

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Kateřina Mlatečková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

Monitoring výskytu anti-ENO1 protilátek v séru pacientů
s mnohočetným myelomem

Diplomová práce

2024

Bc. Kateřina Mlatečková

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Mlatečková**
Osobní číslo: **C22375**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Monitoring výskytu anti-ENO1protilátek v séru pacientů s mnohočetným myelomem**
Téma práce anglicky: **Monitoring of Specific Anti-ENO1 Antibodies in the Sera of Patients with Multiple Myeloma**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Patogeneze vzniku nádorové buňky, základní klasifikace hematolymfoidních a solidních nádorů.
2. Patogeneze vzniku, genetický základ vzniku myelomových buněk, klinické příznaky onemocnění, diagnostika, terapie nádorového onemocnění Mnohočetný myelom.
3. Zhodnoťte prognostický potenciál ENO1 (anti-ENO1 IgG protilátek) u hematolymfoidních i solidních nádorů.
4. Zaměřte se na popis a zhodnocení vědeckých výsledků dosažených v posledních 10 – 15 letech.

Experimentální část:

1. Optimalizace podmínek Western-blot metody s využitím zařízení TurboBlot.
2. Normalizace metody 2D-WB s imunochemickou detekcí pro průkaz anti-ENO1 protilátek IgG pomocí vnitřního standardu beta-aktinu.
3. Použití optimalizovaného postupu 2D-WB s imunochemickou detekcí (SERPA) pro průkaz a monitoring výskytu specifických anti-ENO1 IgG molekul v lidském séru.
4. Proměření vzorků sér pacientů/zdravých jedinců s cílem vyhodnotit klinickou významnost výskytu těchto protilátek v séru léčených pacientů v době diagnózy a v průběhu onemocnění.
5. K vyhodnocení výsledků a jejich statistické významnosti použijte vhodné bioinformatické nástroje.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

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

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Monitoring výskytu anti-ENO1 protilátek v séru pacientů s mnohočetným myelomem 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 30. 4. 2024

Bc. Kateřina Mlatečková v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce, paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté materiály k tématu, a především za čas, který této práci věnovala. Ráda bych poděkovala také paní doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D., panu Mgr. Ondřejovi Morávkovi a paní Janě Kňavové za pomoci v rámci experimentální části. Děkuji také Fakultní nemocnici v Ostravě za poskytnutí sér pacientů s mnohočetným myelomem. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své kolegyni Bc. Haně Kozákové za spolupráci v práci celé experimentální práce, hlavně za její ochotu, věnovaný čas a nespočet užitečných rad. Poděkování patří také mým přátelům a rodině, především za jejich trpělivost, stálou podporu a pomoc po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se věnuje významu autoprotilátek namířených proti enzymu enoláza 1, které se vyskytují u pacientů s mnohočetným myelomem. Teoretická část zahrnuje kapitulu o příčinách vzniku nádorových buněk, informace o mnohočetném myelomu, včetně diagnostických metod a terapie, a také informace o biomarkerech nádorových onemocnění a jejich významu pro diagnostiku a monitorování průběhu onemocnění. Experimentální část zahrnuje optimalizaci metody Western Blot a sérologickou proteomovou analýzu použitou k imunoproteomickému profilování vzorků sér zdravých dárců a pacientů s mnohočetným myelomem s cílem zjištění četnosti výskytu autoprotilátek proti enzymu enoláza 1. Součástí experimentální práce je také ověření postupu normalizace metody pro průkaz autoprotilátek pomocí vnitřního standardu a statistické vyhodnocení výsledků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mnohočetný myelom, enoláza 1, autoimunita, autoprotilátky, sérologická proteomová analýza

TITLE

Monitoring of specific anti-ENO1 antibodies in the sera of patients with multiple myeloma

ANNOTATION

This diploma thesis focuses on the importance of autoantibodies directed against the enzyme enolase 1 occurring in patients with multiple myeloma. The theoretical part includes chapter about the causes of cancer cells origin, information about multiple myeloma, including diagnostic methods and therapy and information about cancer biomarkers and their importance for diagnosis and monitoring of the disease. The experimental part includes the optimization of the Western Blot method and the serological proteomic analysis used for immunoproteomic profiling of serum samples from healthy donors and multiple myeloma patients to determine the frequency of autoantibodies to the enzyme enolase 1. The experimental part also includes the validation of the normalization procedure for the detection of autoantibodies using an internal standard and statistical evaluation of the results.

