonálních protilátek. Po vnesení umělého genu do T-lymfocytů pacienta (a jejich namnožení *in vitro*) lze získat libovolné množství specifických cytotoxických T-lymfocytů [63].

Tyto T-lymfocyty na svém povrchu exprimují produkty vnesených genů, tzv. chimérické antigenní receptory (CAR, chimeric antigen receptor). CAR receptory fungují v principu stejně jako normální antigenně specifické receptory, avšak mnohem účinněji. Terapie pomocí CAR T-lymfocytů představuje moderní verzi adoptivního buněčného přenosu [6].

CAR T-lymfocytární terapie je schválena (FDA) pro mnohočetný myelom, který relaboval po nebo je refrakterní na alespoň čtyři předchozí léčby. Jedná se o modifikaci T-lymfocytů pacienta tak, aby napadaly MM buňky pomocí cíle zvaného antigen zrání B-lymfocytů (BCMA). BCMA představuje povrchový znak CD138 a je exprimován maligními (i normálními) plazmatickými buňkami. CAR T-lymfocyty cílené na CD138 pomocí anti-CD138 prokázaly významnou antimyelomovou aktivitu v časných klinických studiích a jsou slibnou léčbou pro pacienty s relabovaným/refrakterním MM. MM buňky jsou geneticky a fenotypově velmi heterogenní, takže pro účinnou léčbu MM pomocí CAR T-lymfocytů může být často vyžadováno cílené na více než 1 antigen. Dalšími antigeny, které jsou zkoumány jako CAR cíle, jsou např. CD38 a CD138 [64, 65].

## 4.10 Nádorové vakcíny

Vakcíny proti rakovině jsou založeny na myšlence, že nádory jsou ve své podstatě špatně imunogenní a vakcína by měla působit tak, aby poskytovala imunogenicitu. Mnoho druhů rakoviny je spojeno s virovými infekcemi a vakcíny, které těmto infekcím zabraňují, snižují riziko rakoviny. Velký průlom v protinádorové léčbě byla vakcína proti lidskému papilomaviru jako prevence rakoviny děložního čípku [6, 66].

Po identifikaci peptidů rozeznávaných nádorově specifickými T-lymfocyty určitého pacienta lze pomocí těchto peptidů (přípravených synteticky) *in vitro* nebo *in vivo* stimulovat protinádorové T-lymfocyty [11].

Vakcíny založené na nádorových antigenech jsou v zásadě ideálním přístupem k imunoterapii nádoru zprostředkované T-lymfocyty, ale je obtížné je vyvinout. Krom toho mohou mít nádory rozdílnou antigenní výbavu u různých pacientů. To znamená, že účinná protinádorová vakcína musí obsahovat řadu těchto nádorových antigenů. Taktéž je zřejmé, že by měly být tyto vakcíny používány pouze tehdy, kdy je nádorová zátěž nízká, například po adekvátní operaci nebo chemoterapii [6, 66].

Zdrojem antigenů pro vakcíny proti rakovině jsou nádory jednotlivých pacientů odstraněné při operaci. Vakcíny se připravují buď smícháním ozářených nádorových buněk nebo nádorových extraktů s usmrcenými bakteriemi, které působí jako adjuvans pro zvýšení imunogenicity nádorových antigenů [6, 66].

## 4.11 Kombinovaná imunoterapie

Imunoterapie s sebou přináší perspektivu dlouhodobé, možná i trvalé odpovědi. Na rozdíl od jiných typů cílené léčby je imunoterapie účinná širokým spektrem nádorových onemocnění. Kombinované režimy zvyšující účinnost léčby přinášejí zatím velmi nadějně výsledky [67].

Při léčbě nádorových onemocnění se zpravidla nespolehá pouze na jedinou metodu a většinou bývá kombinována chirurgická léčba s radioterapií a systémovou léčbou. V případě chemoterapie se volí prakticky vždy kombinovaná léčba. Kombinovaná léčba může znamenat podání více léků současně, nebo po sobě [67].

### 4.11.1 Kombinace monoklonálních protilátek ovlivňující kontrolní body imunitní odpovědi

Hlavní roli v kombinované imunoterapii jako takové hrají monoklonální protilátky ovlivňující kontrolní body imunitní odpovědi. Nadějná se jeví například kombinace

ipilimumabu (protilátka proti CTLA-4) a nivolumabu (protilátka proti PD-1) u metastatického maligního melanomu, metastatického karcinomu ledviny nebo plic. Pozorovaného zvýšeného procenta odpovídajících na léčbu a prodloužení celkového přežití je ovšem dosaženo za cenu vyššího výskytu závažnější toxicity. Toxické projevy jsou nyní však předvídatelné a zvládnutelné podpůrnou léčbou. V randomizované studii byla prokázána vyšší účinnost pembrolizumabu ve srovnání s ipilimumabem [68, 69].

#### **4.11.2 Kombinace monoklonálních protilátek ovlivňujících kontrolní body**

##### **imunitní odpovědi s dalšími imunomodulačními léky**

Kombinovaná imunoterapie se neomezuje jen na podání různých monoklonálních protilátek. V současné době jsou intenzivně studovány možnosti kombinace těchto protilátek s jinými léčivy [67].

Nabízí se zejména kombinace s bevacizumabem. Bevacizumab je sice primárně lékem zaměřeným na cévní zásobení nádoru, ale cílová molekula této protilátka, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, vascular endothelial growth factor), má řadu dalších účinků, které mohou být z pohledu imunoterapie významné. Jedná se například o účinek nádorové hypertenze, která brání průniku léčiva do nádoru. Proto je bevacizumab podáván výhradně v kombinacích, aby umožnil vstup druhého léčiva do nádoru [67].

Bevacizumab je v současnosti v kombinaci například s atezolizumabem (protilátka proti PD-1) používán při léčbě hepatocelulárního karcinomu (HCC, hepatocellular carcinoma), rakoviny děložního čípku nebo žaludku. Tato kombinace přinesla významnou klinickou účinnost a stala se mezníkem v terapii HCC [70].

#### **4.11.3 Kombinace imunoterapie s chemoterapií (chemoimunoterapie)**

Jako velmi nadějná je kombinace léků k usmrcení nebo zpomalení růstu rakovinných buněk (chemoterapie) a léků ke stimulaci nebo obnovení schopnosti imunitního systému bojovat proti rakovině (imunoterapie) [67].

I když byla cytotoxická chemoterapie po dlouhá desetiletí vnímána jako imunosupresivní, mohou některé cytotoxické léky imunitní odpověď zesilovat. V rámci chemoimunoterapie se může tedy jednat o kombinaci dvou léků nebo o jeden lék s duálním účinkem [67].

Velmi účinným a v České republice registrovaným lékem je rituximab (obchodní název např. MabThera, Rixathon a další), který se používá jednak samotný a jednak čím dál častěji v kombinaci s chemoterapií. Rituximab je protilátka proti molekule CD20, která se

nachází na povrchu lymfomů. Po vazbě rituximabu na povrch buňky se buňka stává cílem imunitních mechanismů. Bylo prokázáno, že u pacientů s agresivním lymfomem je tato kombinace účinnější než samotná chemoterapie. Kromě lymfomů se rituximab využívá při léčbě ALL a CLL [41].

Jako další lze uvést lék alemtuzumab (obchodní název Mabcampath). Je to protilátka proti molekule CD52 nacházející se na povrchu lymfocytů a dalších krevních buněk, kterou je možné použít při léčbě CLL [41].

Kombinace chemoterapie a imunoterapie jsou studovány především u nádorů citlivých na chemoterapii. Průkazné výsledky se objevují hlavně u karcinomu plic [67].

Jak již bylo zmíněno, některá chemoterapeutika kromě cytotoxických vlastností mají i vlastnosti imunomodulační. Znamená to, že jejich terapeutická účinnost částečně závisí na schopnosti těchto chemoterapeutických látek interagovat s imunitním systémem. Předpokládá se, že chemoterapie indukuje různé způsoby smrti nádorových buněk, které mohou vést k uvolnění antigenů odvozených z nádoru, které mohou být pohlceny a zpracovány imunitními buňkami, což vede k jejich aktivaci a indukci protinádorové imunity [71].

**Bortezomib** je typickým příkladem pro tyto duální vlastnosti. Bortezomib je v první řadě inhibitor ubiquitin-proteazomové dráhy odpovědné za intracelulární přeměnu proteinů. Blokáce této schopnosti buněk je zakončena jejich apoptózou. Nádorové buňky jsou k tomuto účinku citlivější než buňky zdravé, to znamená, že nádorové buňky umírají, zatímco ty zdravé se mohou dále obnovovat. Spolu s inhibicí proteazomu a tedy senzibilizací nádorových buněk k apoptóze má bortezomib také četné účinky na imunitní systém [72].

Bortezomib má větší či menší vliv na T- a B-lymfocyty, dendritické buňky a NK buňky. V případě některých druhů T-lymfocytů mohou být tyto účinky i negativní. NK buňky hrají klíčovou roli v protinádorové imunitě, a to i při léčbě bortezomibem. Bylo prokázáno, že bortezomib snižuje expresi molekul HLA I. třídy na MM buňkách. Tento účinek je závislý na čase a dávce a senzibilizuje MM buňky k lýze zprostředkované NK buňkami [72, 73].

Mimo jiné léčba bortezomibem zvyšuje hladiny ligandů receptorů aktivujících NK buňky. Jedná se o molekuly MICA a MICB, které se objevují na povrchu nádorových buněk. Zvýšená exprese těchto molekul indukuje zvýšenou tvorbu příslušných NKG2D ligandů na povrchu NK buněk. Díky MICA a MICB receptorům jsou NK buňky schopné zamířit své cytotoxické mechanismy rychleji a přesněji [74]. Podobný účinek vykazují i další chemoterapeutika, jako ixazomib a carfilzomib.

V případě chemoterapie je novým příslibem její kombinace imunogenních vlastností chemoterapeutik a *ex vivo* připravených buněk. Například právě použití bortezomibu a NK



buněk se jeví jako slibná strategie pro mnohočetný myelom, kdy bortezomib nejen zvyšuje aktivační signál pro NK buňky indukcí exprese ligandů pro hlavní aktivační receptor NKG2D (MICA, MICB), ale také snížením exprese HLA, které vysílají NK buňkám aktivační signál. Právě kombinace běžné používané chemoterapie a buněčné imunoterapie je novým příslibem pro pacienty s mnohočetným myelomem [73].

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 5 CÍLE PRÁCE

1. Testování vybrané chemoterapie na myelomové líníe – sledování proliferace a viability buněk.
2. Sledování zvýšení exprese genů asociovaných s imunitní odpovědí pomocí qPCR.
3. Ověření výsledků na proteinové úrovni.

## 6 METODIKA PRÁCE

### 6.1 Rozmražení buněčných linií

#### Materiál

- myelomová linie RPMI-8226 a H929 (Sigma Aldrich, Německo)

#### Pomůcky

- 15ml a 50ml zkumavky Corning Centristar™ (Corning Incorporated/Corning, USA)
- 25cm<sup>2</sup> kultivační láhve (TPP, Švýcarsko)
- sérologické jednorázové sterilní pipety (P-LAB, Česká republika)
- automatické pipety + špičky (Eppendorf, Německo)

#### Reagencie

- L-glutamin (Gibco, Velká Británie)
- Antibiotikum-Antimykotikum 100X (Gibco, Velká Británie)
- HEPES pufr 1 M (Lonza, USA)
- FBS (Gibco, Velká Británie)
- 2-Mercaptoethanol 50 mM (Gibco, Velká Británie)
- RPMI 1640 médium (bez L-glutaminu) (SERANA, Německo)

#### Přístroje

- biohazard box Safemate 1.2 (BioAir, Itálie)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (ESCO, Singapur)
- termolázeň (Lab Companion, USA)
- centrifuga Hermle Z 326 (Labortechnik GmbH, Německo)

#### Postup

Obě linie byly kultivovány ve stejném kompletním médiu složeném z následujících reaglií: RPMI 1640 médium, 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES pufr (kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová), 10% FBS (fetální hovězí sérum, fetal bovine serum), 50 μM 2-Mercaptoethanol, antibiotika (100 jednotek penicilinu, 100 μg streptomycinu, 0,25 μg Amfotericinu B). V následujícím textu je kompletní médium označováno jako RPMI médium. Takto připravené RPMI médium bylo vloženo do termolázně na 37 °C. Později byly do termolázně přidány zamražené buněčné linie, a to přibližně na 5 minut. Další postup bude popisován jako práce s jednou buněčnou linií, nicméně rozmrazování druhé buněčné linie probíhalo stejným způsobem. Do 15ml zkumavky bylo napipetováno 5 ml RPMI média. Dále byl přidán po malých kapičkách 1 ml RPMI média

přímo do kryozkumavky k 1 ml buněčné linii. Celé 2 ml byly posléze přeneseny do stejné 15ml zkumavky. Celkem tedy bylo v 15ml zkumavce 6 ml. Takto připravené buňky byly centrifugovány po dobu 7 minut při 350 g a hodnota „rozjezd – brzda“ byla nastavena na maximum (9–9). Po centrifugaci vznikla ve zkumavce viditelná peleta. Supernatant byl odstraněn a peleta rozvolněna v 1 ml RPMI média. Rozvolněné buňky byly přeneseny do kultivační láhve, do které byly následně napipetovány další 4 ml RPMI média. Takto rozmražená buněčná linie byla vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C a připravena ke svému růstu. Pro zamezení kontaminace vzorků byla veškerá manipulace s nimi prováděna v laminárním boxu.

## **6.2 Aplikace chemoterapie na buněčné linie**

### **Materiál**

- rozrostlé buněčné linie RPMI-8226 a H929 mnohočetného myelomu

### **Pomůcky**

- 96-jamková a 48-jamková kultivační destička (TPP, Švýcarsko)
- 15ml a 50ml zkumavky Corning Centristar™ (Corning Incorporated/Corning, USA)
- sérologické jednorázové sterilní pipety (P-LAB, Česká republika)
- automatické pipety + špičky (Eppendorf, Německo)

### **Reagencie**

- kompletní RPMI médium (viz kapitola 6.1)
- chemoterapeutika: bortezomib, ixazomib, carfilzomib (MedChemExpress, USA)
- Poly-L-lysin roztok 0,01 % (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS pH 7,4 (1X) (Gibco, Velká Británie)

### **Přístroje**

- biohazard box Safemate 1.2 (BioAir, Itálie)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (ESCO, Singapur)
- termolázeň (Lab Companion, USA)
- centrifuga Hermle Z 326 (Labortechnik GmbH, Německo)
- IncuCyte® Cell Culture CO<sub>2</sub> Incubator (ESCO, Singapur)

### **Postup**

K experimentu byly použity 2 zmíněné buněčné linie a pracovalo se s nimi při koncentraci 300 000 buněk/ml. Na každou buněčnou linii bylo aplikováno 6 různých koncentrací chemoterapeutika a k dispozici pro tento experiment byly 3 druhy chemoterapií. Každý experiment pro RPMI-8226 se opakoval 3×. Vznikly tedy tři replikáty (R1, R2, R3)

pro každou koncentraci. Pro myelomovou linii H929, která byla použita jako validační linie, byly experimenty prováděny jen jednou, tzn. že od každé chemoterapie vznikl jen jeden replikát.

**Koncentrace aplikované na buněčné linie:**

- 0 nM (kontrolní vzorek)
- 1 nM
- 2,5 nM
- 5 nM
- 10 nM
- 20 nM

**Použitá chemoterapeutika:**

- bortezomib
- ixazomib
- carfilzomib

Následující postup bude popsán pro jeden experiment – např. pro buněčnou linii RPMI-8226, pro chemoterapeutikum bortezomib a replikát R1. Pro ostatní replikáty, chemoterapeutika a druhou buněčnou linii byl postup stejný.

Z kultivační lahvičky byly odebrány 3 mil. buněk do 50ml zkumavky. Buňky byly centrifugovány 8 min při 350 g. Supernatant byl slit do odpadu. Peleta byla rozvolněna v 1 ml zahřátého RPMI média na 37 °C a doplněna o dalších 9 ml RPMI média. 3 mil. buněk byly tedy rozvolněny v 10 ml RPMI média, což odpovídá požadované koncentraci 300 000 buněk/ml.

Chemoterapeutikum muselo být nejdříve naředěno na požadovanou koncentraci 1  $\mu$ M v RPMI médiu, protože původní koncentrace, ve které bylo dodáno (5 mM), je pro buňky příliš vysoká. Do nové popsané 15ml zkumavky bylo tedy napipetováno 4 999  $\mu$ l RPMI média a byl přidán 1  $\mu$ l chemoterapeutika. Finální aplikování chemoterapie na buňky zahrnovalo napipetování buněčné suspenze a chemoterapeutika dle níže uvedené tabulky (Tabulka 2). Pro zamezení kontaminace vzorků byla veškerá manipulace s nimi prováděna v laminárním boxu.

*Tabulka 2: Aplikace chemoterapie na MM buňky (bortezomib R1)*

<b>Koncentrace (nM)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>Buněčná suspenze</b>	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
<b>Bortezomib</b>	x	1,5 $\mu$ l	3,75 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l	15 $\mu$ l	30 $\mu$ l

### 6.2.1 Příprava destičky pro IncuCyte®

Do 96-jamkové destičky bylo napipetováno 50 µl Poly-L-lysin, avšak pouze do jamek, do kterých byly později přidány buňky. Destička byla na 1 hod uložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Během této doby se Poly-L-lysin „uchytil“ na dno jamek. Následně bylo celých 50 µl roztoku z každé jamky odsáto do odpadu a destička byla ponechána další 1 hod v laminárním boxu pro vyschnutí zbytku roztoku.

Po vyschnutí už bylo možné napipetovat od každého vzorku 3 × 100 µl buněčné suspenze s aplikovanou chemoterapií do jamek dle následující tabulky (Tabulka 3), která představuje mapu obsazených pozic 96-jamkové destičky. Po napipetování vzorků byl do okolních jamek přidán po 100 µl roztok PBS (fosfátový pufr, phosphate-buffered saline) s antibiotiky (roztok je znázorňován symbolem „⊖“), aby bylo zamezeno zaprvé kontaminaci vzorků a zadruhé jejich vysychání během analýzy v IncuCyte®. Roztok byl připraven do 50ml zkumavky smícháním 0,5 ml antibiotik a 45,5 ml PBS.