KEYWORDS

Multiple myeloma, enolase 1, autoimmunity, autoantibodies, serological proteome analysis

OBSAH

| | |
|--|----|
| SEZNAM OBRÁZKŮ | 12 |
| SEZNAM TABULEK | 15 |
| SEZNAM PŘÍLOH..... | 17 |
| SEZNAM ROVNIC..... | 17 |
| SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK | 18 |
| ÚVOD..... | 24 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST..... | 26 |
| 1.1 Nádorové buňky | 26 |
| 1.1.1 Příčiny vzniku nádorových buněk | 27 |
| 1.1.2 Základní rozdělení hematolymfoidních a solidních nádorů | 34 |
| 1.2 Mnohočetný myelom | 38 |
| 1.2.1 Patogeneze vzniku onemocnění..... | 39 |
| 1.2.2 Myelomové buňky | 42 |
| 1.2.3 Klinické příznaky mnohočetného myelomu | 44 |
| 1.2.4 Diagnostika mnohočetného myelomu | 47 |
| 1.2.5 Terapie mnohočetného myelomu..... | 55 |
| 1.3 Biomarkery nádorových onemocnění a jejich význam v diagnostice, prognóze a sledování účinků terapie onemocnění | 62 |
| 1.3.1. Enzym enoláza 1 | 63 |
| 1.3.2. Autoprotilátky proti enoláze 1 | 67 |
| 2 CÍLE PRÁCE | 72 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 73 |
| 3.1 | Seznam laboratorního vybavení | 73 |
| 3.2 | Seznam chemikálií | 75 |
| 3.3 | Seznam biologického materiálu | 78 |
| 3.3.1 | Biologicky aktivní látky | 78 |
| 3.3.2 | Nádorové buněčné linie | 78 |
| 3.3.3 | Vzorky patientských sér | 78 |
| 3.4 | Sérologická proteomová analýza (SERPA) | 80 |
| 3.4.1 | Příprava suché pelety buněk | 80 |
| 3.4.2 | Příprava buněčného lyzátu | 81 |
| 3.4.3 | Rehydratace gelových proužků | 82 |
| 3.4.4 | Izoelektrická fokuzace (IEF) | 83 |
| 3.4.5 | Gelová elektroforéza | 84 |
| 3.4.6 | Semi-dry Western Blot | 88 |
| 3.4.7 | Barvení proteinů na nitrocelulózkové membráně | 89 |
| 3.4.8 | Barvení proteinů na gelu | 90 |
| 3.4.9 | Imunochemická detekce a vizualizace reaktivních proteinových skvrn | 92 |
| 3.5 | Statistické vyhodnocení výsledků | 93 |
| 4 | VÝSLEDKY | 94 |
| 4.1 | Optimalizace podmínek Western-Blot metody s využitím zařízení Trans-Blot Turbo | 94 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1.1 | Porovnání účinnosti přenosu při použití komerčního a vlastního transferového pufru | 97 |
| 4.2 | Ověření postupu normalizace metody SERPA pomocí vnitřního standardu β -aktinu... .. | 99 |
| 4.2.1 | SDS-PAGE – kontrola komerčního standardu β -aktinu | 99 |
| 4.2.2 | SDS-PAGE, Western-Blot (WB) a imunochemická detekce β -aktinu..... | 101 |
| 4.3 | Analýza sér zdravých dárců metodou SERPA..... | 105 |
| 4.3.1 | Metoda SERPA s SDS-PAGE – optimalizace podmínek analýzy vzorků sér zdravých dárců | 105 |
| 4.3.2 | Analýza vzorků sér zdravých dárců metodou SERPA | 108 |
| 4.4 | Analýza sér pacientů s mnohočetným myelomem metodou SERPA | 111 |
| 4.4.1 | Analýza kontrolních vzorků metodou SERPA | 111 |
| 4.4.2 | Analýza vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem metodou SERPA... .. | 112 |
| 4.5 | Statistické vyhodnocení výsledků | 126 |
| 5 | DISKUZE..... | 128 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 134 |
| 7 | POUŽITÁ LITERATURA..... | 136 |
| | PŘÍLOHY | 156 |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Základní změny, ke kterým dochází v důsledku maligní transformace u nádorových buněk..... | 28 |
| Obrázek 2: Důsledky působení onkoproteinů E6 a E7 | 30 |
| Obrázek 3: Přidané změny, ke kterým dochází v důsledku maligní transformace u nádorových buněk (nahore) a příčiny transformace v nádorové buňky | 33 |
| Obrázek 4: Základní klasifikace hematolymfoidních nádorů dle pátého vydání modré knihy Světové zdravotnické organizace..... | 35 |
| Obrázek 5: Vývoj monoklonálních gamapatií | 42 |
| Obrázek 6: Tkáň infiltrovaná různými typy myelomových buněk | 43 |
| Obrázek 7: Charakteristické struktury v myelomových buňkách označené šipkami | 44 |
| Obrázek 8: Nejčastější klinické projevy pacientů s mnohočetným myelomem | 45 |
| Obrázek 9: Porovnání rozdělení frakcí sérových bílkovin u zdravého dárce (vlevo) a u pacienta s MM (vpravo) doplněné o relativní hodnoty jednotlivých frakcí vztažené k celkové bílkovině | 49 |
| Obrázek 10: Imunofixace séra s přítomným monoklonálním imunoglobulinem IgG λ | 50 |
| Obrázek 11: Lytické léze v levé stydké kosti (šipka) na části (A) získané z CT, negativní léze ve stejné oblasti na části (B) získané z rentgenu u stejného pacienta..... | 53 |
| Obrázek 12: Revidovaná diagnostická kritéria mnohočetného myelomu dle International Myeloma Working Group (2014) | 55 |
| Obrázek 13: Proces autologní transplantace | 57 |
| Obrázek 14: Proces CAR-T buněčné terapie. | 59 |

| | |
|--|-----|
| Obrázek 15: Kontrola přenosu proteinů z gelů na membrány (NCM) při programu MIXED MW | 95 |
| Obrázek 16: Kontrola přenosu proteinů z gelů na membrány (NCM) při programu HIGH MW. | 96 |
| Obrázek 17: Kontrola přenosu proteinů z gelu na membránu (NCM) při době přenosu 10 minut. | 97 |
| Obrázek 18: Kontrola přenosu proteinů z gelu na membránu (NCM) při době přenosu 20 minut. | 97 |
| Obrázek 19: Kontrola přenosů proteinů z gelů na membrány (NCM) při použití rozdílných pufrů..... | 98 |
| Obrázek 20: Gel po separaci β -aktinu (BA) metodou SDS-PAGE obarvený roztokem dusičnanu stříbrného. | 100 |
| Obrázek 21: Kontrola přenosu proteinů z gelů na nitrocelulózkové membrány (NCM). | 102 |
| Obrázek 22: Snímky nitrocelulózkových membrán (NCM) po SDS-PAGE, WB a imunochemické detekci za různých podmínek ředění primární protilátky (pAb) a konjugátu (sAb). | 104 |
| Obrázek 23: Kontrola přenosů proteinů z gelu na nitrocelulózkovou membránu (NCM). | 106 |
| Obrázek 24: Snímky nitrocelulózkových membrán (NCM) po imunochemické detekci (SERPA s SDS-PAGE elektroforézou). | 107 |
| Obrázek 25: Snímky nitrocelulózkových membrán (NCM) po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou). | 109 |
| Obrázek 26: Snímky nitrocelulózkových membrán (NCM) po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou). | 112 |
| Obrázek 27: Kontrola přenosů proteinů z gelu na nitrocelulózkovou membránu (NCM). | 113 |

| | |
|---|-----|
| Obrázek 28: Snímky nitrocelulózových membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 1)..... | 115 |
| Obrázek 29: Snímky nitrocelulózových membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 3)..... | 116 |
| Obrázek 30: Snímky nitrocelulózových membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 4)..... | 118 |
| Obrázek 31: Snímky nitrocelulózových membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 7)..... | 121 |
| Obrázek 32: Snímky nitrocelulózových membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 8)..... | 123 |
| Obrázek 33: Snímky nitrocelulózových membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 9)..... | 125 |
| Obrázek 34: „ <i>Mosaic plot</i> “ zachycující výskyt anti-ENO1 protilátek u pacientů s mnohočetným myelomem a u zdravých dárců. | 127 |
| Obrázek 35: Přehled imunoreaktivních skvrn v čase u pacientů s mnohočetným myelomem z Fakultní nemocnice Brno. | 164 |
| Obrázek 36: Přehled imunoreaktivních skvrn v čase u pacientů s mnohočetným myelomem z Fakultní nemocnice Ostrava (první část). | 165 |
| Obrázek 37: Přehled imunoreaktivních skvrn v čase u pacientů s mnohočetným myelomem z Fakultní nemocnice Ostrava (druhá část)..... | 166 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|-----|
| Tabulka 1: Základní rozdíly mezi zdravými a nádorovými buňkami..... | 26 |
| Tabulka 2: Tkáně postižené karcinomy a sarkomy | 37 |
| Tabulka 3: Kritéria rozdělující novotvary plazmatických buněk. | 39 |
| Tabulka 4: Nejčastěji stanovované nádorové markery pojící se s danými místy nádorového bujení a odebíraný materiál pro stanovení markerů..... | 62 |
| Tabulka 5: Výskyt ENO1 u jednotlivých typů nádorů a jejich význam jako biomarker nádorového bujení..... | 66 |
| Tabulka 6: Výskyt anti-ENO1 u jednotlivých typů nádorů a jejich význam jako biomarker nádorového bujení..... | 68 |
| Tabulka 7: Příprava roztoků na gely..... | 85 |
| Tabulka 8: Objemy jednotlivých roztoků pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu. | 86 |
| Tabulka 9: Příprava ředící řady β -aktinu. | 100 |
| Tabulka 10: Příprava ředící řady β -aktinu. | 101 |
| Tabulka 11: Příprava primární protilátky a konjugátu a dávkovaný objem roztoků na membránu. | 103 |
| Tabulka 12: Příprava ředící řady buněčného lyzátu. | 105 |
| Tabulka 13: Příprava primární protilátky a konjugátu a dávkovaný objem roztoků na membránu. | 106 |
| Tabulka 14: Molekulové hmotnosti proužků vyznačených na Obrázku 24. | 107 |
| Tabulka 15: Příprava protilátek a dávkovaný objem roztoků na membránu..... | 108 |
| Tabulka 16: Molekulové hmotnosti a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 25. | 109 |