Tabulka 3: Mapa obsazených pozic 96-jamkové destičky pro IncuCyte® analýzu

	1	2	3	4	5
A	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
B	⊖	0 nM	2,5 nM	10 nM	⊖
C	⊖	0 nM	2,5 nM	10 nM	⊖
D	⊖	0 nM	2,5 nM	10 nM	⊖
E	⊖	1 nM	5 nM	20 nM	⊖
F	⊖	1 nM	5 nM	20 nM	⊖
G	⊖	1 nM	5 nM	20 nM	⊖
H	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖

Takto připravená destička byla vložena do IncuCyte®. Bylo nastaveno snímání zelené fluorescence v intervalu 6 hod po dobu 48 hod.

### 6.2.2 Příprava destiček pro průtokovou cytometrii a testy molekulární genetiky

Do 48-jamkové destičky bylo napipetováno po 0,5 ml vzorků buněčné suspenze s aplikovanou chemoterapií a do okolních jamek PBS s antibiotikem. Tabulka 4 znázorňuje mapu 48-jamkové destičky. Vzorky byly pipetovány pro 24hod a 48hod inkubaci. Takto připravená destička byla vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Stejný postup práce byl zvolen také pro validaci výsledků qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce, quantitative polymerase chain reaction) na proteinové úrovni (tj. flowcytometricky).

Tabulka 4: Mapa obsazených pozic 48-jamkové destičky se vzorky pro qPCR a flowcytometrickou analýzu (řada B = 24hod inkubace, řada D = 48hod inkubace)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
B	⊖	0 nM	1 nM	2,5 nM	5 nM	10 nM	20 nM	⊖
C	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
D	⊖	0 nM	1 nM	2,5 nM	5 nM	10 nM	20 nM	⊖
E	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖

### 6.3 Měření viability buněk na průtokovém cytometru

#### Materiál

- inkubované vzorky (v 48-jamkové destičce)

#### Pomůcky

- cytometrické zkumavky (Corning Incorporated/Falcon, USA)
- automatické pipety + špičky (Eppendorf, Německo)

#### Reagencie

- 7-AAD roztok pro barvení životaschopných buněk (EXBIO Praha, Česká Republika)
- PBS pH 7,4 (1X) (Gibco, Velká Británie)
- Anti-MICA/MICB Alexa Fluor® 647 (EXBIO Praha, Česká Republika)

#### Přístroje

- biohazard box Safemate 1.2 (BioAir, Itálie)
- centrifuga Hermle Z 326 (Labortechnik GmbH, Německo)
- průtokový cytometr BD FACSAria™ Fusion (BD Biosciences, USA)

#### Postup

48-jamková destička byla vyndána z CO<sub>2</sub> inkubátoru. Vzorky určené k 24hod či 48hod inkubaci byly v jamce promíchány a bylo z nich přeneseno 100 µl suspenze do popsaných cytometrických zkumavek. Destička byla vrácena zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru. K buněčné suspenzi v cytometrických zkumavkách bylo přidáno 5 µl roztoku 7-AAD (7-aminoactinomycin D) a zkumavky byly vloženy na 15 min do tmy. Ve validačním experimentu byla k suspenzi také přidána protilátka detekující MICA/B (5 µl). Dále proběhl „oplach“ a k buňkám byly přidány 2 ml PBS. Vzorky byly centrifugovány při tíhovém zrychlení 350 g po dobu 8 min. Supernatant byl slit do opadu a peleta rozvolněna ve finálních 300 µl PBS. Takto připravené vzorky byly vkládány do průtokového cytometru. Po změření byly prováděny analýzy v softwaru FlowJo. Expres MICA/B byla stanovena jako medián intenzity fluorescence.

## 6.4 Zamražení buněčné suspenze v lyzačním roztoku

### Materiál

- inkubované vzorky (v 48-jamkové destičce)

### Pomůcky

- 1,5ml zkumavky (Eppendorf, Německo)
- automatická pipeta + špičky (Eppendorf, Německo)

### Reagencie

- PBS pH 7,4 (1X) (Gibco, Velká Británie)
- RLT pufr s přidaným  $\beta$ -merkaptethanolem (QIAGEN GmbH, Německo)

### Přístroje

- biohazard box Safemate 1.2 (BioAir, Itálie)
- centrifuga BOECO M-24A (Boeco, Německo)
- vortex ZX3 (VELP Scientifica, Itálie)
- laboratorní mrazák ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Panasonic, Japonsko)

### Postup

48-jamková destička byla vyndána z  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Vzorky určené k 24hod či 48hod inkubaci byly v jamce promíchány a bylo z nich přeneseno 400  $\mu\text{l}$  suspenze do 1,5ml zkumavek. Tento úkon byl pro zamezení kontaminace vzorků proveden v laminárním boxu, další kroky se uskutečnily mimo tento box.

Buněčná suspenze v 1,5ml zkumavkách byla centrifugována po dobu 5 min při 350 g. Supernatant byl odpipetován a k peletě byl přidán 1 ml PBS. Opět proběhla centrifugace při stejných podmínkách. Veškerý supernatant byl odstraněn. K peletě bylo napipetováno 350  $\mu\text{l}$  RLT pufru (RNA lyzační pufr) s přidaným  $\beta$ -merkaptethanolem a ihned byl tento mix zamíchán na vortexu a zamražen v mrazáku při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 6.5 Izolace RNA

### Materiál

- zamražená buněčná suspenze v RLT pufru

### Kit

- RNeasy® Mini Kit (QIAGEN GmbH, Německo)

### Pomůcky

- 1,5ml zkumavky (Eppendorf, Německo)
- automatické pipety + špičky (Eppendorf, Německo)



### **Reagencie** (nejsou součástí kitu)

- ethanol absolutní p.a. (PENTA s.r.o., Česká republika)

### **Přístroje**

- biohazard box SafeFAST Classic S/D (třída II) (Schoeller Instruments, s.r.o., Česká Republika)
- centrifuga BOECO M-24A (Boeco, Německo)
- laboratorní mrazák (−80 °C) (Panasonic, Japonsko)

### **Postup**

Lyzované buňky byly vyjmuty z mrazáku (−80 °C) a rozmrazeny (na ledu). Do rozmrazené pelety byl přidán jeden objem 70% ethanolu, tzn. k cca 350 µl bylo napipetováno 350 µl ethanolu. Mix byl řádně promíchán pipetováním a ihned přenesen na centrifugační kolonky. Následovala centrifugace po dobu 15 s při  $\geq 8\ 000$  g. Centrifugací se potřebná RNA zachytila na kolonce a zbytkový RLT pufr protekl do sběrné zkumavky. Průtok ze sběrných zkumavek byl slit do odpadu. Na kolonku bylo napipetováno 700 µl RW1 pufru (promývací roztok pro RNA, RNA wash buffer) a následně byly zkumavky vloženy do centrifugy na 15 s při 8 000 g. Průtok byl slit do odpadu. Do centrifugační kolonky bylo přidáno 500 µl RPE pufru (promývací roztok pro RNA s přidáním ethanolu, RNA wash buffer with ethanol). Proběhla 15s centrifugace při 8 000 g. Přidání 500 µl RPE pufru se znovu opakovalo a zkumavky byly centrifugovány 2 min při 8 000 g. Centrifugační kolonky byly umístěny do nové suché 2ml sběrné zkumavky a vše bylo znovu vloženo do centrifugy, tentokrát na 1 min při plné rychlosti. Tím byla odstraněna veškerá nepotřebná kapalina z centrifugačních kolonek a na koloně zůstala pouze potřebná RNA. Na závěr procesu byly kolonky přemístěny do finálních značených 1,5ml zkumavek. Přímo na kolonku bylo napipetováno 30 µl RNase-free vody. Molekuly této vody na sebe navázaly samotnou RNA z kolonky a centrifugací (1 min při 8 000 g) celých 30 µl včetně molekul RNA proteklo do finálních zkumavek. Izolovaná RNA byla vložena do mrazáku (−80 °C).

## **6.6 Syntéza cDNA**

### **Materiál**

- zamražená izolovaná RNA

### **Kit**

- FIREScript® RT cDNA synthesis MIX with Oligo (dT) and Random primers (Solis Biodyne, Estonsko)

- složení: FIREScript® Reverse Transcriptase, RT reaction buffer with DTT, dNTPs, Oligo (dT) primer and Random primers

### Pomůcky

- 0,2ml zkumavky (Eppendorf, Německo)
- automatické pipety + špičky (Eppendorf, Německo)

### Přístroje

- biohazard box Safemate 1.5 (BioAir, Itálie)
- vortex ZX3 (VELP Scientifica, Itálie)
- T100 Thermal Cycler (BioRad, USA)
- mrazák (-20 °C)

### Postup

K syntéze cDNA (komplementární deoxyribonukleová kyselina, complementary deoxyribonucleic acid) byla potřeba izolovaná RNA a reagentie z kitu, které byly opět před použitím rozmrazeny. V 0,2ml zkumavkách byly následně smíchány reagentie podle níže uvedené tabulky (Tabulka 5), která se nachází v návodu pro tento kit.

*Tabulka 5: Mix pro reverzní transkripci*

Reagentie	Objem
Templát RNA	0,1 ng – 5 µg
10x RT Reaction Premix with Oligo (dT) and Random primers	2 µl
FIREScript Enzyme Mix	1,5 µl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	do 20 µl
<b>Celkem</b>	<b>20 µl</b>

RNA templátu v tomto experimentu bylo do mixu napipetováno 5 µl. Výsledný připravený mix byl promíchán na vortexu a vložen do termocycleru při požadovaných podmínkách dle tabulky v návodu (Tabulka 6).

*Tabulka 6: Teplotní program pro reverzní transkripci*

Krok	Teplota	Čas
Napojení primeru	25 °C	5–10 min
Reverzní transkripce	37–60 °C	15–30 min
Inaktivace enzymu	85 °C	5 min

Na základě předchozích zkušeností byl první krok nastaven na 10 min a reverzní transkripce na 30 min při 42 °C. Po doběhnutí celého programu byly vzorky uloženy do mrazáku nastaveného na -20 °C.

## 6.7 Testování primerů pomocí real-time PCR (qPCR)

### Materiál

- zamražené vzorky cDNA

### Pomůcky

- automatická pipeta + špičky (Eppendorf, Německo)
- FrameStar 96-jamková destička (BioRad, USA)

### Reagencie

- použité primery pro cílové geny (Generi Biotech, Česká republika):
  - MICA forward: CTTGGCCATGAACGTCAGG
  - MICA reverse: CCTCTGAGGCCTCGCTGCG
  - MICB forward: ACCTTGGCTATGAACGTCACA
  - MICB reverse: CCCTCTGAGACCTCGCTGCA
- použité primery pro referenční geny (Generi Biotech, Česká republika):
  - 18S forward: TGCATGGCCGTTCTTAGTTG
  - 18S reverse: AGTTAGCATGCCAGAGTCTCGTT
  - B2M forward: CTATCCAGCGTACTCCAAAG
  - B2M reverse: GAAAGACCAGTCCTTGCTGA
- Hypure H2O
- EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis Biodyne, Estonsko)
  - složení: HOT FIREPol® DNA polymerase, 5x EvaGreen® qPCR buffer with 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, EvaGreen® dye (interkalační barvivo), Internal reference ROX
- Yeast tRNA (10 mg/ml) (ThermoFisher Scientific Inc., USA)

### Přístroje

- vortex ZX3 (VELP Scientifica, Itálie)
- centrifuga U-320 R (Boeco, Německo)
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA)

### Postup

Ze všeho nejdříve musely být naředěny primery. Primery byly po přijetí rozpuštěny v dedikovaném objemu vody (dle výrobce), aby byla jejich koncentrace 100 nM. Byly použity primery pro geny MICA a MICB a jako primery pro referenční geny byly použity 18S (rRNA gen; ribozomální RNA gen) a B2M (β-2-mikroglobulin, komponenta HLA

molekul I. třídy). Každý primer (forward, F i reverse, R) byl naředěn zvlášť a ve zbytku experimentu byl používán jen tento alikvot, nikoli originál.

Pro ulehčení pipetování 96-jamkové destičky byly vytvořeny 4 zásobní mixy pro každý primer a mix pro každý vzorek zředěné cDNA. Tabulka 7 zobrazuje návod k přípravě těchto zásobních mixů.

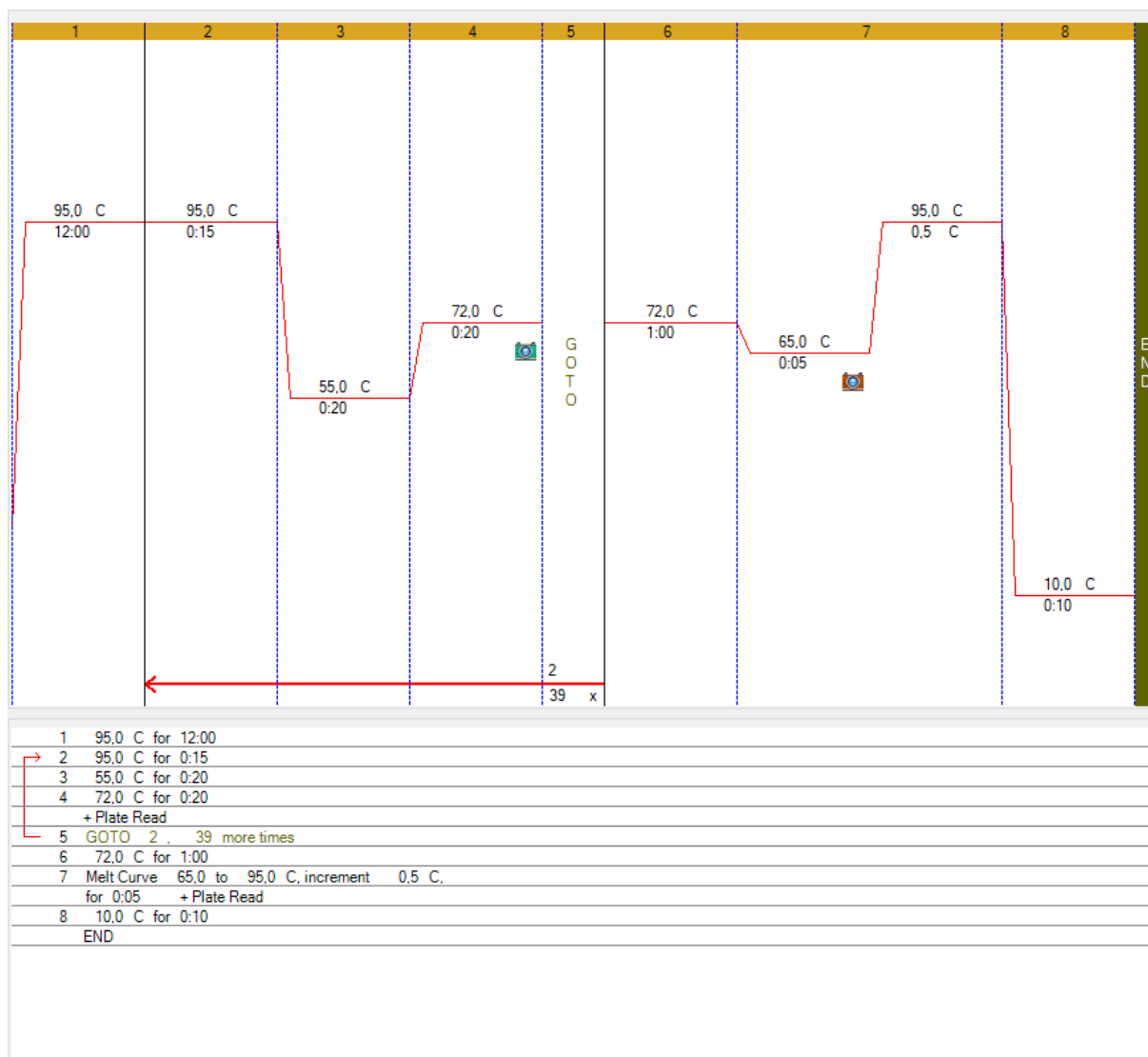
*Tabulka 7: Příprava zásobních mixů pro 96-jamkovou qPCR destičku*

Reagencie	Objem	Objem pipetovaný na jamku destičky
H <sub>2</sub> O	90 µl	5,25 µl
Master Mix	56 µl	
Primer F	3,5 µl	
Primer R	3,5 µl	
tRNA	35 µl	4,75 µl
cDNA	5 µl	

Yeast tRNA (transferová ribonukleová kyselina, transfer ribonucleic acid) je kvasinková tRNA, která se používá k ředění cDNA. V konečné koncentraci 10–20 µg/ml je tRNA účinným termostabilním činidlem, které zajišťuje spolehlivější PCR reakci, především u malého množství vstupního materiálu.

Pipetování na destičku bylo provedeno dle schématu v předem připraveném protokolu. Každá jamka byla pipetována v doubletu. Celé schéma destičky je zobrazeno v příloze A. Po napipetování veškerého potřebného materiálu byla destička zamíchána na vortexu a centrifugována po dobu 1 min.

Použité nastavení teplotního programu pro real-time PCR, je uvedeno na následujícím obrázku (Obrázek 6).



Obrázek 6: Nastavení teplotního programu qPCR

Teplotní program je rozdělen do 8 hlavních kroků. Kroky 2–5 jsou 40× opakovány. Následuje analýza křivky tání (65–95 °C).

## 6.8 Hodnocení qPCR

Výsledkem analýzy qPCR byly hodnoty  $C_t$  (cyklus prahové hodnoty, cycle of threshold).  $C_t$  hodnota reflektuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. Tato fluorescence je zachycena detektorem. Číslo tohoto cyklu je zaznamenáno a dále využíváno právě jako hodnota  $C_t$ . Je také důležité zmínit, že čím je  $C_t$  nižší, tím více bylo do reakce dodáno templátové DNA, a naopak. Hodnoty  $C_t$  se jednoduše rovnají počtu qPCR cyklů, které jsou potřeba k tomu, aby se začal ve vzorku exprimovat testovaný gen a došlo k navýšení fluorescence nad prahovou hodnotu.

Při kvantifikaci je také nutné vyhodnotit kromě samotných testovaných genů i geny referenční (vnitřní kontrola). Vnitřní kontrola určuje, do jaké míry bylo u testovaných vzorků (genů) použito srovnatelné množství vstupního materiálu (templátové DNA). Jako vnitřní kontrola jsou vyhodnocovány geny, jejichž transkripce či počet jejich kopií v testované DNA by měl být stejný u všech testovaných vzorků. Nejčastěji se jako referenční neboli „housekeeping“ geny používají geny pro ribosomální proteiny, nebo geny aktinu a tubulinu.

Jako referenční geny byly použity 2 geny (18S a B2M), přičemž po prvotní analýze bylo dále pracováno pouze s genem pro 18S rRNA, jež byl vyhodnocen jako účinnější pro tento experiment.

Kromě  $C_t$  byly v menší míře hodnoceny i teploty tání. Jejich hodnoty byly použity jako kontrola kvality výsledků  $C_t$  a vždy vyhovovaly kritériím.

Ke zpracování hodnot  $C_t$  byla použita „Delta-delta  $C_t$  metoda“, známá také jako „ $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoda“, znázorněná v následujících rovnicích:

$$\Delta C_t(\text{chemoterapie}) = C_t(\text{cílový gen}) - C_t(\text{referenční gen}) \quad (1)$$

$$\Delta C_t(\text{kontrolní vzorek}) = C_t(\text{cílový gen}) - C_t(\text{referenční gen}) \quad (2)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{chemoterapie}) - \Delta C_t(\text{kontrolní vzorek}) \quad (3)$$

Následuje výpočet relativního násobku genové exprese vzorků:

$$\text{relativní násobek genové exprese} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (4)$$

Tato  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  hodnota byla dále zpracována do grafů a porovnávána napříč jednotlivými vzorky. V grafech uvedených v kapitole s výsledky je porovnáván relativní násobek genové exprese ve vzorku s aplikovanou chemoterapií po dobu 24 hod a 48 hod.

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Viabilita buněk

Proporce mrtvých buněk jsou stanoveny jako procento pozitivních 7-AAD. Tedy čím vyšší hodnota byla naměřena, tím vyšší byla úmrtnost buněk při jednotlivých koncentracích.

#### 7.1.1 Myelomová RPMI-8226 linie

Při hodnocení výsledků pro viabilitu myelomové linie RPMI-8226 z průtokového cytometru bylo pracováno pouze s mediány ze všech tří experimentů. Následně byl od každého mediánu příslušné koncentrace odečten medián hodnoty pro kontrolní vzorek, tedy koncentraci 0 nM. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce níže.

Tabulka 8: Úmrtnost buněk myelomové linie RPMI-8226 (%)

	Koncentrace (nM)	Bortezomib		Ixazomib		Carfilzomib	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
RPMI-8226 Úmrtnost (%)	1	0,50	2,10	0,80	1,90	1,20	-0,10
	2,5	2,30	0,70	1,30	1,90	0,20	0,50
	5	-2,70	1,20	1,70	2,20	3,20	3,00
	10	5,50	11,80	1,30	1,40	17,30	17,70
	20	25,40	46,10	0,50	6,20	29,10	21,80

V koncentracích 0–10 nM nebyla pozorována velká úmrtnost buněk. Buňky inkubované s ixazomibem nevykazovaly významnou změnu viability buněk ani při nejvyšší koncentraci (20 nM). Nejnižší viabilita buněk byla pozorována při nejvyšších koncentracích chemoterapie. Viabilitu buněk taktéž snižuje doba inkubace s chemoterapeutikem.

#### 7.1.2 Myelomová H929 linie

Myelomová linie H929, jakožto validační linie, byla zpracována pouze v jednom replikátu. Stejně jako u předchozí linie byla hodnota kontrolního vzorku odečtena od vzorků s jednotlivými koncentracemi. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 9: Úmrtnost buněk myelomové linie H929 (%)

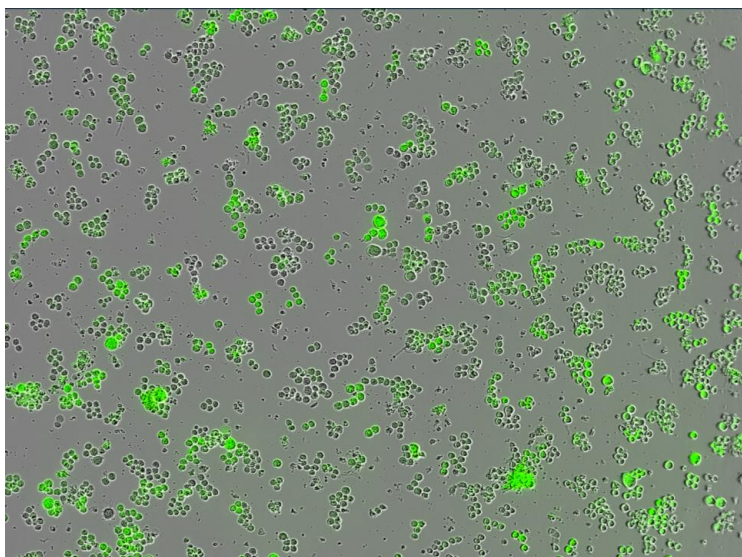
	Koncentrace (nM)	Bortezomib		Ixazomib		Carfilzomib	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
H929 Úmrtnost (%)	1	-0,10	-0,60	2,10	1,10	3,90	8,50
	2,5	4,20	26,80	1,80	2,80	33,60	58,20
	5	36,20	60,80	0,20	3,60	44,80	67,60
	10	43,30	62,60	3,40	7,50	55,10	69,60
	20	50,20	64,60	42,50	78,18	58,00	70,30

Buňky myelomové linie H929 vykazovaly významný pokles viability již při nízkých koncentracích. Výjimku tvořil opět ixazomib, u kterého bylo snížení viability buněk pozorováno až u nejvyšších koncentrací. Celkově nejvíce mrtvých buněk bylo zjištěno v nejvyšších koncentracích po 48 hod inkubace.

## 7.2 Vizualizace proliferace buněk na přístroji IncuCyte®

Přístroj IncuCyte® umožňuje vizualizaci buněk v reálném čase. Přístroj snímá plochu kultivačních nádob v předem nastavených podmínkách a časech. Snímání bylo nastaveno na každých 6 hod po dobu 2 dnů.

Analýza proběhla pouze u buněčné linie RPMI-8226, která byla geneticky upravena tak, aby produkovala zelený fluorescenční protein (GFP, green fluorescent protein), díky němuž buňky fluoreskují a jsou na snímcích dobře viditelné, viz Obrázek 7.



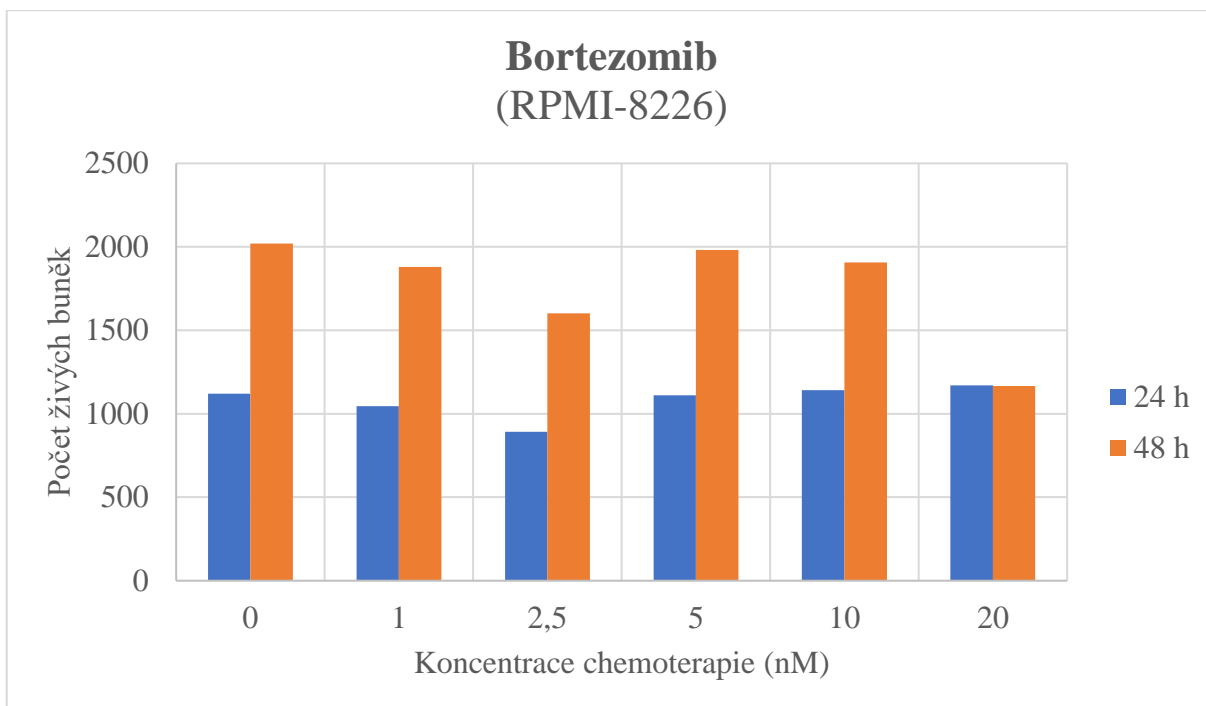
Obrázek 7: Ukázka snímku z přístroje IncuCyte®

Obrázek znázorňuje jeden snímek z použitého softwaru IncuCyte®. Zelené objekty jsou živé buňky produkující GFP.

V rámci analýzy pomocí integrovaného software byly počítány zelené objekty na snímek. Následující dva grafy (Obrázek 8 a Obrázek 9) vykazují po 24 hod podobné počty buněk (modrá barva).

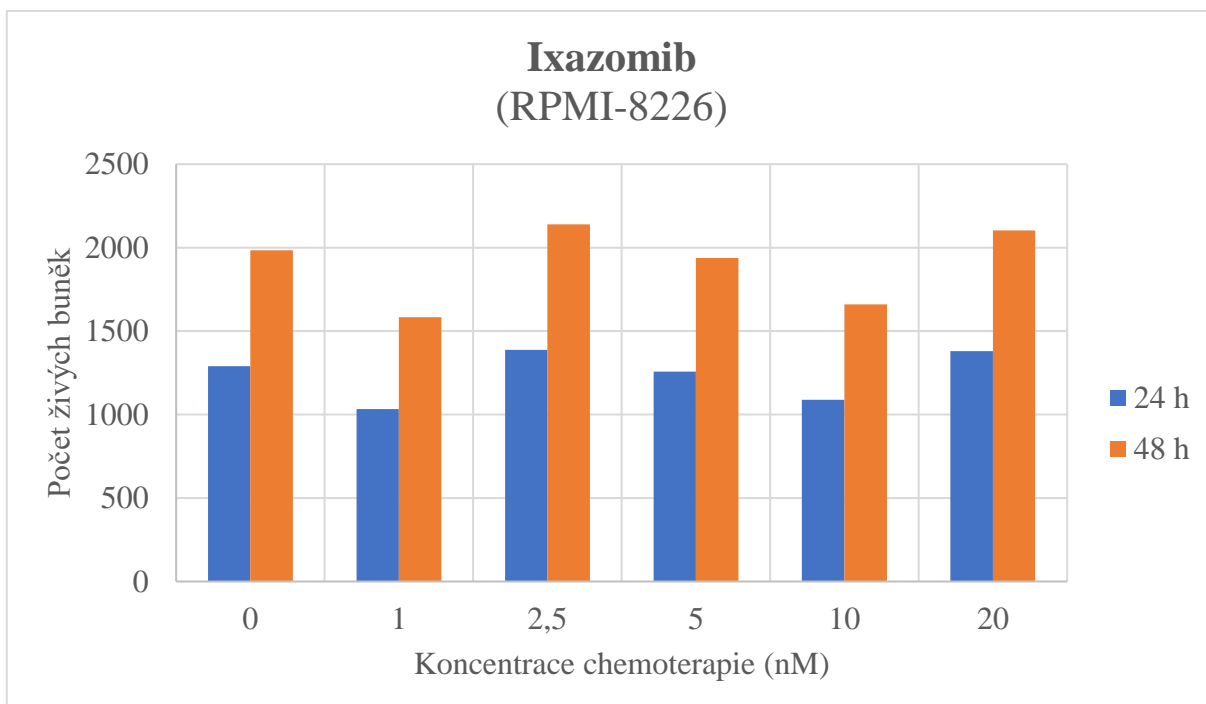
Po aplikaci bortezomibu na myelomovou linii RPMI-8226 byly pozorovány pouze malé změny v počtu buněk. Nejnižší počet buněk byl zaznamenán po 24hod inkubaci při koncentraci 2,5 nM, nicméně oproti kontrole je rozdíl minimální (cca 20%). Po 48hod inkubaci byl nejnižší počet buněk detekovaný při nejvyšší koncentraci 20 nM, kde bylo 2× méně buněk než při 0 nM.





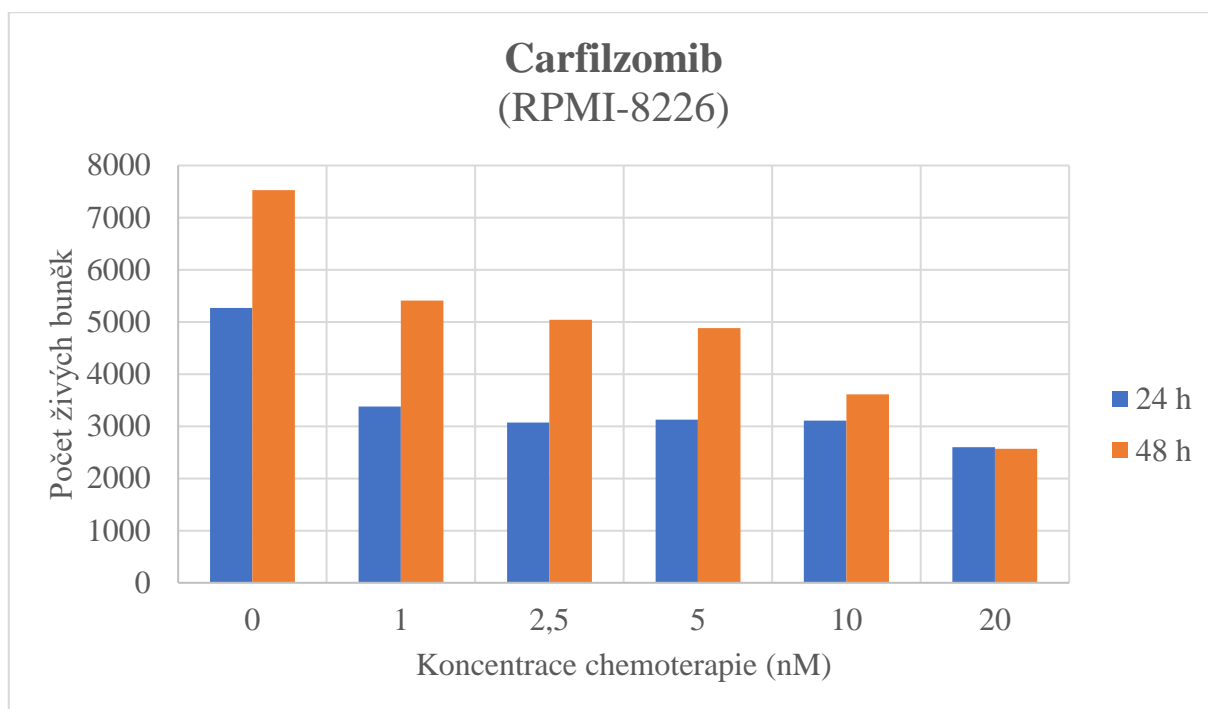
Obrázek 8: Počet živých buněk po aplikaci bortezomibu (RPMI-8226)

Stejně jako bortezomib, ani ixazomib nevedl k prudkému poklesu počtu buněk, naopak byl u některých koncentrací pozorován nárůst. Po 24 hod došlo při koncentraci chemoterapeutika 2,5 nM k nárůstu buněk o cca 10 %. Největší pokles v počtu buněk byl při 1 nM (o 20 %). Obdobná situace byla pozorována i po 48 hod. Nejvíce buněk bylo v jamce s koncentrací 2,5 nM (nárůst o 10 %) a nejméně s 1 nM ixazomibu (pokles o 20 %).



Obrázek 9: Počet živých buněk po aplikaci ixazomibu (RPMI-8226)

Nejvýraznější rozdíly byly pozorovány u carfilzomibu. Počet buněk se snižoval se zvyšující se koncentrací chemoterapeutika, a to jak po 24 hod, tak po 48 hod, kde byly rozdíly ještě výraznější. Po 24 hod bylo u koncentrace 20 nM 2× méně buněk než v kontrolním vzorku. Po 48 hod bylo ve stejné koncentraci pozorováno až 3× méně buněk než v kontrolním vzorku.