| | |
|---|-----|
| Tabulka 17: Příprava protilátek a dávkovaný objem roztoků na membránu (pozitivní kontrolní vzorek). | 111 |
| Tabulka 18: Příprava protilátek a dávkovaný objem roztoků na membránu (negativní kontrolní vzorek). | 112 |
| Tabulka 19: Příprava protilátek a dávkovaný objem roztoků na membránu. | 113 |
| Tabulka 20: Přehled vzorků sér pacienta č. 1. | 114 |
| Tabulka 21: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 28. | 114 |
| Tabulka 22: Přehled vzorků sér pacienta č. 3. | 116 |
| Tabulka 23: Přehled vzorků sér pacienta č. 4. | 117 |
| Tabulka 24: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 30. | 117 |
| Tabulka 25: Přehled vzorků sér pacienta č. 7. | 119 |
| Tabulka 26: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 31. | 119 |
| Tabulka 27: Přehled vzorků sér pacienta č. 8. | 122 |
| Tabulka 28: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 32. | 122 |
| Tabulka 29: Přehled vzorků sér pacienta č. 9. | 124 |
| Tabulka 30: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 33. | 124 |
| Tabulka 31: Výchozí hodnoty pro statistické vyhodnocení významnosti anti-ENO1 autoprottilátek. | 126 |
| Tabulka 32: Přehled imunoreaktivních skvrn a zhodnocení jejich intenzity u pacientů s mnohočetným myelomem..... | 130 |
| Tabulka 33: Přehled imunoreaktivních skvrn u zdravých dárců. | 167 |

SEZNAM PŘÍLOH

| | |
|---|-----|
| Příloha 1: Rozdělení hematolymfoidních nádorů | 156 |
| Příloha 2: Informovaný souhlas | 161 |
| Příloha 3: Výsledky předchozích analýz | 163 |

SEZNAM ROVNIC

| | |
|---|-----|
| Rovnice 1: Vzorec pro výpočet pravděpodobnosti..... | 126 |
|---|-----|

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

| | |
|-----------|--|
| AFP | α -fetoprotein |
| AML | akutní myeloidní leukémie |
| Anti-ENO1 | protilátky proti enoláze 1 |
| APAF1 | apoptózu aktivující faktor 1 (z angl. „Apoptotic Protease Activating Factor 1“) |
| APS | peroxodisíran amonný |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BA | β -aktin |
| BCMA | antigen zrání B-lymfocytů (z angl. „B-cell Maturation Antigen“) |
| bp | párů bází |
| BSP | bispecifické protilátky |
| CA | nádorový antigen (z angl. „Cancer Antigen“) |
| CAR | chimérický antigenní receptor (z angl. „Chimeric Antigen Receptor“) |
| CDK | cyklin dependentní kinázy |
| CEA | karcino-embryonální antigen |
| CLL | chronická lymfocytární leukémie |

| | |
|--------|---|
| CT | počítačová tomografie (z angl. „Computed Tomography“) |
| CVID | běžná variabilní imunodeficiencie (z angl. „Common Variable Immunodeficiency“) |
| CXCL12 | chemokinový ligand 12 s CXC motivem |
| CYFRA | fragment cytokeratinu 19 |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DTT | dithiothreitol |
| EGF | epidermální růstový faktor (z angl. „Epidermal Growth Factor“) |
| ENO | enoláza |
| FC | průtoková cytometrie (z angl. „Flow Cytometry“) |
| FGF | fibroblastový růstový faktor (z angl. „Fibroblast Growth Factor“) |
| FISH | fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace |
| HER2 | lidský epidermální faktor 2 (z angl. „Human Epidermal Growth Factor 2“) |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat |
| IAA | jodacetamid |
| IEF | izoelektrická fokuzace |