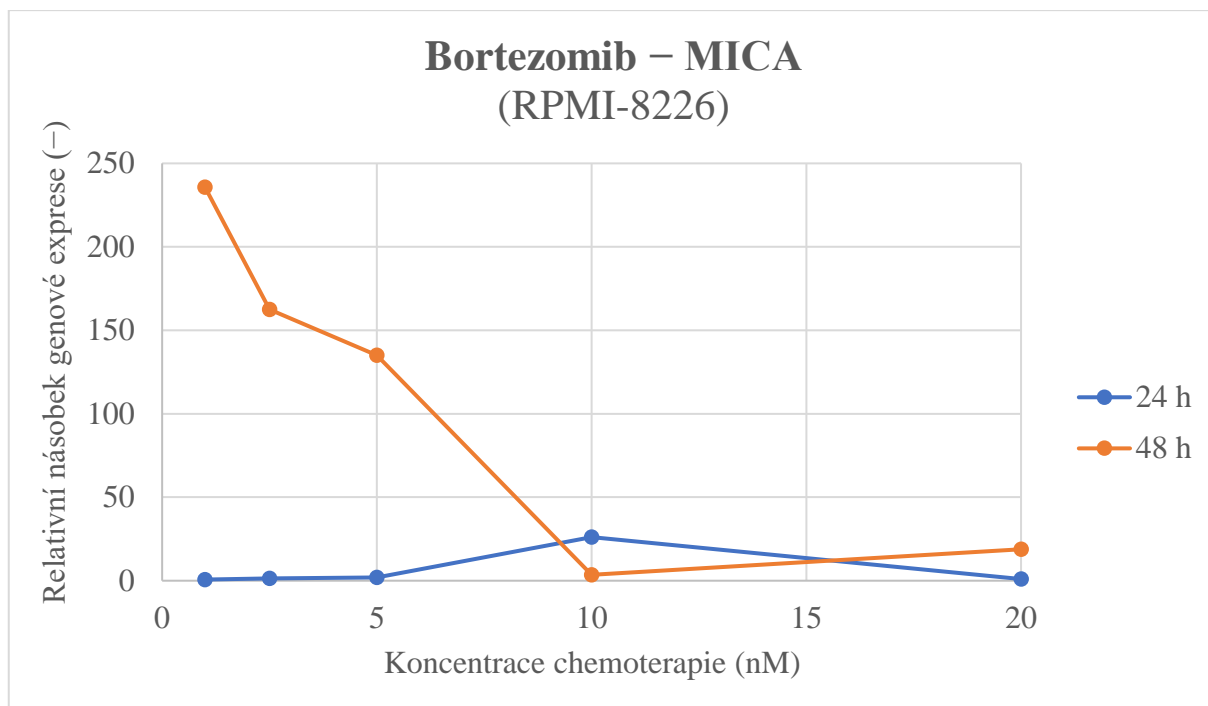
Obrázek 10: Počet živých buněk po aplikaci carfilzomibu (RPMI-8226)

### 7.3 Expres genů asociovaných s imunitní odpovědí

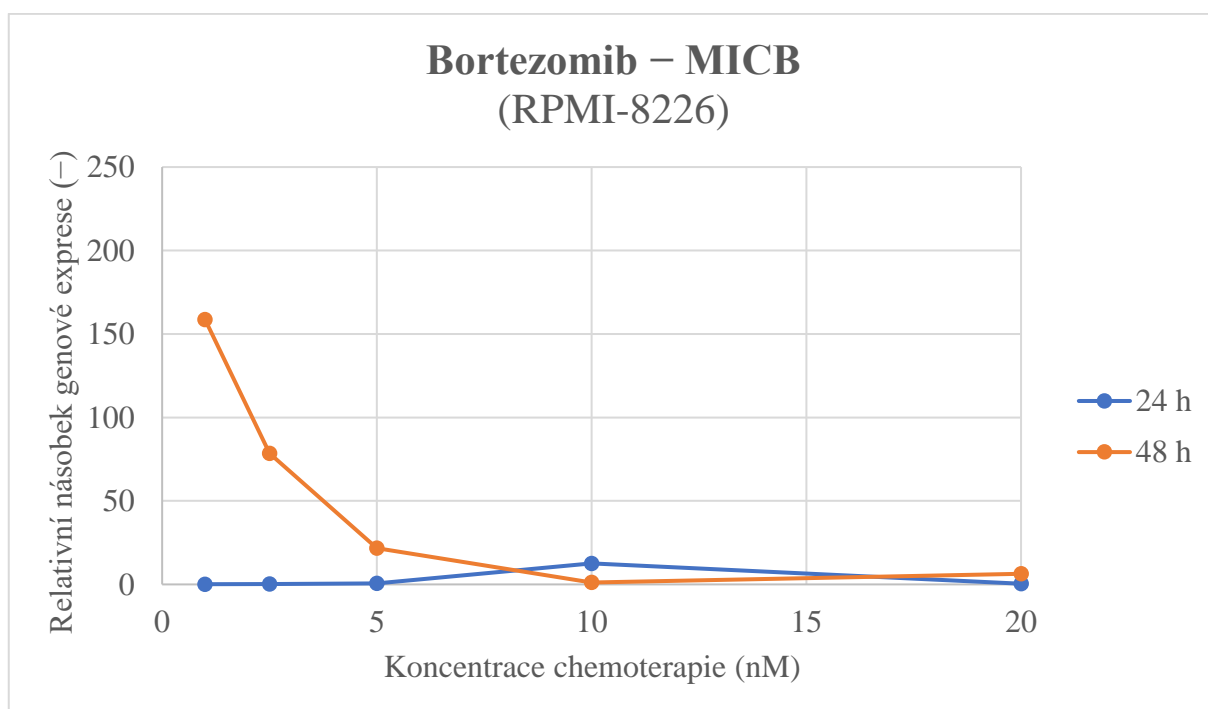
Pro sledování vlivu chemoterapie na expresi MICA a MICB byla zvolena metoda mRNA („messengerová“ ribonukleová kyselina, messenger ribonucleic acid) umožňující sledování upregulace exprese bez interference dalších změn na proteinové úrovni.

#### 7.3.1 Myelomová RPMI-8226 linie

Hodnoty genové exprese pro chemoterapii bortezomibem byly pro gen MICA i MICB signifikantně zvýšeny až po 48 hod. Výraznější exprese se u obou genů projevila při nižších koncentracích bortezomibu, nejvíce u 1 nM. Relativní exprese MICA byla u 1 nM bortezomibu až 250× vyšší oproti kontrolnímu vzorku. Expres MICB genu byla nejvíce navýšena také u 1 nM, a to „pouze“ 150×. S nárůstem koncentrace chemoterapie se exprese MICA i MICB snižovala, což poukazuje na přílišnou toxicitu chemoterapie. Tato situace je zobrazena na následujících grafech (Obrázek 11 a Obrázek 12).



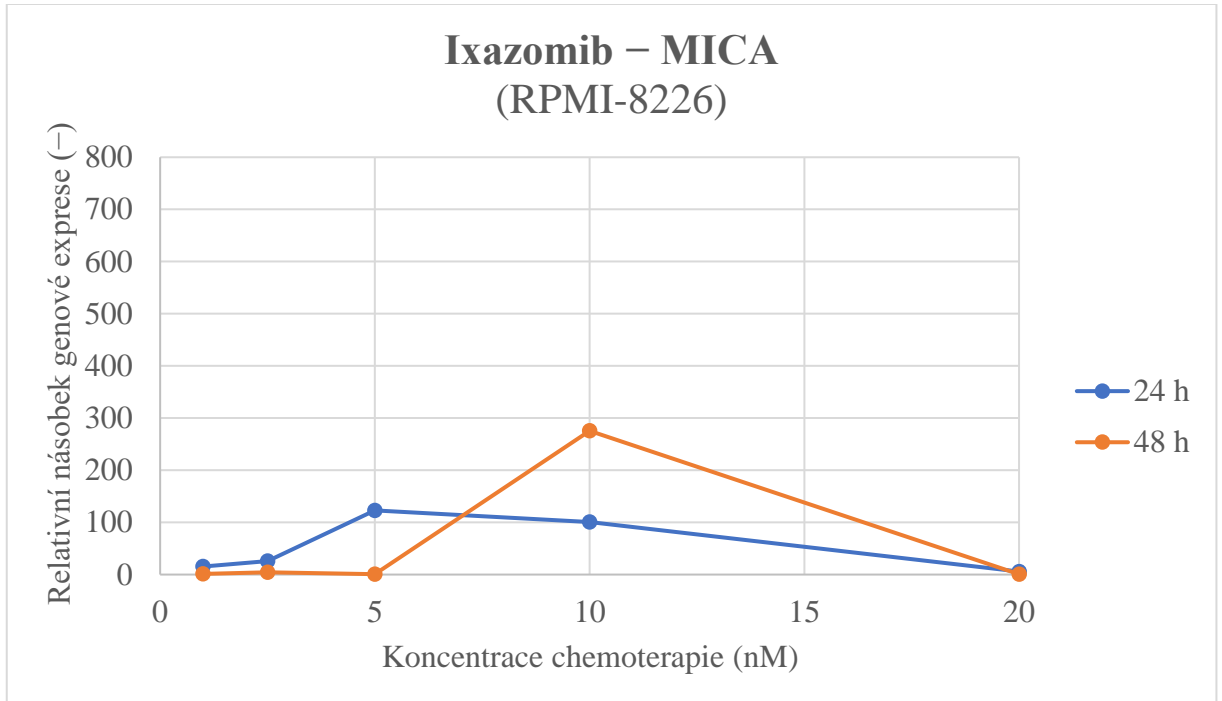
Obrázek 11: Expresa MICA po aplikaci bortezomibu (RPMI-8226)



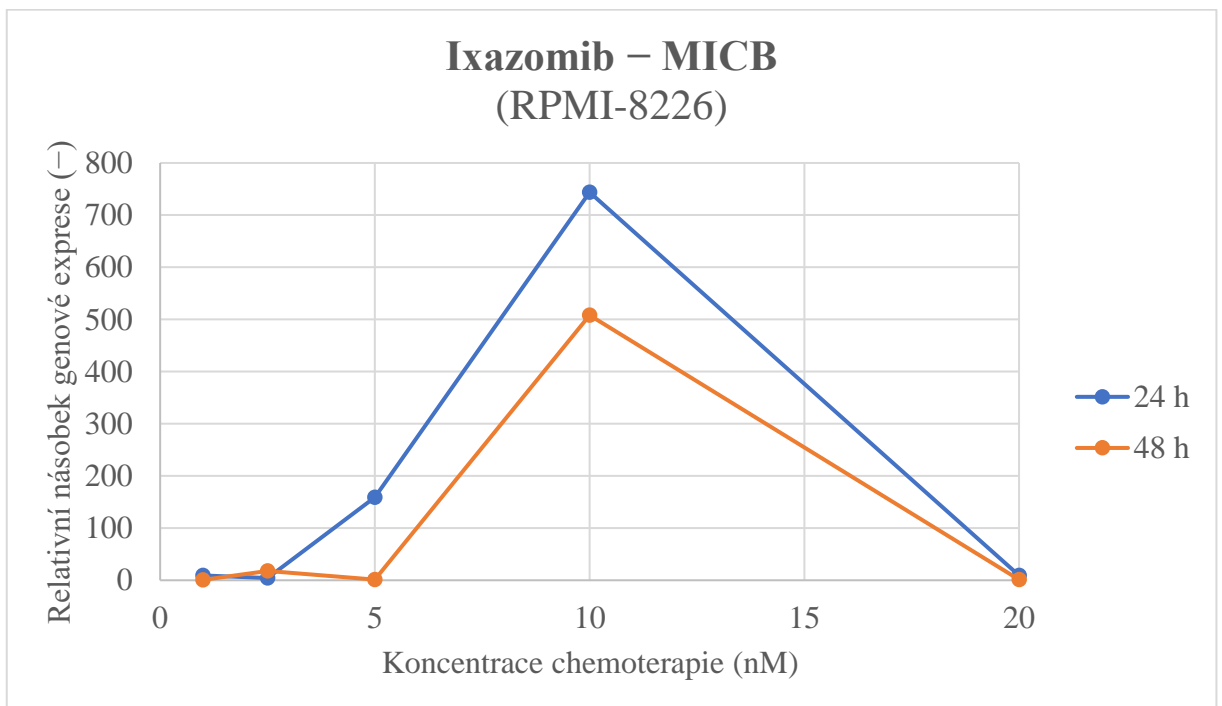
Obrázek 12: Expresa MICB po aplikaci bortezomibu (RPMI-8226)

Nejvyšší navýšení exprese cílových genů po aplikaci ixazomibu bylo zaznamenáno u koncentrace 10 nM, a to zejména u MICB genu, kde dosahoval gen MICB po 48 hod až 750× vyšší expresi, než byla v kontrole. Stejně významné navýšení bylo detekováno také po 24 hod, kde byl gen zvýšen „pouze“ 500x. Tato koncentrace také způsobila zvýšení exprese MICA genu, jehož hladina však nedosahovala hladiny MICB. I u něj však došlo k

nejvýraznějšímu navýšení u koncentrace 10 nM a 48hod inkubace. S přihlédnutím na předchozí výsledky (zejména IncuCyte®) lze předpokládat, že koncentrace 20 nM už je pro buňky více toxická a buňky tak nejsou schopny dále reagovat na stres způsobený chemoterapií zvýšenou expresí MICA či MICB.

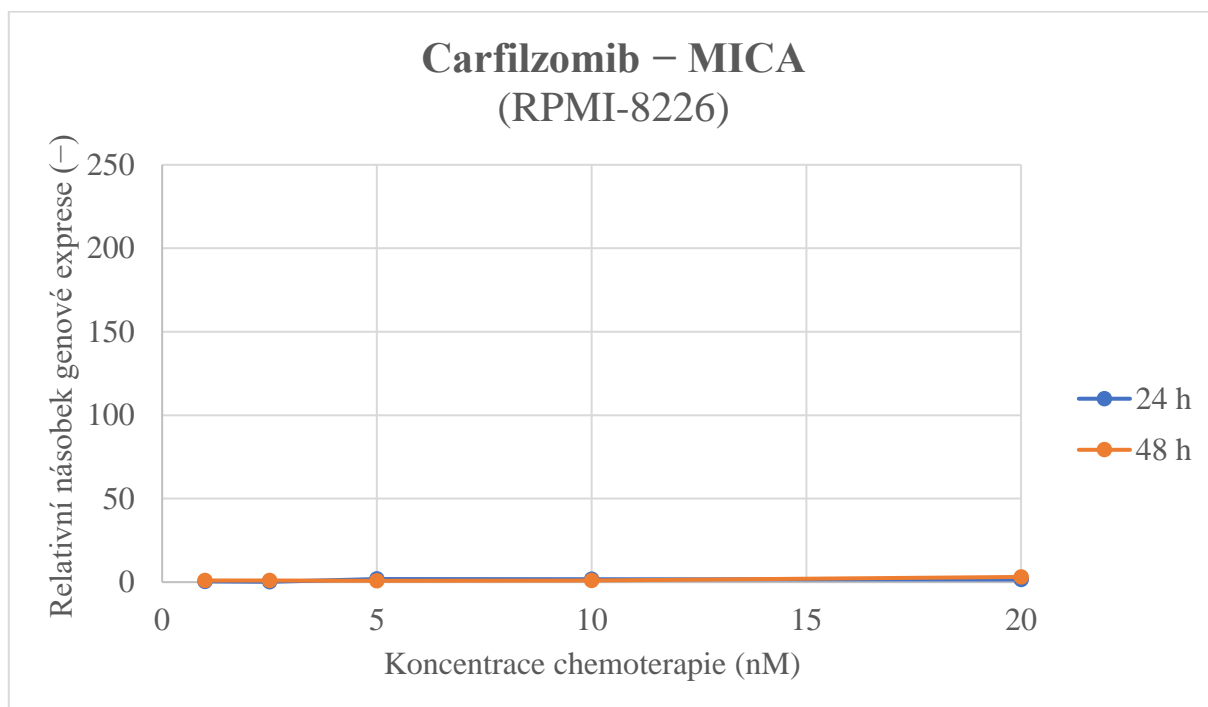


Obrázek 13: Exprese MICA po aplikaci ixazomibu (RPMI-8226)

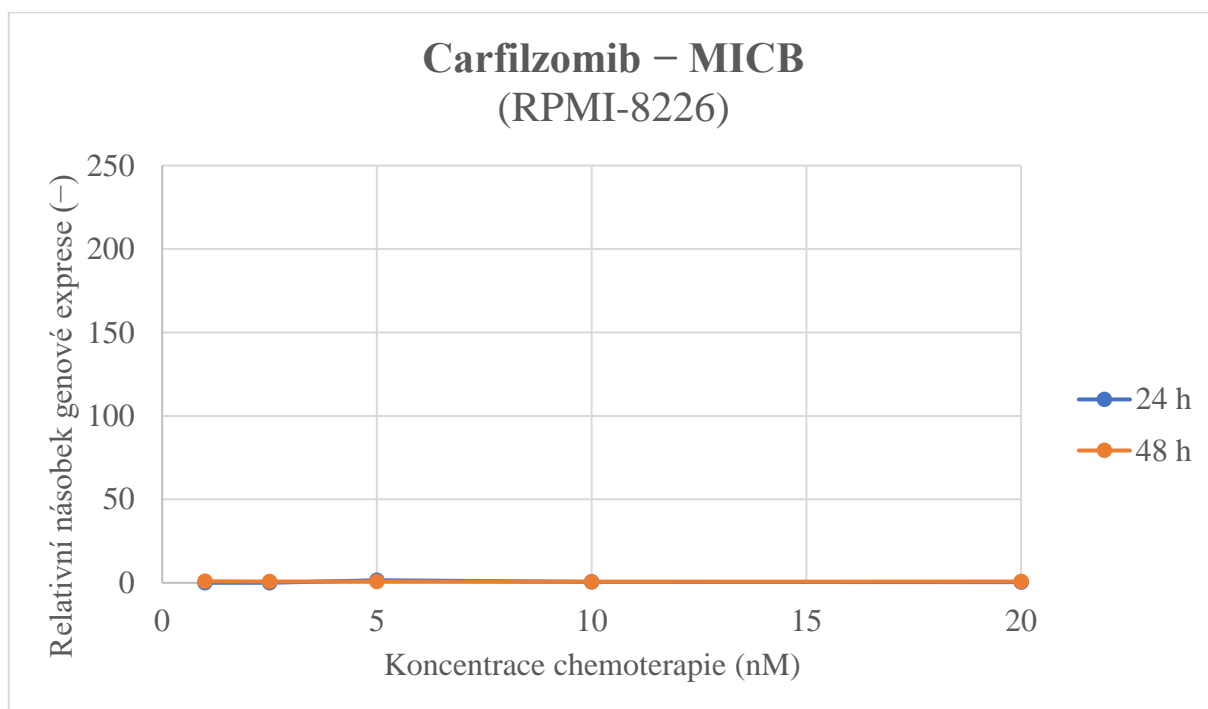


Obrázek 14: Exprese MICB po aplikaci ixazomibu (RPMI-8226)

Vzorky s aplikovanou chemoterapií carfilzomib nevykazovaly žádnou odpověď zvýšením exprese MICA či MICB proteinů.



Obrázek 15: Expresa MICA po aplikaci carfilzomibu (RPMI-8226)

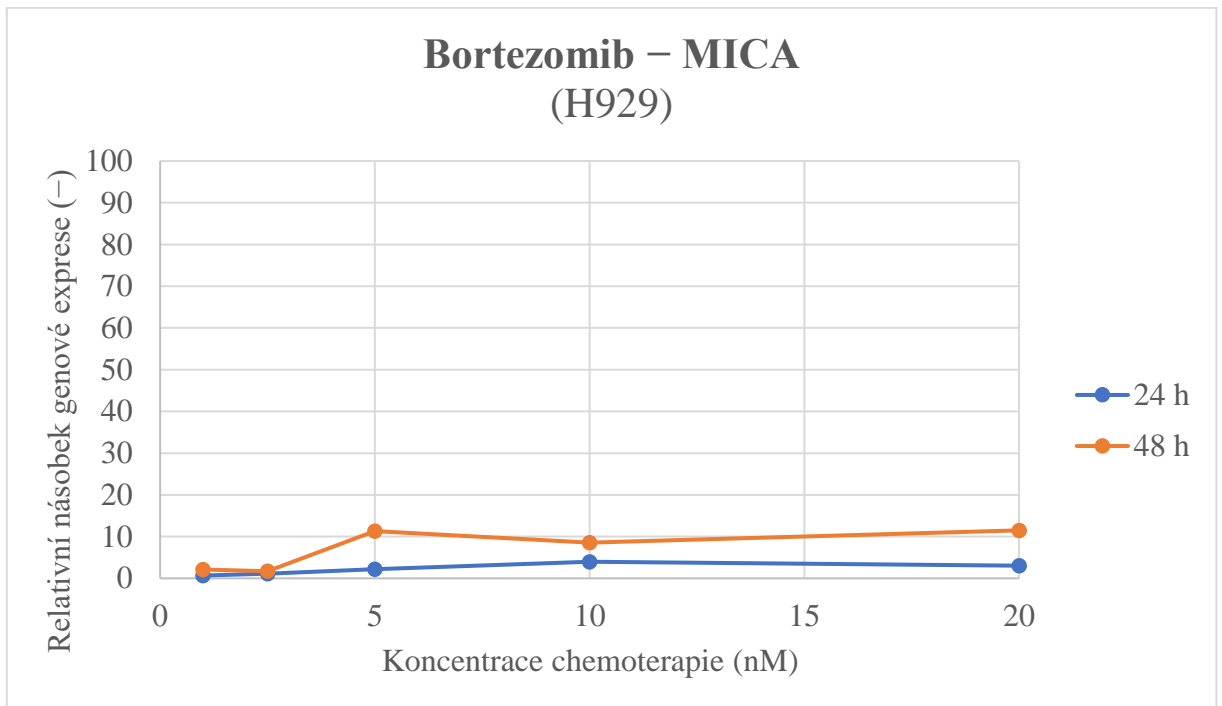


Obrázek 16: Expresa MICB po aplikaci carfilzomibu (RPMI-8226)

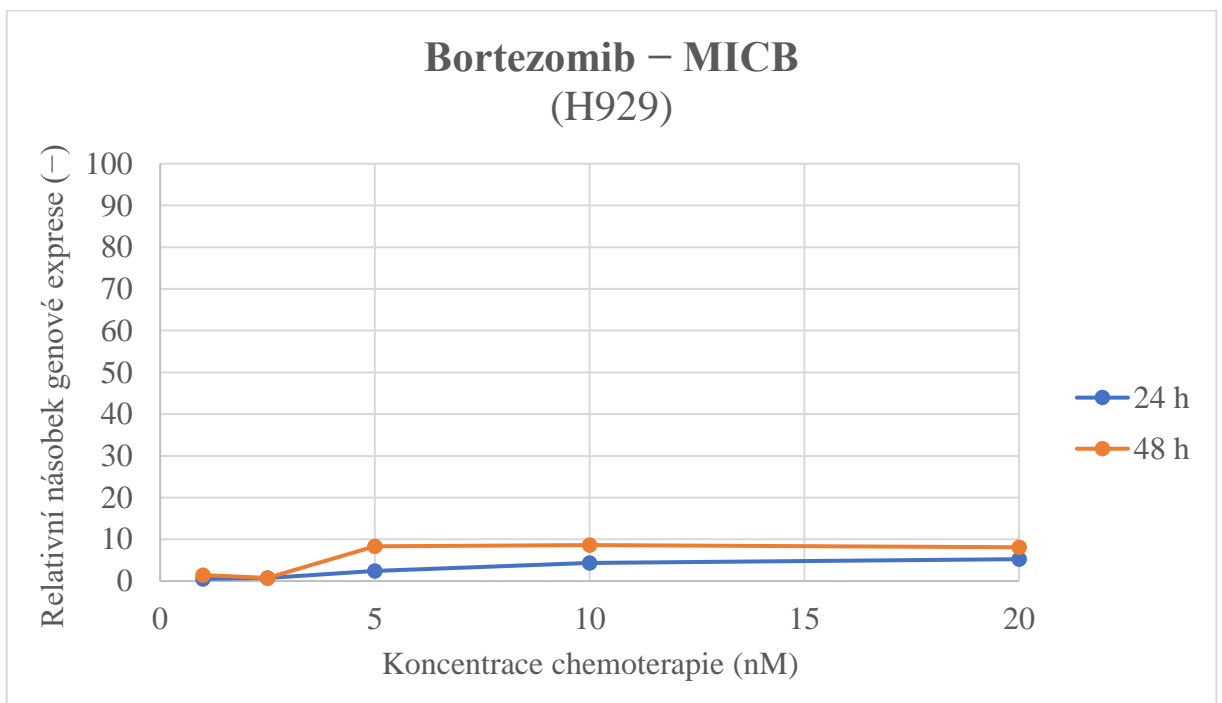
### 7.3.2 Myelomová H929 linie

Po provedení titrace chemoterapie a sledování výsledků u linie RPMI-8226, kde bylo možné taktéž sledovat proliferaci buněk, byla qPCR provedena také u linie H929. Relativní

násobek genové exprese u myelomové linie H929 s bortezomibem není nikterak výrazný, ale z následujících grafů (Obrázek 17 a Obrázek 18) lze vidět, že exprese po 48hod inkubaci byla o trochu větší, než po 24 hod. Nicméně reakce se významně lišila od linie RPMI-8226.



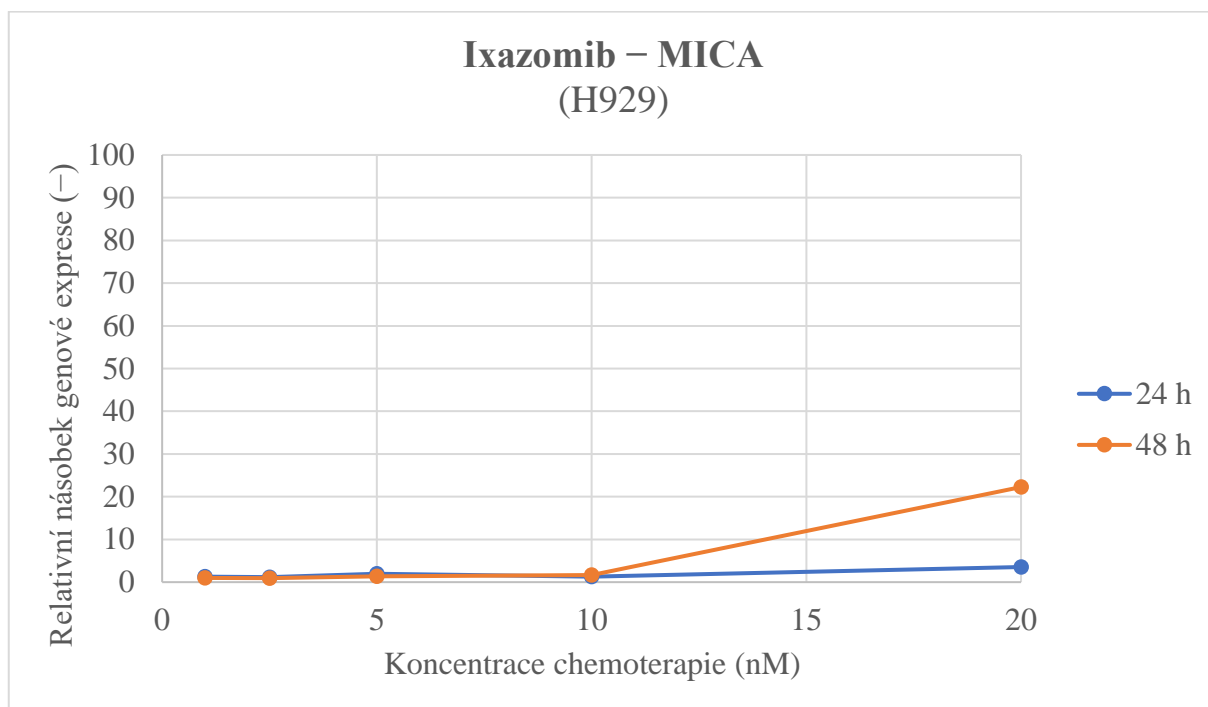
Obrázek 17: Exprese MICA po aplikaci bortezomibu (H929)



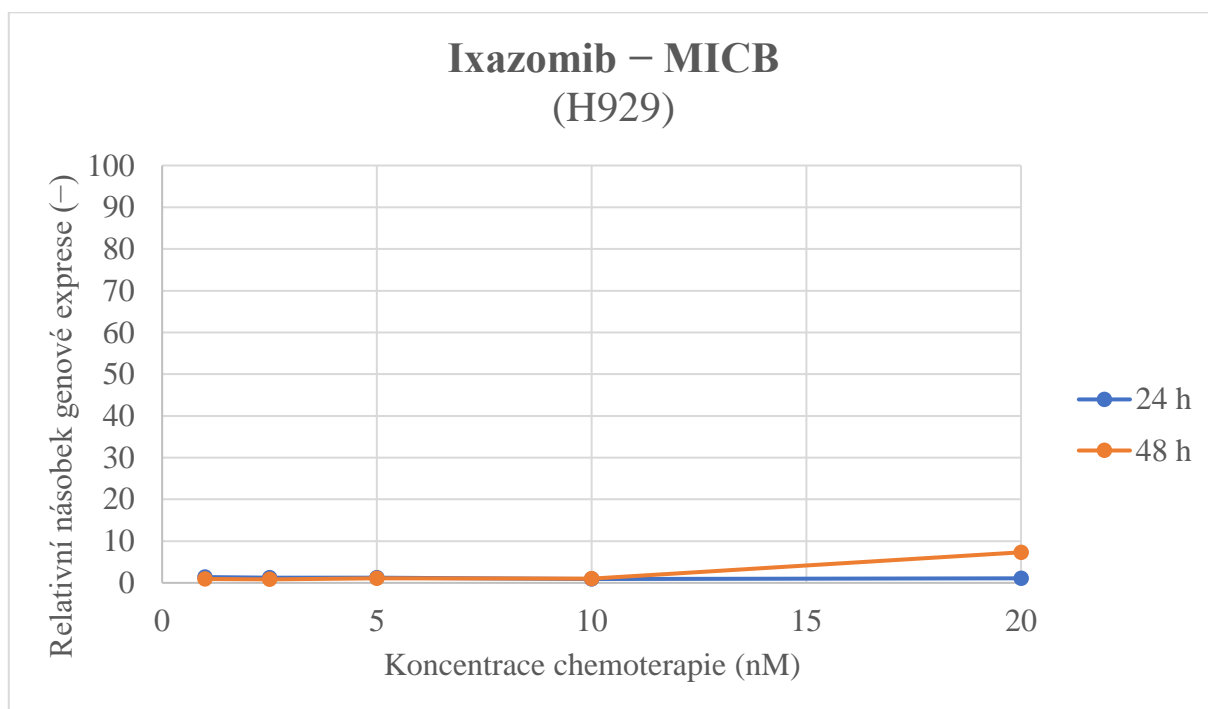
Obrázek 18: Exprese MICB po aplikaci bortezomibu (H929)

Exprese genu MICA i MICB měla po aplikaci ixazomibu velmi podobný průběh, přičemž došlo ke zvýšení exprese až po 48 hod, a to pouze u nejvyšší koncentrace 20 nM.

Zvýšení exprese bylo však maximálně 30násobné v porovnání s kontrolou, což bylo zhruba 20× méně, než u RPMI-8226.



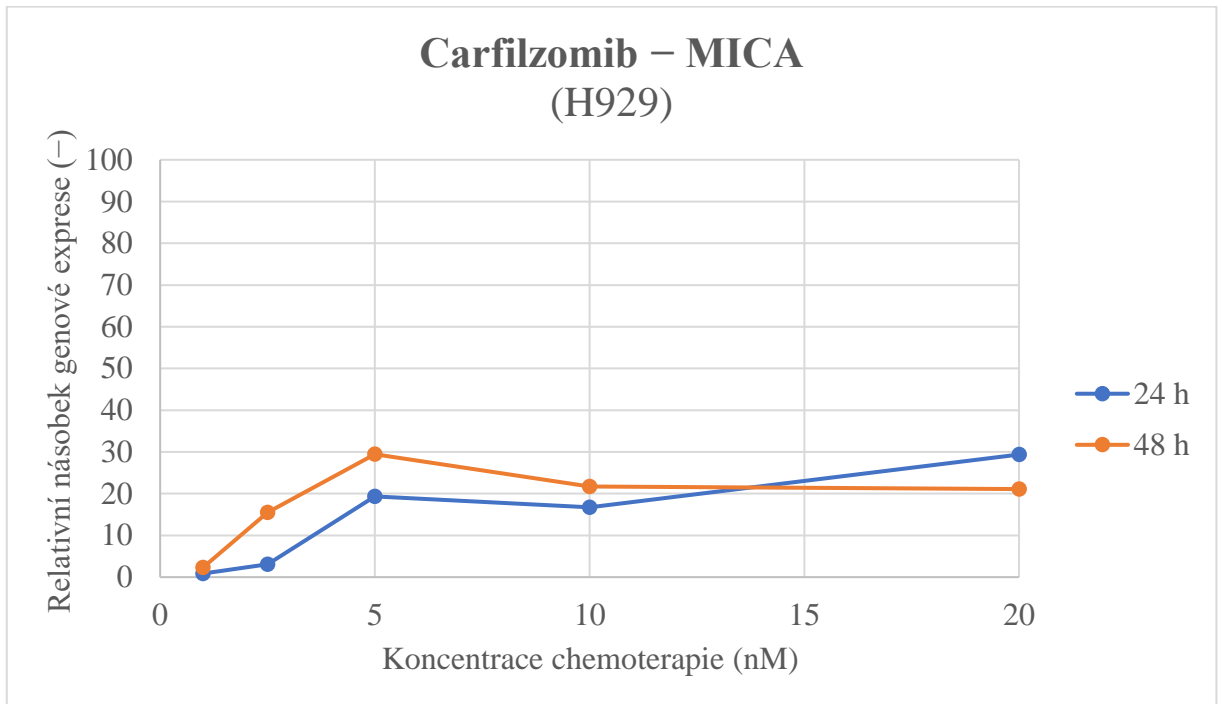
Obrázek 19: Exprese MICA po aplikaci ixazomibu (H929)



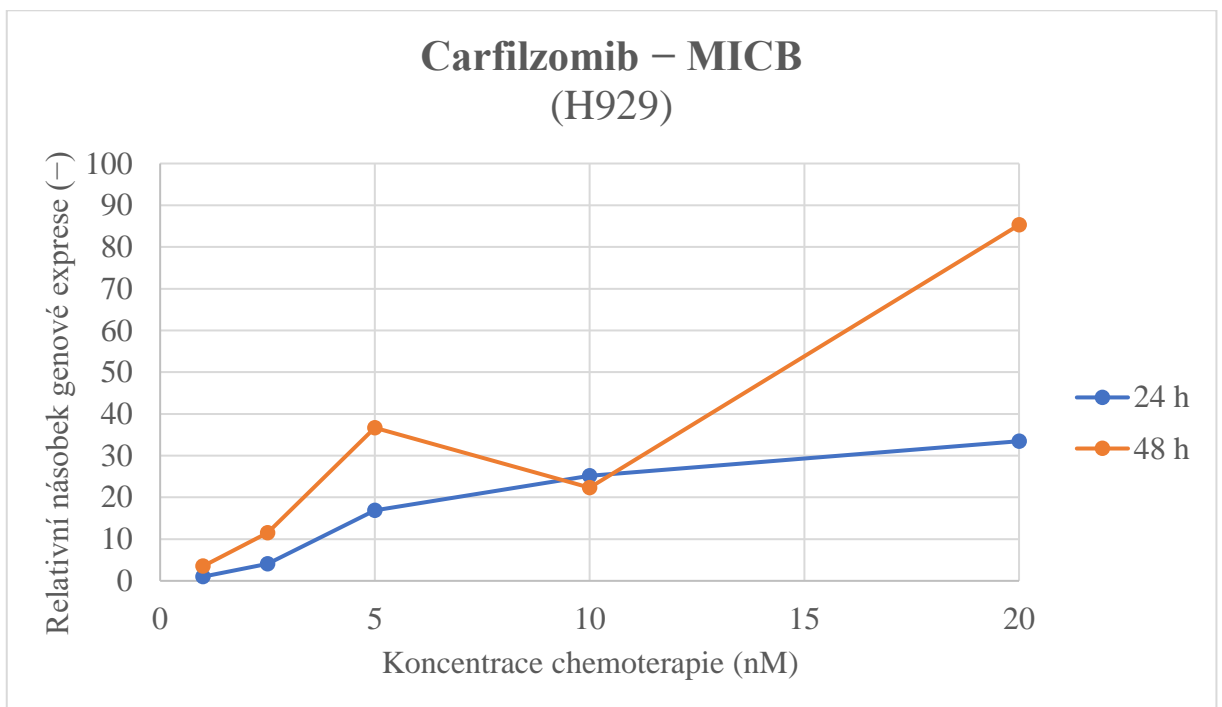
Obrázek 20: Exprese MICB po aplikaci ixazomibu (H929)

Z následujících grafů (Obrázek 21 a Obrázek 22) lze pozorovat, že u carfilzomibu došlo k navýšení exprese MICA i MICB od koncentrace 5 nM. U cílového genu MICA byla u koncentrace 5 nM carfilzomib nejefektivnější (zvýšení exprese 20× po 24 hod, resp. 30× po

48 hod). U MICB došlo k dalšímu zvýšení a neefektivnější byla v případě tohoto genu koncentrace 20 nM (navýšení po 48 hod až 85×).