| | |
|----------|---|
| IGF1 | inzulínu podobný rústový faktor 1 (z angl. „Inzulin like Growth Factor 1“) |
| IL | interleukin |
| IMID | imunomodulační látky (z angl. „Immunomodulatory Drugs“) |
| IVIG | intravenózní imunoglobuliny |
| KD | kostní dřeň |
| LDH | laktátdehydrogenáza |
| LMWH | nízkomolekulární heparin (z angl. „Low Molecular Weight Heparin“) |
| MALDI-MS | laserová desorpce/ionizace pomocí laseru za účasti matrice ve spojení s hmotnostní spektrometrií (z angl. „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry“) |
| MAT | makrofágy asociované s tumorem |
| MB | myelomová buňka |
| MBP1 | c-MYC vazebný protein 1 (z angl. „Myc Promoter-Binding Protein-1“) |
| MDN | myelodysplastické novotvary |
| MGUS | monoklonální gamapatie nejasného významu (z angl. „Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance“) |

| | |
|----------|--|
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex (z angl. „Major Histocompatibility Complex“) |
| MM | mnohočetný myelom |
| MR | magnetická rezonance |
| MRD | minimální reziduální choroba (z angl. „Minimal Residual Disease“) |
| NCM | nitrocelulózová membrána |
| NGS | sekvenování nové generace (z angl. „Next Generation Sequencing“) |
| NSCLC | nemalobuněčný karcinom plic (z angl. „Non-Small Cell Lung Cancer“) |
| NTproBNP | N-terminální natriuretický propeptid typu B |
| p53 | tumor supresorový protein p53 |
| pAb | primární protilátka (z angl. „Primary Antibody“) |
| PB | plazmatická buňka |
| PD-1 | protein programované buněčné smrti 1 (z angl. „Programmed Cell Death 1“) |
| PDGF | růstový faktor z krevních destiček (z angl. „Platelet-Derived Growth Factor“) |
| PET | pozitronová emisní tomografie |

| | |
|----------|---|
| pI | izoelektrický bod (z angl. „Isoelectric Point“) |
| PI | proteazomové inhibitory |
| PMSF | fenylmethylsulfonyl fluorid |
| pRb | protein retinoblastomu |
| PSA | prostatický specifický antigen |
| RANK | receptorový aktivátor jaderného faktoru kappa β (z angl. „Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa β “) |
| REAL | revidovaná evropsko-americká klasifikace lymfoidních novotvarů (z angl. „The Revised European American Lymphoma Classification“) |
| RF | růstový faktor |
| sAb | sekundární protilátka (z angl. „Secondary Antibody“) |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného |
| SERPA | sérologická proteomová analýza |
| SLE | systemový lupus erythematoses |
| SMM | doutnající myelom (z angl. „Smoldering Multiple Myeloma“) |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin |

| | |
|---------------|--|
| TGF- α | transformující růstový faktor α (z angl. „Transforming Growth Factor α “) |
| TGF- β | transformující růstový faktor β (z angl. „Transforming Growth Factor β “) |
| TNF- α | tumor nekrotizující faktor α |
| TTX | tandemová transplantace |
| Tx | transplantace |
| VEGF | vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. „Vascular Endothelial Growth Factor“) |
| WB | Western-Blot |
| WBB | modré knihy vydávané WHO (z angl. „WHO Blue Books“) |
| WHO | světová zdravotnická organizace (z angl. „World Health Organization“) |
| ZD | zdravý dárce |

ÚVOD

Nádorová onemocnění se celosvětově řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí v populaci. Každým rokem zemře v důsledku onkologického onemocnění až 10 milionů lidí, nově diagnostikovaných pacientů přibývá ročně až 20 milionů.

Ke vzniku nádorových buněk dochází při narušení buněčného cyklu. Dle svých typických vlastností se nádorové buňky dělí do dvou skupin, benigní a maligní. Maligní buňky jsou schopné proliferace a diferenciaci bez signálů, nejsou citlivé k antiproliferačním signálům, jsou rezistentní k signálům buněčné smrti a imunitnímu systému a disponují neomezeným replikačním potenciálem. Dále jsou schopné také přeprogramovat vlastní metabolismus, indukovat angiogenezi a osidlovat další tkáň metastázemi.

Nádory se dělí do dvou základních skupin, solidní a hematolymfoidní. Hematolymfoidní nádory se nachází v krevním řečišti, solidní nádory v ostatních tkáních a orgánech. Mezi hematolymfoidní nádory patří také mnohočetný myelom. Nádorovou buňkou je v tomto případě klonální plazmatická buňka, která se nekontrolovaně dělí a následně se hromadí v kostní dřeni a produkuje monoklonální imunoglobulin (paraprotein). Jedná se o druhé nejčastější hematolymfoidní onemocnění a tvoří téměř 2 % všech nádorových onemocnění. Více než 90 % případů je nalezeno u pacientů starších 50 let. V České republice je incidence mnohočetného myelomu 2,65 případů na 100 tisíc obyvatel, relativní míra přežití v horizontu 5 let je 58 % [32, 33].