Obrázek 21: Expres MICA po aplikaci carfilzomibu (H929)



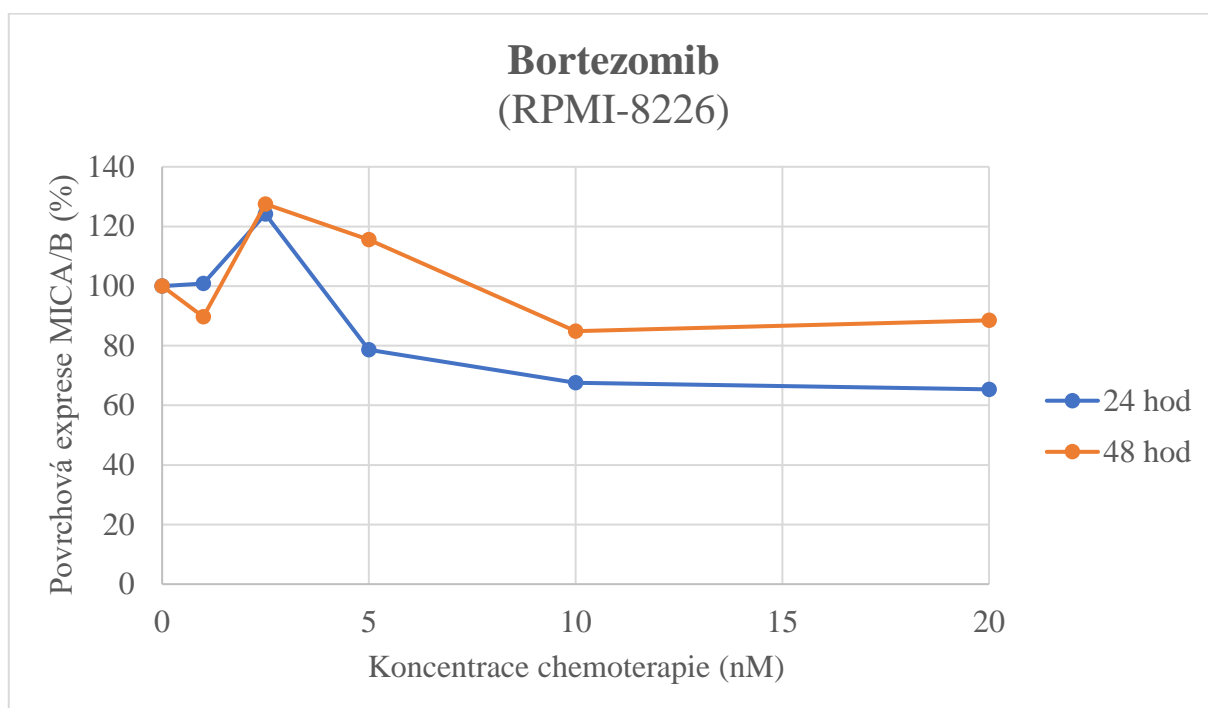
Obrázek 22: Expres MICB po aplikaci carfilzomibu (H929)



## 7.4 Stanovení povrchové exprese pomocí průtokové cytometrie

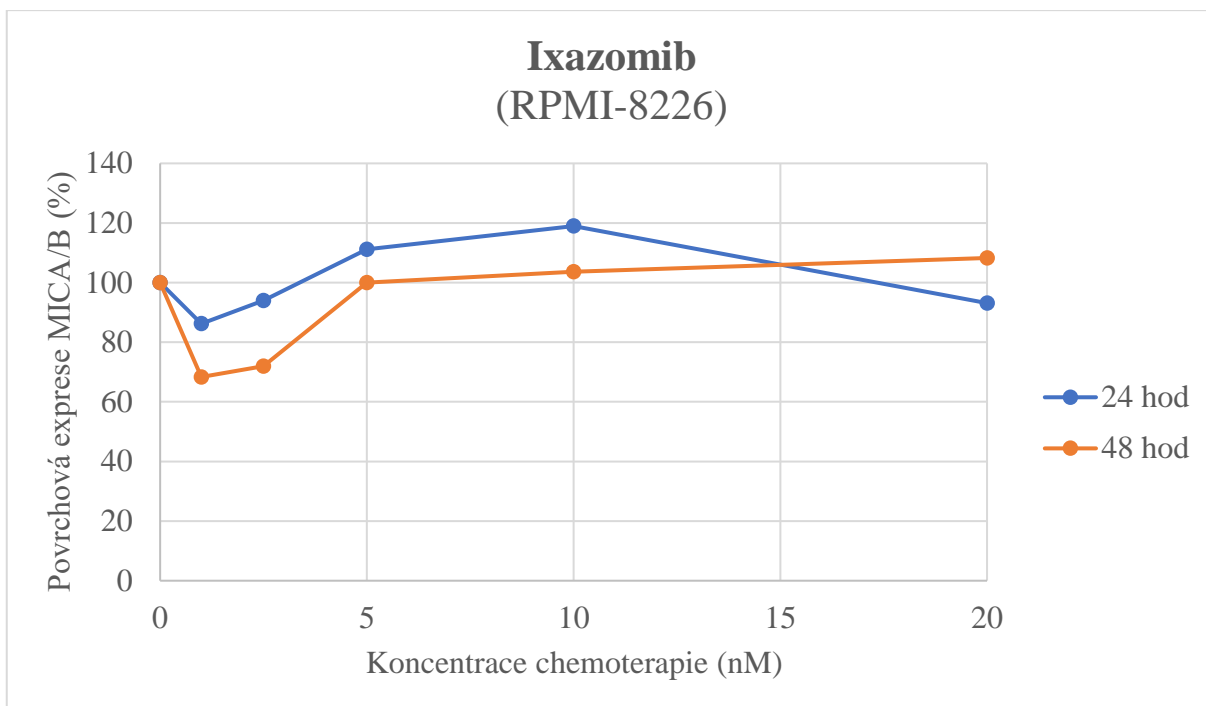
### 7.4.1 Myelomová RPMI-8226 linie

Povrchová exprese MICA/B nekopírovala výrazné navýšení pozorované u qPCR. Nicméně maximální efekt byl zaznamenán u stejných či podobných koncentrací. U bortezomibu a linie RPMI-8226 došlo k navýšení povrchové exprese pouze u koncentrace 2,5 nM a to o 24 % po 24 hod a o 28 % po 48 hod. U koncentrace 1 nM s nejvyšším navýšením exprese mRNA byla povrchová exprese totožná s kontrolním vzorkem (po 24 hod) či dokonce snižena (po 48 hod), u ostatních vyšších koncentrací došlo po 24 hod k poklesu povrchové exprese, u koncentrace 5 nM byla po 48 hod exprese mírně zvýšena (o 16 %).



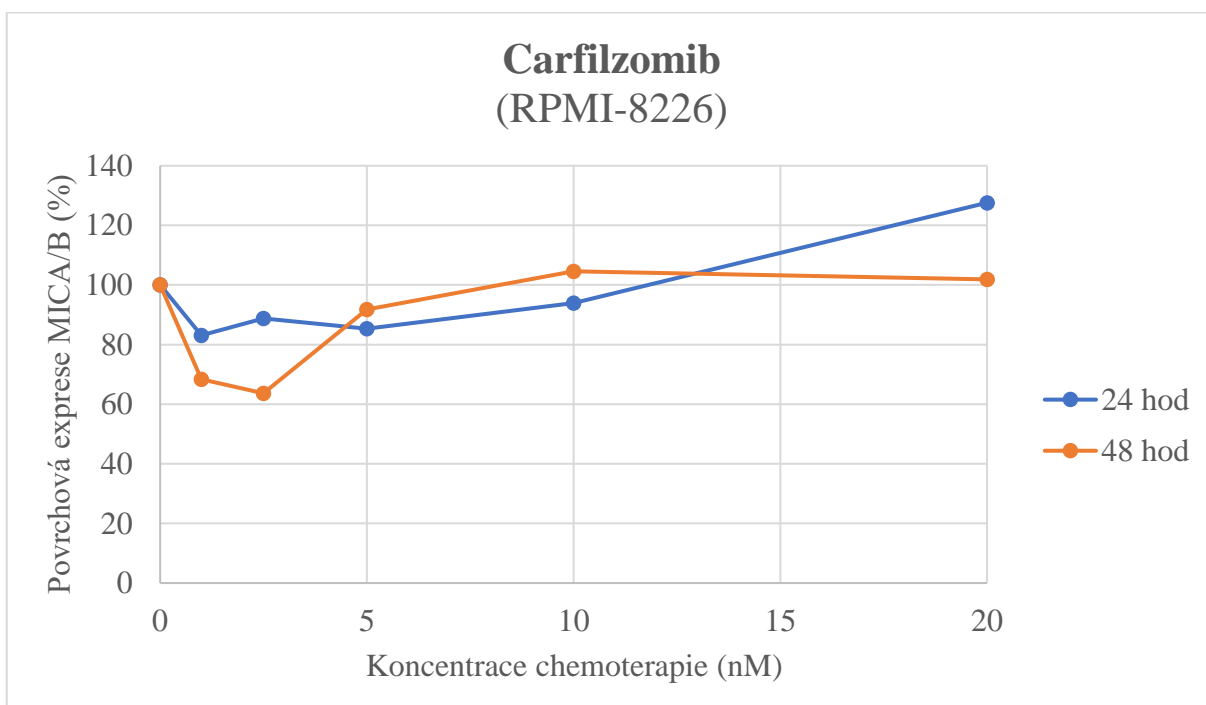
Obrázek 23: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci bortezomibu (RPMI-8226)

Ixazomib způsobil nejvyšší navýšení exprese na úrovni mRNA i na proteinové úrovni v koncentraci 10 nM, kde došlo po 24 hod k navýšení o necelých 20 %, navýšení povrchové exprese bylo detekováno také u 5 nM (cca o 10 %). Po 48 hod již zvýšení povrchové exprese u koncentrace 10 nM nebylo téměř pozorováno, a naopak se mírně zvýšila (o 8 %) u koncentrace nejvyšší 20 nM.



Obrázek 24: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci ixazomibu (RPMI-8226)

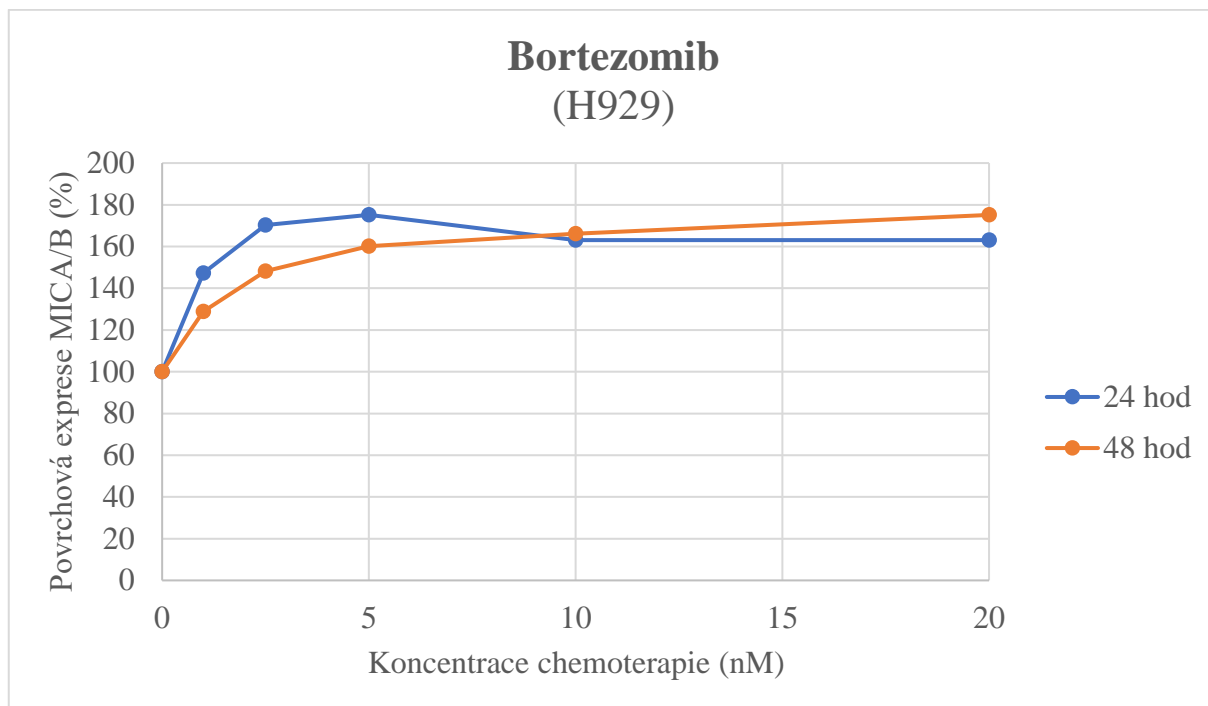
Carfilzomib způsobil zvýšení exprese pouze u 20 nM (o 27 %) po 24 hod, i když byla na mRNA úrovni změna zanedbatelná. Nicméně exprese se stabilizovala po 48 hod, kdy už byla srovnatelná s kontrolami.



Obrázek 25: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci carfilzomibu (RPMI-8226)

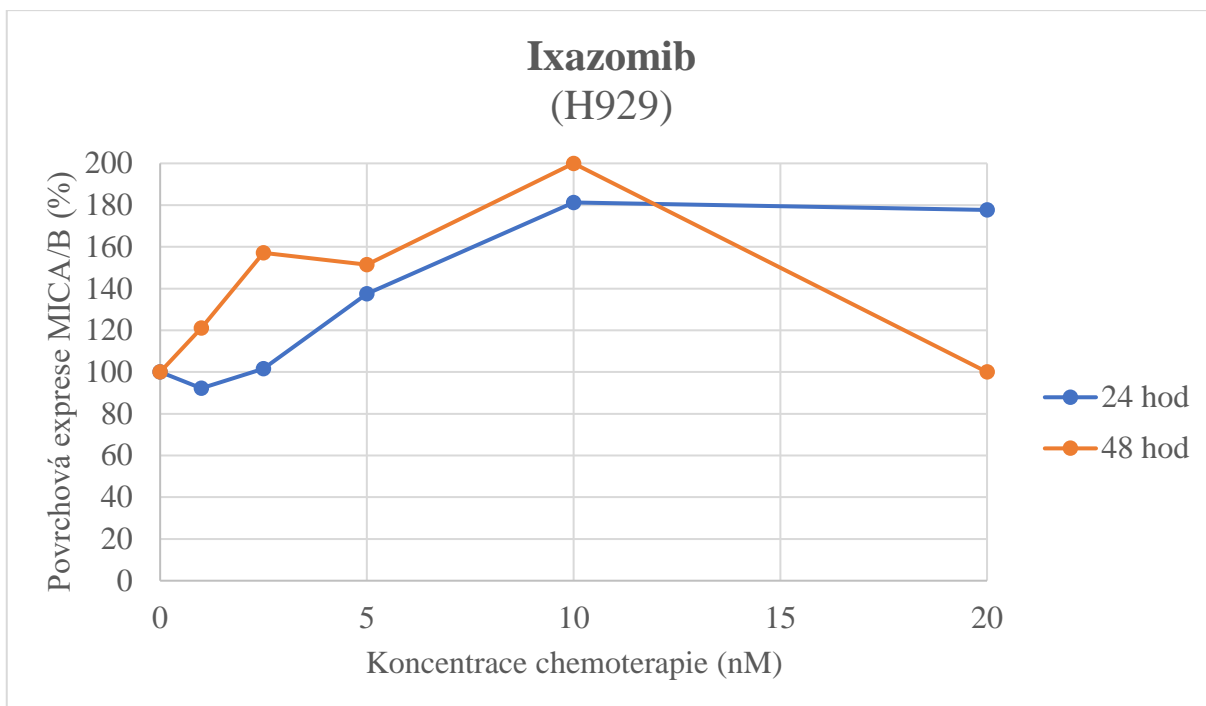
### 7.4.2 Myelomová H929 linie

Linie H929 reagovala na všechny chemoterapie výrazněji. U bortezomibu došlo k navýšení povrchové exprese u všech koncentrací s maximem o 75 % u koncentrace 5 nM (po 24 hod) či 20 nM (po 48 hod). Po 48hod inkubaci byl navíc zaznamenán postupný nárůst se zvyšující se koncentrací, což po 24 hod pozorovat nelze.



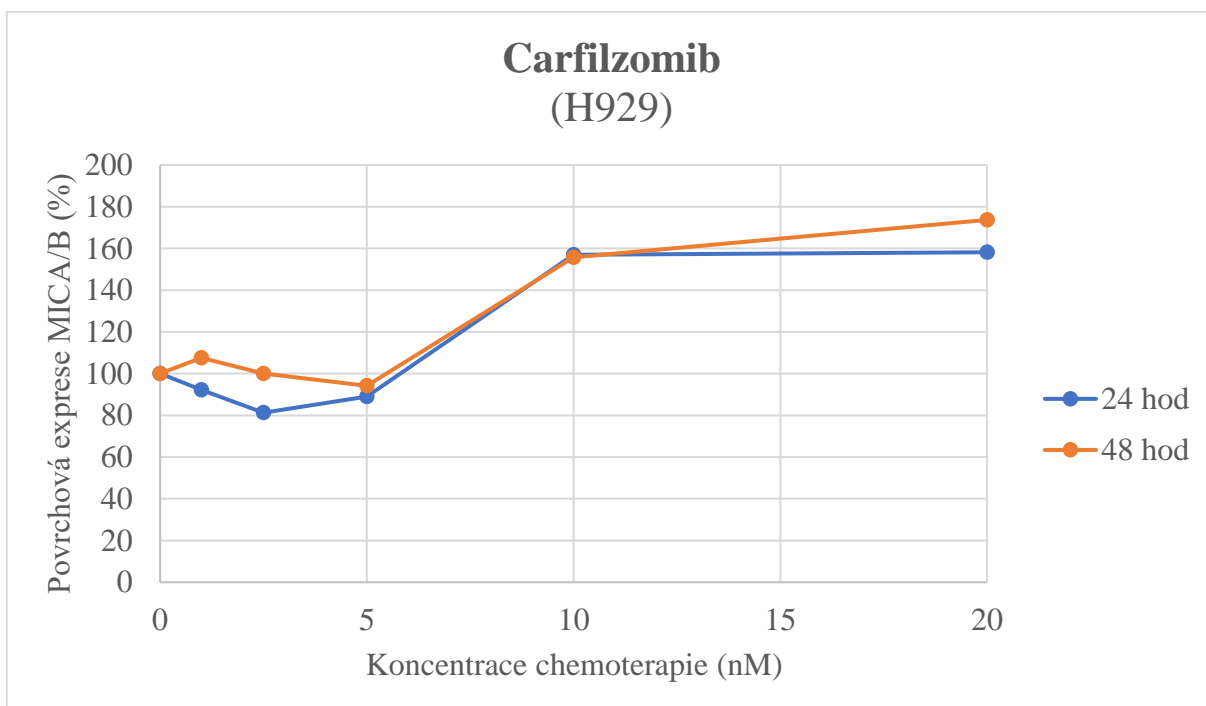
Obrázek 26: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci bortezomibu (H929)

Ixazomib také způsoboval navýšení povrchové exprese, a to až o 100 % u koncentrace 10 nM po 48 hod. Zajímavostí je, že i když po 48 hod u všech koncentrací došlo k navýšení exprese, tak u koncentrace nejvyšší, kdy došlo k navýšení mRNA, byla exprese srovnatelná s kontrolou. Navýšení u zcela všech koncentrací bylo pozorováno po 24hod inkubaci, kde bylo opět nejvyšší navýšení zaznamenáno u 10 nM (o 81 %), i když zde byla výrazná exprese také u koncentrace 20 nM (o 78 %).