Typickými příznaky mnohočetného myelomu je hyperkalcémie, selhání ledvin, anémie a postižení kostí. Diagnostika se v dnešní době opírá hlavně o laboratorní vyšetření (hematologické, biochemické, cytogenetické, molekulární a imunofenotypizaci) a také o zobrazovací techniky. Při terapii dominují chemoterapeutika a autologní transplantace. Do popředí se ve světě v posledních letech dostávají také bispecifické protilátky a CAR-T-lymfocyty.

Na průběh onemocnění a účinnost léčby má vliv také imunitní systém, který aktivně proti nádorovým buňkám bojuje. V důsledku nádorového bujení lze v těle najít specifické molekuly, tzv. biomarkery, které jsou produkovány přímo nádorovými buňkami, případně organizmem v reakci na probíhající onemocnění. Ideální biomarker lze detekovat již v časně fázi

onemocnění u všech pacientů, je exprimován pouze v konkrétní tkáni, jeho hladiny korelují s progresí onemocnění a odráží odpověď organismu na terapii. Žádný z doposud zvažovaných biomarkerů tohoto onemocnění tyto vlastnosti nesplňuje. Novým biomarkerem, který je spojován (mimo jiné i) s mnohočetným myelomem je enzym enoláza 1, který je nádorovými buňkami exprimován ve zvýšené míře [17]. Pozornost je v poslední době věnována také autoprotilátkám proti enoláze 1, k jejichž produkci dochází po překonání imunitní tolerance. Tyto autoprotilátky jsou již potvrzeným biomarkerem nádorového bujení v některých orgánech (např. v játrech, plicích či slinivce břišní [115, 117, 118, 119, 120, 136, 137, 138]).

Cílem této diplomové práce je vyhodnotit výskyt těchto molekul i u pacientů s mnohočetným myelomem.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Nádorové buňky

Zdravé buňky prochází během svého života několika etapami. Dceřiné buňky vznikají z mateřských procesem buněčného dělení, po rozdělení rostou nově vzniklé buňky do své obvyklé velikosti. Následně se buňky diferencují a přizpůsobují se tak své funkci v organismu. Postupem času se buňky opotřebovávají, stárnou a nakonec odumírají.

V průběhu buněčného cyklu prochází buňky několika fázemi, mezi kterými se nachází kontrolní body. Pro zajištění bezchybného procesu kontrolují body u jednotlivých buněk dokončení procesů, které v dané fázi probíhají. Pokud buňka kontrolními body neprojde, může se buněčný cyklus do doby opravy zastavit. V případě, že je poškození příliš rozsáhlé, následuje programovaná buněčná smrt.

Ke vzniku nádorových buněk dochází při narušení řádného procesu buněčného cyklu. Namísto buněčné smrti ztrácí poškozené nádorové buňky kontrolu nad svou proliferací a diferenciací. Výsledkem je jejich zrychlené dělení a také růst do neobvyklé velikosti.

Nádorové buňky se dle svých vlastností dělí do dvou skupin, benigní a maligní. Základní rozdíly mezi zdravými a nádorovými buňkami jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Základní rozdíly mezi zdravými a nádorovými buňkami (převzato a upraveno dle [1], [2]).

| | Zdravá buňka | Benigní buňka | Maligní buňka |
|-----------------------------------|--|--|--|
| Růst | Kontrolovaný | Nekontrolovaný, pomalý | Nekontrolovaný, rychlý |
| Komunikace mezi buňkami | Reagují na signály | Nereagují na signály | Nereagují na signály |
| Opravy v buňce, smrt buňky | Staré či poškozené buňky jsou opraveny nebo vyměněny za nové | Poškozené buňky nejsou opraveny, staré buňky nejsou odstraněny | Poškozené buňky nejsou opraveny, staré buňky nejsou odstraněny |
| Schopnost migrace | Tkáňová příslušnost zachována | Tkáňová příslušnost zachována | Buňky mohou v rámci organismu migrovat |

| | | | |
|---|---|--|--|
| Vzhled | Uniformní | Různá velikost | Různá velikost |
| Schopnost úniku imunitnímu systému | Poškozené / staré buňky lze najít a odstranit | Schovávají se imunitnímu systému a dále rostou | Schovávají se imunitnímu systému a dále rostou |
| Vaskularizace | V rámci tkáně | Patologická | Patologická |