Obrázek 27: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci ixazomibu (H929)

Carfilzomib významněji zvýšil povrchovou expresi u linie H929 pouze u dvou nejvyšších koncentrací, kdy došlo k nárůstu MICA/B u 10 nM o 57 % resp. 56 % (24 hod/48 hod) a u 20 nM o 58 % resp. 74 %. Tyto koncentrace měly také nejvyšší vliv na expresi mRNA.



Obrázek 28: Povrchová exprese MICA/B po aplikaci carfilzomibu (H929)

## 8 DISKUZE

Léčba mnohočetného myelomu je velmi složitá, pro pacienta náročná a doprovázená řadou nežádoucích účinků. Proto se hledají nové možnosti léčby, jako je imunoterapie, která zvýší účinnost léčby bez navýšení nežádoucích účinků. Imunoterapie však mnohdy nestačí, neboť mnohočetný myelom má vyvinuté široké spektrum únikových mechanismů. Z tohoto důvodu se zdá nejlepší strategií kombinace běžné chemoterapie a imunoterapie

Hlavním cílem bylo tedy nalezení vhodné koncentrace chemoterapie, aby bylo dosaženo co největší exprese molekul dále stimulujících imunitní systém v co nejkratším čase.

Prvním cílem této práce bylo sledování proliferace a viability buněk myelomových linií po aplikaci vybrané chemoterapie. Viabilita buněk byla měřena metodou průtokové cytometrie a proliferace pomocí přístroje IncuCyte®. Sledována byla korelace mezi koncentrací chemoterapie a zastoupením mrtvých buněk. Konkrétně byla použita následující chemoterapie: bortezomib, ixazomib a carfilzomib jakožto představitelé proteazomových inhibitorů. Hlavní testy byly provedeny na myelomové linii RPMI-8226 s následnou validací na linii H929.

V této práci bylo prokázáno, že bortezomib, carfilzomib a v menší míře i ixazomib způsobují snížení viability obou linií. Nejvyšší počty mrtvých buněk byly zjištěny u nejvyšší koncentrace bortezomibu (20 nM) po 48 hodinách, což odpovídalo předchozí studii Chao Niu z roku 2017, kde autoři došli ke stejnému závěru. Také proliferace byla nejnižší při této koncentraci, což znamená, že je část buněk na bortezomib citlivá a část rezistentních buněk se může nadále množit [74].

Proliferaci po aplikaci bortezomibu sledovali také vědci z Chuxiong Medical College, kteří však použili výrazně vyšší koncentraci 80 nM, čímž téměř zastavili proliferaci všech buněk, nicméně až po 96 hodinách. Nižší koncentrace 50 nM měla účinnost nižší, ale překvapivě byl efekt pozorován již dříve, a to po 48 hodinách. Korelace zastoupení mrtvých buněk a koncentrace bortezomibu v této studii byla taktéž pozorována. Nicméně efekt byl stále výraznější než u aplikace ixazomibu a carfilzomibu [75]. Například u ixazomibu byl i v nejvyšší námi testované koncentraci nárůst mrtvých buněk poměrně nízký, což odpovídá i výsledkům předchozí studie, kdy bylo snížení proliferace pozorováno až při koncentraci 30 nM a více. Stejně tak nebyl pozorován pokles proliferace, která bývá ovlivněna až při námi netestované koncentraci 30 nM [76]. Studie D. Chauhana z roku 2011 navíc prokázala, že ixazomib indukoval apoptózu MM buněčných linií rezistentních na konvenční terapii a v

primárních MM buňkách získaných od pacientů rezistentních na bortezomib a lenalidomid [77]. Carfilzomib je již schopen vyššího efektu, kdy při nejvyšší koncentraci umírá přibližně 20 % buněk, což odpovídá přechozím výsledkům (25 %) z roku 2022, kdy nejvyšší úmrtnosti buněk RPMI-8226 bylo dosaženo při koncentraci 20 nM carfilzomibu (po 48 hodinách). Zde byl také pozorován sestupný trend proliferace, který byl detekován také v naší studii či v jiných pracích [78]. V další studii z roku 2015 byly použity vyšší koncentrace 40 a 60 nM carfilzomibu, které způsobily výraznější snížení viability buněk [79]. Validací linie celkově odpovídala na chemoterapie mnohem výrazněji, a i při nižších koncentracích bortezomibu a carfilzomibu bylo detekováno vyšší zastoupení mrtvých buněk, navíc vyšší senzitivita byla pozorována u carfilzomibu, kde byl efekt zaznamenán již po 24 hodinách i u nižších koncentrací. Tato data jsou v souladu s předchozími studii, kde byla také senzitivita na carfilzomib vyšší [80].

Dle rozsáhlé studie z roku 2013 je pravděpodobnou příčinou zvýšené chemosenzitivity to, že buňky linie H929 mají více proteinů s krátkou životností než buňky RPMI-8226, tím pádem dochází rychleji k úplné inhibici proteazomu a tedy i apoptóze [80].

Druhým cílem této diplomové práce bylo sledování zvýšení exprese genů asociovaných s imunitní odpovědí – MICA a MICB pomocí qPCR. Tato odpověď by měla přispět ke stimulaci lymfocytárních buněk (cytotoxické T-lymfocyty, NK buňky). Vliv na indukci exprese byl sledován pomocí qPCR. MICA a MICB jsou stresem indukované ligandy na MM buňkách, které jsou rozpoznávány NK buňkami za pomoci příslušného receptoru NKG2D. Hodnoty, které budou dále popisovány, jsou relativní násobky genové exprese daného genu, tzv. fold change.

Jelikož je bortezomib ze všech tří chemoterapií nejstarší, existuje nejvíce výsledků právě s touto chemoterapií. V naší studii byla zvýšená exprese MICA a MICB pouze u nejnižších koncentrací až po 48 hodinách. U kratšího intervalu (tj. 24 hodin) bylo pozorováno pouze mírné navýšení u 10 nM. Toto odpovídá studii, která monitorovala vliv 10 nM bortezomibu po 12 hodinách, kdy docházelo k navýšení MICA a MICB 74. V rámci testování této koncentrace (10 nM) bylo zjištěno, že je již odpověď menší, což bude pravděpodobně způsobeno toxicitou pozorovanou i u našich experimentů. Nicméně stále významnější exprese ligandů, a tedy i předpokládaná imunomodulační schopnost, je v té to práci pozorována při mnohem menších koncentracích, než je 10 nM, konkrétně při 1 nM bortezomibu po 48 hodinách. Podobných výsledků bylo dosaženo i v jiné studii, kdy nejvyšší exprese bylo dosaženo v koncentracích mezi 2,4–7,7 nM bortezomibu, avšak na buněčných liniích hepatocelulárního karcinomu [82]. Tyto výsledky opět odpovídají našim datům.

Mimo jiné v již zmíněné studii také ověřili teoreticky předpokládanou korelaci zvyšujícího množství NKG2D receptorů se zvyšující expresí stresem indukovaných ligandů MICA a MICB [74].

V rešerši z roku 2015 bylo také dosaženo závěru, že bortezomib v nízkých dávkách působí imunomodulačně na buňky a zvyšuje protinádorové účinky zprostředkované již zmíněnými receptory NKG2D [72]. Bylo ale také pozorováno, že ve velmi velkých koncentracích (100–1000 nM) má bortezomib i imunosupresivní účinky [83]. To znamená, že sice vysoké dávky bortezomibu mohou účinně způsobovat apoptózu MM buněk prostřednictvím inhibice proteazomu, ale tlumit cytotoxické schopnosti NK buněk. Expze ligandů MICA a MICB na buňkách RPMI-8226 s ixazomibem v této diplomové práci dosahovala několikanásobně vyšších hodnot než buňky s bortezomibem. Celkově nejvyšších výsledků relativní expze bylo u ligandu MICA i MICB dosaženo při 10 nM po 48 hodinách. Carfilzomib nevedl k indukci ani jednoho genu pravděpodobně z důvodu, že carfilzomib velmi dobře inhibuje funkci proteazomu MM buněk, ale nedá se použít jako imunomodulační lék pro stimulaci NK buněk pomocí expze ligandů MICA ani MICB.

U obou těchto chemoterapií nelze data porovnat s dostupnou literaturou, neboť doposud nebyla provedena analýza u žádné myelomové linie.

Posledním cílem této diplomové práce bylo ověření výsledků na proteinové úrovni pomocí průtokového cytometru. Sledovány byly ligandy MICA a MICB na buňkách myelomové linie RPMI-8226 a H929. Nádorové MM buňky exprimují v menší míře ligandy MICA a MICB i bez chemoterapie. Tyto ligandy jsou však zároveň nádorovými buňkami down-regulovány, např. prostřednictvím posttranslačních modifikací zakončených jejich rozštěpením. Tímto mechanismem se nádorové buňky snaží uniknout rozpoznání NK buňkami [84].

Rozštěpené MICA a MICB proteiny se přeměňují na rozpustné proteiny, které se dostávají do extracelulárního prostoru. Pacienti mají často zvýšené koncentrace těchto rozpustných molekul MICA a MICB v krvi, což naznačuje, že uvolňování MICA a MCB je terapeutickým cílem v onkologii. Nové terapeutické přístupy, jež by měly mít za úkol obnovit dohled zprostředkovaný receptorem NKG2D, můžou zahrnovat právě použítá chemoterapeutika – bortezomib, ixazomib a carfilzomib [84].

Pomocí průtokové cytometrie byl sledován rozdíl množství MICA a MICB mezi nulovou a nenulovými koncentracemi jednotlivých chemoterapií. U linie RPMI-8226 však bylo navýšení velmi nízké (max. 27 % u 20 nM carfilzomibu po 24 hodinách), celkově nelze pozorování z mRNA vidět na proteinové úrovni. Linie H929 vykazovala vyšší expzi po

aplikaci všech chemoterapií a vypadá to, že u této linie dochází k vyšší imunogenicitě a menšímu odštěpování MICA a MICB z povrchu. Obě tyto linie mají zcela jiný genetický podklad a je nutné sledovat, zda určité mutace vedou k jiné reakci na chemoterapii. Zajímavostí bude sledovat kombinace chemoterapie a cytotoxické aktivity NK buněk, což je plánováno v navazujícím projektu.



## ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala možnostmi využití vybraných druhů chemoterapie pro zvýšení exprese molekul souvisejících s aktivitou imunitního systému. Pro chemoterapeutickou léčbu buněk mnohočetného myelomu byly použity obecně inhibitory proteazomu, konkrétně bortezomib, ixazomib a carfilzomib. K experimentům byla k dispozici buněčná linie RPMI-8226, což jsou nádorové buňky mnohočetného myelomu u pacienta. Pro validaci výsledků byla použita buněčná linie H929. Primárním úkolem bylo sledování exprese již zmíněných molekul v závislosti na koncentraci a čase působení chemoterapie. Konkrétně jde o molekuly ligandů MICA a MICB, na jejichž expresi je dále závislá míra účinku NK buněk.

Hlavním cílem bylo nalezení vhodné koncentrace chemoterapie, aby bylo dosaženo co největší exprese molekul dále stimulujících imunitní systém v co nejkratším čase. Zmíněné tři druhy chemoterapie byly hodnocené zvlášť. Bortezomib dosahoval významné exprese molekul MICA a MICB v koncentracích 1 a 2,5 nM po 48 hodinách. Ixazomib vykazoval rychlejší reakci, co se MICA exprese týče, již po 24 hodinách v koncentraci 5 nM. Výsledky exprese ligandů MICB dosahovaly již po 24 hodinách mimořádně vysokých hodnot při 10 nM ixazomibu. Využití carfilzomibu se ani v nejvyšších koncentracích neukázalo jako vhodné pro stimulaci exprese molekul MICA a MICB.

Nelze jednoznačně posoudit, zda je z hlediska imunoterapie mnohočetného myelomu vhodnější bortezomib nebo ixazomib. Carfilzomib vykazoval nejnižší vliv na expresi námi sledovaných molekul. Proteinová exprese však zůstávala velmi nízká, a to i přes nárůst mRNA pro daný gen. Z toho vyplývá, že zde dochází k poruše syntézy anebo povrchové exprese, která je však pro interakci s buňkami imunity zásadní.

Stanovené cíle této diplomové práce byly splněny a získané výsledky poslouží pro navazující studie.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. POSPÍŠILOVÁ, Šárka; DVOŘÁKOVÁ, Dana; MAYER, Jiří et al. *Molekulární hematologie*. Praha: Galén, 2013. ISBN: 978-80-7262-942-8.
2. NAVRÁTIL, Leoš a kolektiv. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada, 2008. ISBN: 978-80-247-2319-8.
3. PENKA, Miroslav; TESAŘOVÁ, Eva a kolektiv. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada, 2011. ISBN: 978-80-247-3459-0.
4. SINGH, Ranbir; SOMAN-FAULKNER, Kristina; SUGUMAR, Kavin. *Embryology, Hematopoiesis*. In: StatPearls [online]. January 2023 [cit. 16. 2. 2023]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544245/>.
5. PENKA, Miroslav; BULIKOVÁ, Alena a kolektiv. *Neonkologická hematologie. 2., doplněné a zcela přepracované vydání*. Praha: Grada, 2009. ISBN: 978-80-247-2299-3.
6. MURPHY, Kenneth; WEAVER, Casey. *Janeway's Immunobiology*. USA: Garland Science, 2017. ISBN: 978-0-8153-4505-3.
7. CHAPMAN, Joseph; ZHANG, Yaoping. *Histology, Hematopoiesis*. In: StatPearls [online]. January 2023 [cit. 16. 2. 2023]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534246/>.
8. CIESLA, Betty. *Hematology in Practice*. USA: F. A. Davis Company, 2007. ISBN: 978-0-8036-1526-7.
9. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba*. Český Těšín: FINIDR, 2002. ISBN: 80-86682-01-3.
10. RASHIDI, Hooman H.; NGUYEN, John C. *Hematology Outlines* [online]. ©2012 [cit. 3. 5. 2023]. Dostupné z: <http://www.hematologyoutlines.com>.
11. HOŘEJŠÍ, Václav; BARTUŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie*. 3. vydání. Praha: Triton, 2005. ISBN: 80-7254-686-4.
12. MALE, David; BROSTOFF, Jonathan; ROTH, David B.; ROITT, Ivan. *Immunology*. Eight Edition. USA: Elsevier/Saunders, 2013. ISBN: 978-0-702-04548-6.
13. LOTZE, Michael T.; THOMSON, Angus W. *Natural Killer Cells: Basic Science and Clinical Application*. 1st edition. USA: Elsevier/Academic Press, 2010. ISBN: 978-0-12-370454-2.
14. ENNA, S. J.; BYLUND, David B. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Netherlands: Elsevier, 2008. ISBN: 978-0-08-055232-3.

15. SREEDHARANUNNI, Sreejesh; KUMAR, Narender; PRAKASH, Gaurav. Basophilia and megakaryoblastic differentiation in a case of acute myeloid leukemia: An unusual morphological combination. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. 2016, vol. 9, no. 1, s. 30–33. doi: 10.1016/j.hemonc.2015.06.003.
16. DIXON-ZEGEYE, Miriam; RUTHERFORD, Andrew. Infections in systemic autoimmune diseases. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*. 2020, vol. 16, s. 143–166. doi: 10.1016/B978-0-444-64217-2.00007-5.
17. ZINI, Gina. Abnormalities in leukocyte morphology and number. *Blood and Bone Marrow Pathology*. 2011, vol. 16, s. 247–261. doi: 10.1016/B978-0-7020-3147-2.00016-X.
18. BERTINO, Joseph R. *Encyclopedia of Cancer*. Second Edition. USA: Elsevier/Academic Press, 2002. ISBN: 978-0-12-227555-5.
19. ADAM, Zdeněk; KREJČÍ, Marta; VORLÍČEK, Jiří a kolektiv. *Hematologie: Přehled maligních hematologických nemocí*. 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Praha: Grada, 2008. ISBN: 978-80-247-2502-4.
20. GUNDERSON, Leonard L.; TEPPER, Joel E. *Clinical Radiation Oncology*. Fourth Edition. Netherlands: Elsevier, 2016. ISBN: 978-0-323-24098-7.
21. KAČÍRKOVÁ, Petra; CAMPR, Vít. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. Praha: Grada, 2007. ISBN: 978-80-247-1853-8.
22. MOREAU, Elisabeth J.; MATUTES, Estella; A'HERN, Roger P. et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American Journal of Clinical Pathology*. 1997, vol. 108, no. 4, s. 378–382. doi: 10.1093/ajcp/108.4.378.
23. RAWSTRON, Andy; KREUZER, Karl-Anton; SOOSAPILLA, Asha et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2017, vol. 94, no. 1, s. 121–128. doi: 10.1002/cyto.b.21595.
24. HALLEK, Michael; CHESON, Bruce D.; CATOVSKY, Daniel et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018, vol. 131, no. 25, s. 2745–2760. doi: 10.1182/blood-2017-09-806398.