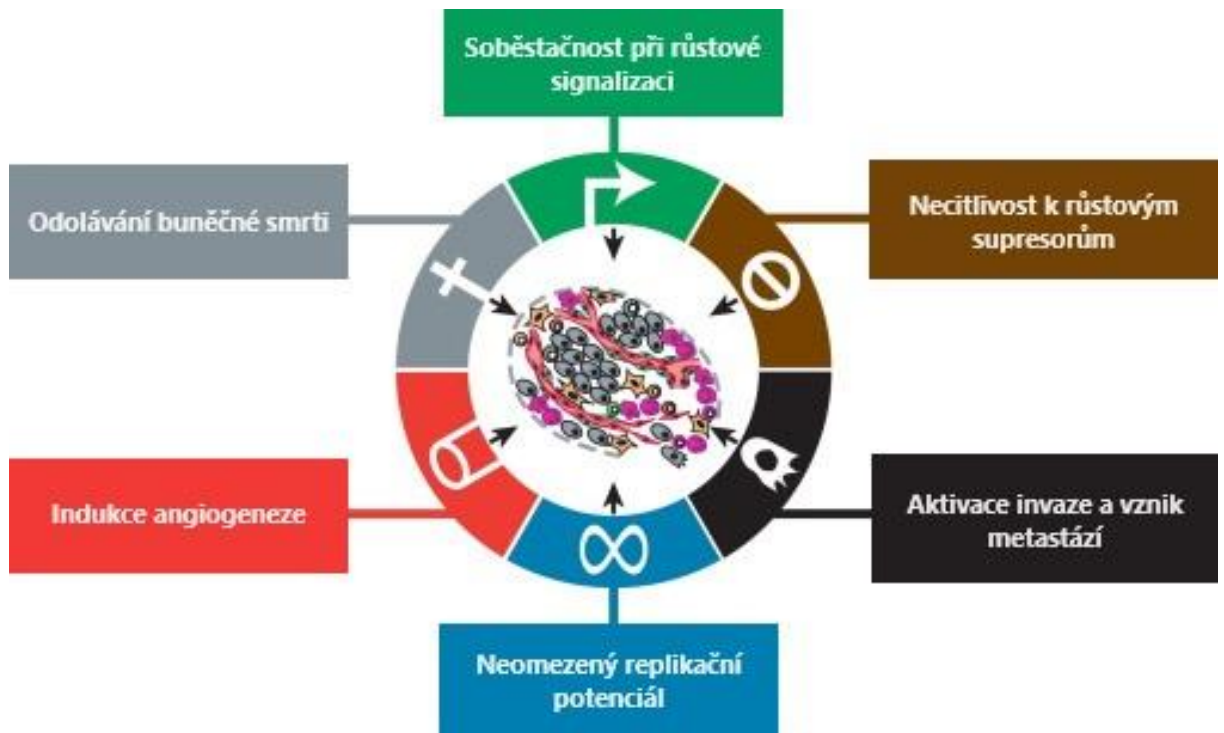
Množení zdravých buněk ustává v momentě, kdy je jejich počet dostatečný pro plnění dané funkce v těle. Množení nádorových buněk se vymyká kontrole a je nezávislé na okolních buňkách. V případě poškození buněk je nejprve snaha organismu tyto buňky opravit, pokud je tento proces neúspěšný, jsou buňkami imunitního systému identifikovány a je u nich indukována apoptóza. Nádorové buňky fungují i v případě poškození a buňkám imunitního systému zvládají unikát, případně jej mohou anergizovat nebo dokonce u nich vyvolat apoptózu.

Zdravé buňky produkují látky, které jim umožňují držet se ve vzájemné blízkosti, zároveň je u nich (stejně jako u benigních buněk) zachována tkáňová příslušnost. Zdravé buňky příslušné tkáni zachovávají uniformní vzhled. Maligní buňky mohou prorůst i do okolní tkáně, případně se od ostatních buněk oddělit a projít do jiných tkání, kde se mohou uchytit a tvořit nová sekundární nádorová ložiska, tzv. metastáze. Vzhled nádorových buněk je velmi různorodý, od zdravých buněk se liší velikostí i tvarem a mají obvykle tmavší a větší jádro. Angiogeneze (růst nových cév) se u zdravých tkání vyskytuje pouze ve fázi růstu a vývoje, případně pokud je nutné danou tkáň opravit. V nádorové tkáni je angiogeneze opětovně iniciována, dochází k postupnému nárůstu hmoty nádorové tkáně a nová vaskularizace zajistí přísun živin a kyslíku všem nově se tvořícím nádorovým buňkám [3]. Následující text pojednává již pouze o maligních buňkách.

1.1.1 Příčiny vzniku nádorových buněk

Nádorové bujení je onemocnění, které je způsobeno dynamickými změnami v genomu. Nestabilní genom způsobuje genetickou diverzitu, která společně se zánětlivým procesem urychluje získání charakteristických vlastností nádorových buněk [4]. Již v počátcích výzkumu nádorových onemocnění byly objeveny mutace, které mají za následek produkci onkogenů (genů, které podporují nádorový proces) se zesílenou funkcí a ztrátou funkce tumor

supresorových genů (genů, které nádorový proces potlačují). V roce 2000 navrhli Hanahan a Weinberg šest zásadních změn, ke kterým v rámci buněčné fyziologie při maligní transformaci dochází (viz Obrázek 1). Každá z těchto vlastností, které byly získány během vývoje nádorové buňky, představuje úspěšné narušení obranných mechanismů organismu.