25. O'CONNELL, Theodore X.; HORITA, Timothy J.; KASRAVI, Barsam. Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. *American Family Physician*. 2005, vol. 71, no. 1, s. 105–112. ISSN: 0002-838X.
26. BIANCHI, Giada; MUNSHI, Nikhil C. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015, vol. 125, no. 20, s. 3049–3058. doi: 10.1182/blood-2014-11-568881.
27. CARRERAS, Enric; DUFOUR, Carlo; MOHTY, Mohamad; KRÖGER, Nicolaus. *THE EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th edition. Germany: Springer, 2019. ISBN: 978-3-030-02277-8.
28. MALÚŠKOVÁ, D.; SVOBODOVÁ, I.; KUČEROVÁ, M. et al. Epidemiologie mnohočetného myelomu v České republice. *Klinická onkologie*. 2017, roč. 30, č. 2, s. 35–42. doi: 10.14735/amko20172S35.
29. SHAUGHNESSY, John; JACOBSON, Joth; SAWYER, Jeff et al. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood*. 2003, vol. 101, no. 10, s. 3849–3856. doi: 10.1182/blood-2002-09-2873.
30. BERGSAGEL, Daniel E.; WONG, Otto; BERGSAGEL, P. Leif, et al. Benzene and Multiple Myeloma: Appraisal of the Scientific Evidence. *Blood*. 1999, vol. 94, no. 4, s. 1174–1182. doi: 10.1182/blood.V94.4.1174.
31. HILLMAN, Robert S.; AULT, Kenneth A.; LEPORRIER, Michael; RINDER, Henry M. *Hematology in Clinical Practice*. Fifth Edition. USA: McGraw-Hill/Medical, 2010. ISBN: 978-0-07-176653-1.
32. ZDENĚK, Adam; VORLÍČEK, Jiří; VANÍČEK, Jiří a kolektiv. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Druhé, aktualizované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2004. ISBN: 80-247-0896-5.
33. NIEDERHUBER, John E.; ARMITAGE, James O. at al. *Abeloff's Clinical Oncology*. USA: Elsevier/Saunders, 2014. ISBN: 978-1-4557-2865-7.
34. SZELIGOVÁ, Lenka; PLONKOVÁ, Hana; JELÍNEK, Tomáš; HÁJEK, Roman. Mnohočetný myelom a diferenciální diagnostika bolestí páteře. *Onkologie*. 2017, roč. 11, č. 6, s. 300–305. doi: 10.36290/xon.2017.055.
35. GREIPP, Philip R.; MIGUEL, Jesus San; DURIE, Brian G. M. et al. International Staging System for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2005, vol. 23, no. 15, s. 3412–3420. doi: 10.1200/JCO.2005.04.242.

36. KYLE, R.; RAJKUMAR, S. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009, vol. 23, s. 3–9. doi: 10.1038/leu.2008.291.
37. RAJKUMAR, S. Vincent; DIMOPOULOS, Meletios A.; PALUMBO, Antonio et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncology*. 2014, vol. 15, no. 12, s. 538–548. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
38. HÁJEK, Roman et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes*. 2018, roč. 24, č. Supplementum1. ISSN: 1213-5763.
39. AITCHISON, R.; REILLY, I.; MORGAN, A. et al. Vincristine, adriamycin and high dose steroids in myeloma complicated by renal failure. *British Journal of Cancer*. 1990, vol. 61, no. 5, s. 765–766. doi: 10.1038/bjc.1990.171.
40. The Myeloma Trialists' Collaborative Group. Interferon as therapy for multiple myeloma: an individual patient data overview of 24 randomized trials and 4012 patients. *British Journal of Haematology*. 2002, vol. 113, no. 4, s. 1020–1034. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02857.x.
41. Státní ústav pro kontrolu léčiv. *Přehled léčiv* [online databáze]. Poslední změna 2. 5. 2023. [Cit. 4. 5. 2023]. Dostupné z: [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/).
42. WUSTROW, David; ZHOU, Han-Jie; ROLFE, Mark. Inhibition of Ubiquitin Proteasome System Enzymes for Anticancer Therapy. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2013, vol. 48, no. 14, s. 205–225. doi: 10.1016/B978-0-12-417150-3.00014-4.
43. WEXLER, Philip. *Encyclopedia of Toxicology*. Third Edition. USA: Elsevier/Academic Press, 2014. ISBN: 978-0-12-386455-0.
44. GUPTA, Ramesh. *Reproductive and Developmental Toxicology*. Third Edition. USA: Elsevier/Academic Press, 2022. ISBN: 978-0-323-89773-0.
45. WALDMAN, Scott A.; TERZIC, Andre et al. *Pharmacology and Therapeutics: Principles to Practice*. USA: Elsevier/Saunders, 2008. ISBN: 978-1-4160-3291-5.
46. BLADÉ, J.; ESTEVE, J. Viewpoint on the impact of interferon in the treatment of multiple myeloma: benefit for a small proportion of patients? *Medical Oncology*. 2000, vol. 17, no. 2, s. 77–84. doi: 10.1007/BF02796202.
47. FERENČÍK, Miroslav; ROVENSKÝ, Jozef; SHOENFELD, Yehuda; MARŤHA, Vladimír. *Imunitní systém: Informace pro každého*. Praha: Grada, 2005. ISBN: 80-247-1196-6.

48. JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada, 2014. ISBN: 978-80-247-4822-1.
49. HOŘEJŠÍ, Václav. Protinádorové zbraně imunitního systému. *Klinická Onkologie*. 2015, roč. 28, č. Supplementum4, s. 15–22. doi: 10.14735/amko20154S15.
50. KLENER, Pavel; OTAHAL, Pavel; LATECKOVA, Lucie. Immunotherapy Approaches in Cancer Treatment. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2015, vol. 16, no. 9, s. 771–781. doi: 10.2174/1389201016666150619114554.
51. CHANMEE, Threerawut; ONTONG, Pawared; KONNA, Kenjiro; ITANO, Naoki. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers*. 2014, vol. 6, no. 3, 1670–1690. doi: 10.3390/cancers6031670.
52. WANG, Wei; ERBE, Amy K.; HANK, Jacquelyn A. et al. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2015, vol. 6, no. 368, . doi: 10.3389/fimmu.2015.00368.
53. BioRender [online]. BioRender: ©2023 [cit. 2. 5. 2023]. Dostupné z: <https://app.biorender.com>.
54. VINAY, Dass S.; RYAN, Elizabeth P.; PAWELEC, Graham et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*. 2015, vol. 35, no. Supplement, s. S185–S198. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004.
55. INGERSOLL, M. A.; ALBERT, M. L. From infection to immunotherapy: host immune responses to bacteria at the bladder mucosa. *Mucosal immunology*. 2013, vol. 6., no. 6, s. 1041–1053. doi: 10.1038/mi.2013.72.
56. FORD, Catriona A.; PETROVA, Sofia; POUND, John D. et al. Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma. *Current Biology*. 2015, vol. 2, no. 5, s. 577–588. doi: 10.1016/j.cub.2014.12.059.
57. KLENER, Pavel; KLENER jr, Pavel. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada, 2009. ISBN: 978-80-247-2808-7.
58. JELÍNEK, T.; VŠIANSKÁ, P.; HÁJEK, R. Monoklonální protilátky v léčbě mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes*. 2015, roč. 21, č. 2, s. 74–83. ISSN: 1213-5763.
59. ŠTORK, Martin. Monoklonální protilátky v léčbě relabovaného či refrakterního mnohočetného myelomu. *Onkologická revue*. 2018, roč. 2. ISSN: 2464-7195.
60. WANG, Yucai; SANCHEZ, Larysa; SIEGEL, David S.; WANG, Michael L. Elotuzumab for the treatment of multiple myeloma. *Journal of Hematology & Oncology*. 2016, vol. 9, no. 55. doi: 10.1186/s13045-016-0284-z.

61. ŠPÍŠEK, Radek; PODRAZIL, Michal; BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. Imunoterapie v léčbě nádorových onemocnění. *Remedia*. 2015, roč. 25, č. 1, s. 34–38. ISSN: 0862-8947.
62. SHAH, Nina; CHARI, Ajai; SCOTT, Emma et al. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*. 2020, vol. 34, s. 985–1005. doi: 10.1038/s41375-020-0734-z.
63. DOTTI, Gianpietro; GOTTSCHALK, Stephen; SAVOLDO, Barbara; BRENNER, Malcolm K. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological Reviews*. 2014, vol. 257, no. 1, s. 107–126. doi: 10.1111/imr.12131.
64. MIKKILINENI, Lekha; KOCHENDERFER, James N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood*. 2017, vol. 130, no. 24, s. 2594–2602. doi: 10.1182/blood-2017-06-793869.
65. ORMHØJ, Maria; BEDOYA, Felipe; FRIGAULT, Matthew J.; MAUS, Marcela V. CARs in the Lead Against Multiple Myeloma. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2017, vol. 12, no. 2, s. 119–125. doi: 10.1007/s11899-017-0373-2.
66. MELERO, Ignacio; GAUDERNACK, Gustav; GERRISTEN, Winald et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nature Reviews: Clinical Oncology*. 2014, vol. 11, no. 9, s. 509–524. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.111.
67. MELICHAR, B.; SPISAROVÁ, M. Kombinované režimy v imunoterapii. *Klinická Onkologie*. 2017, roč. 30, č. Supplementum3, s. 45–49. doi: 10.14735/amko20173S45.
68. HODI, F. Stephen; O'DAY, Steven J.; MCDERMOTT, David F. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2010, vol. 363, no. 8, s. 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
69. ROBERT, Caroline; SCHACHTER, Jacob; LONG, Georgina V. et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2015, vol. 372, no. 26, s. 2521–2532. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.
70. LU, Ligong; ZHAN, Meixiao; LI, Xian-Yang. Clinically approved combination immunotherapy: Current status, limitations, and future perspective. *Current Research in Immunology*. 2022, vol. 3, s. 118–127. doi: 10.1016/j.crimmu.2022.05.003.
71. SHURIN, Michael R. Dual role of immunomodulation by anticancer chemotherapy. *Nature Medicine*. 2013, vol. 19, no. 1, s. 20–22. doi: 10.1038/nm.3045.

72. PELLOM Jr, Samuel Troy; DUDIMAH, Duafalia Fred; THOUNAOJAM, Menaka Chanu et al. Modulatory effects of bortezomib on host immune cell functions. *Immunotherapy*. 2015, vol. 7, no. 9, s. 1011–1022. doi: 10.2217/imt.15.66.
73. SHI, Jumei; TRICOT, Guido T.; GARG, Tarun K. et al. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood*. 2008, vol. 111, no. 3, s. 1309–1317. doi: 10.1182/blood-2007-03-078535.
74. NIU, Chao; JIN, Haofan; LI, Min et al. Low-dose bortezomib increases the expression of NKG2D and DNAM-1 ligands and enhances induced NK and  $\gamma\delta$  T cell-mediated lysis in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2017, vol. 8, no. 4, s. 5954–5964. doi: 10.18632/oncotarget.13979.
75. DAI, Yanling; XIAOMIN, Guo; YANG, Chunyan. Effect of bortezomib on proliferation and apoptosis of myeloma cells by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncology Letters*. 2020, vol. 20, no. 2, s. 1295–1299. doi: 10.3892/ol.2020.11678.
76. WANG, Qingqing; DONG, Zhigao; SU, Junnan et al. Ixazomib inhibits myeloma cell proliferation by targeting UBE2K. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021, vol. 549, s. 1–7.
77. CHAUHAN, Dharminder; TIAN, Ze; ZHOU, Bin et al. In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clinical Cancer Research*. 2017, vol. 17, no. 16, s. 5311–5321. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0476.
78. HE, Shaolong; TIAN, Weiwei; ZHAO, Jie et al. Carfilzomib inhibits the proliferation and apoptosis of multiple myeloma cells by inhibiting STAT1/COX-2/iNOS signaling pathway. *Translation Cancer Research*. 2022, vol. 11, no. 1, s. 206–216. doi: 10.21037/tcr-21-2534.
79. GAO, Lu; GAO, Minjie; YANG, Guang et al. Synergistic Activity of Carfilzomib and Panobinostat in Multiple Myeloma Cells via Modulation of ROS Generation and ERK1/2. *BioMed Research International*. 2015, vol. 2015, no. 459052. doi: 10.1155/2015/459052.
80. KUHN, Deborah J.; CHEN, Qing; VOORHEES, Peter M. et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2007, col. 110, no. 9, s. 3281–3290. doi: 10.1182/blood-2007-01-065888.



81. SHABANEH, Tamer B.; DOWNEY, Sondra L.; GODDARD, Ayrton L. et al. Molecular basis of differential sensitivity of myeloma cells to clinically relevant bolus treatment with bortezomib. *PloS one*. 2013, vol. 8, no. 2. doi: 10.1371/journal.pone.0056132.
82. ARMEANU, Sorin; KRUSCH, Matthias; BALTZ, Katrin M. et al. Direct and Natural Killer Cell-Mediated Antitumor Effects of Low-Dose Bortezomib in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2008, vol. 14, no. 11, s. 3520–3528. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4744.
83. BLANCO, Belén; SÁNCHEZ-ABARCA, Luis Ignacio; CABALLERO-VELÁZQUEZ, Teresa et al. Depletion of alloreactive T-cells in vitro using the proteasome inhibitor bortezomib preserves the immune response against pathogens. *Leukemia Research*. 2011, vol. 35, no. 10, s. 1412–1415. doi: 10.1016/j.leukres.2011.05.018.
84. XING, Samantha; FERRARI de ANDRADE, Lucas. NKG2D and MICA/B shedding: a 'tag game' between NK cells and malignant cells. *Clinical & Translational Immunology*. 2020, vol. 9, no. 12. doi: 10.1002/cti2.1230.

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha A: Mapa 96-jamkové destičky pro qPCR analýzu

## PŘÍLOHA A: Mapa 96-jamkové destičky pro qPCR analýzu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>MICA</b> B24 R1-1	<b>MICA</b> B24 R1-1	<b>MICA</b> B24 R1-2,5	<b>MICA</b> B24 R1-2,5	<b>MICA</b> B24 R1-5	<b>MICA</b> B24 R1-5	<b>MICA</b> B24 R1-10	<b>MICA</b> B24 R1-10	<b>MICA</b> B24 R1-20	<b>MICA</b> B24 R1-20	<b>MICA</b> B24 R1-0	<b>MICA</b> B24 R1-0
<b>B</b>	<b>MICB</b> B24 R1-1	<b>MICB</b> B24 R1-1	<b>MICB</b> B24 R1-2,5	<b>MICB</b> B24 R1-2,5	<b>MICB</b> B24 R1-5	<b>MICB</b> B24 R1-5	<b>MICB</b> B24 R1-10	<b>MICB</b> B24 R1-10	<b>MICB</b> B24 R1-20	<b>MICB</b> B24 R1-20	<b>MICB</b> B24 R1-0	<b>MICB</b> B24 R1-0
<b>C</b>	<b>18S</b> B24 R1-1	<b>18S</b> B24 R1-1	<b>18S</b> B24 R1-2,5	<b>18S</b> B24 R1-2,5	<b>18S</b> B24 R1-5	<b>18S</b> B24 R1-5	<b>18S</b> B24 R1-10	<b>18S</b> B24 R1-10	<b>18S</b> B24 R1-20	<b>18S</b> B24 R1-20	<b>18S</b> B24 R1-0	<b>18S</b> B24 R1-0
<b>D</b>	<b>B2M</b> B24 R1-1	<b>B2M</b> B24 R1-1	<b>B2M</b> B24 R1-2,5	<b>B2M</b> B24 R1-2,5	<b>B2M</b> B24 R1-5	<b>B2M</b> B24 R1-5	<b>B2M</b> B24 R1-10	<b>B2M</b> B24 R1-10	<b>B2M</b> B24 R1-20	<b>B2M</b> B24 R1-20	<b>B2M</b> B24 R1-0	<b>B2M</b> B24 R1-0
<b>E</b>	<b>MICA</b> B48 R1-1	<b>MICA</b> B48 R1-1	<b>MICA</b> B48 R1-2,5	<b>MICA</b> B48 R1-2,5	<b>MICA</b> B48 R1-5	<b>MICA</b> B48 R1-5	<b>MICA</b> B48 R1-10	<b>MICA</b> B48 R1-10	<b>MICA</b> B48 R1-20	<b>MICA</b> B48 R1-20	<b>MICA</b> B48 R1-0	<b>MICA</b> B48 R1-0
<b>F</b>	<b>MICB</b> B48 R1-1	<b>MICB</b> B48 R1-1	<b>MICB</b> B48 R1-2,5	<b>MICB</b> B48 R1-2,5	<b>MICB</b> B48 R1-5	<b>MICB</b> B48 R1-5	<b>MICB</b> B48 R1-10	<b>MICB</b> B48 R1-10	<b>MICB</b> B48 R1-20	<b>MICB</b> B48 R1-20	<b>MICB</b> B48 R1-0	<b>MICB</b> B48 R1-0
<b>G</b>	<b>18S</b> B48 R1-1	<b>18S</b> B48 R1-1	<b>18S</b> B48 R1-2,5	<b>18S</b> B48 R1-2,5	<b>18S</b> B48 R1-5	<b>18S</b> B48 R1-5	<b>18S</b> B48 R1-10	<b>18S</b> B48 R1-10	<b>18S</b> B48 R1-20	<b>18S</b> B48 R1-20	<b>18S</b> B48 R1-0	<b>18S</b> B48 R1-0
<b>H</b>	<b>B2M</b> B48 R1-1	<b>B2M</b> B48 R1-1	<b>B2M</b> B48 R1-2,5	<b>B2M</b> B48 R1-2,5	<b>B2M</b> B48 R1-5	<b>B2M</b> B48 R1-5	<b>B2M</b> B48 R1-10	<b>B2M</b> B48 R1-10	<b>B2M</b> B48 R1-20	<b>B2M</b> B48 R1-20	<b>B2M</b> B48 R1-0	<b>B2M</b> B48 R1-0