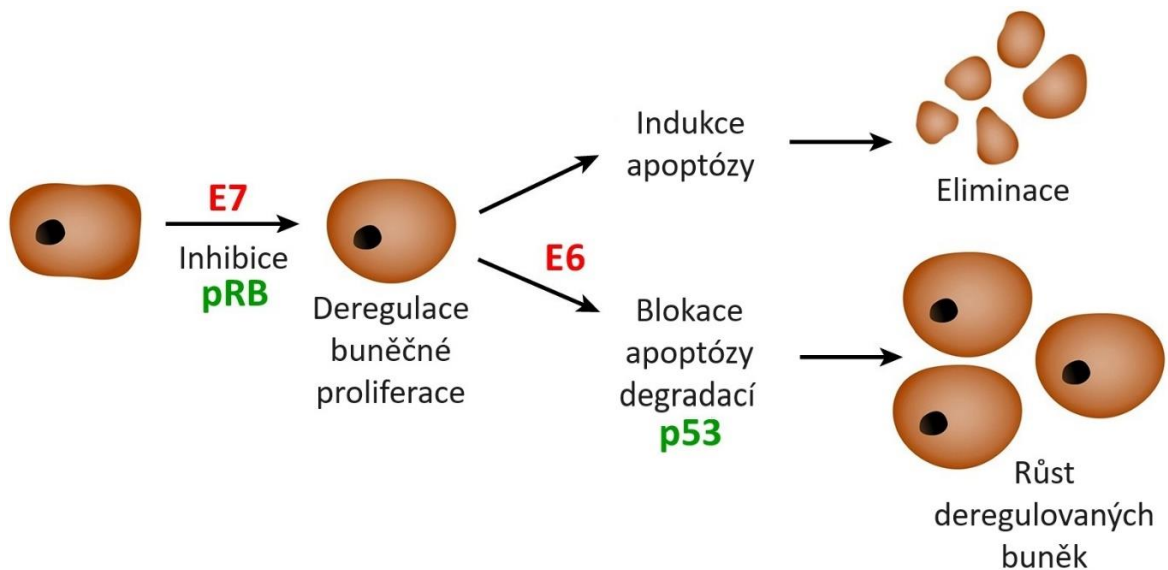


Obrázek 1: Základní změny, ke kterým dochází v důsledku maligní transformace u nádorových buněk (převzato a upraveno dle [5]).

První získanou změnou nádorových buněk je schopnost růstu a proliferace nezávisle na svém okolí a bez růstových signálů. Zdravé buňky vyžadují k přechodu z klidového stavu do aktivního proliferačního růstové signály, které se do buňky přenáší pomocí transmembránových receptorů. Může jít o přenos difuzních růstových faktorů, složek extracelulární matrice či molekul, které slouží k adhezi nebo interakci mezi buňkami. Nádorové buňky vykazují značně sníženou závislost na těchto exogenních růstových signálech a zvládají si vytvořit vlastní růstové signály, čímž narušují nastavenou homeostázu organismu [5]. Příkladem tvorby vlastních růstových faktorů (RF) může být produkce PDGF (RF z krevních destiček) či TGF- α (transformující RF- α) u glioblastomů či sarkomů [6]. Receptory pro RF jsou často exprimovány ve zvýšené míře a stávají se tak nadměrně odpovídajícími i na nižší hladiny okolních RF, které by za normálních podmínek proliferaci nespustily. Příkladem může být zvýšená exprese („upregulace“) receptoru pro EGF (epidermální RF) v nádorových buňkách žaludku, mozku

a prsu či nadměrná exprese HER2 (lidský epidermální receptor 2) u karcinomů žaludku a prsu [5]. Nádorové buňky mohou také upřednostnit expresi receptorů, které slouží právě k přenosu signálu růstu, na úkor jiných receptorů kontrolujících buněčné dělení (tj. CDK – cyklin dependentní kinázy). Stejně tak mohou samy produkovat ligandy pro RF, na které následně reagují pomocí exprese příbuzných receptorů. V neposlední řadě zvládají nádorové buňky přimět okolní zdravé buňky k uvolňování nadměrného množství signálů, které stimulují růst. Ke složitým změnám dochází i v rámci signalizační kaskády uvnitř nádorových buněk. V novějších studiích bylo zjištěno, že nadměrná exprese genů zvyšujících proliferaci může u nádorových buněk vyvolat i opačnou reakci, konkrétně až senescenci či apoptózu [4].

Další získanou změnou nádorových buněk je rezistence na signály, které růst buňky potlačují. Ve zdravé tkáni působí mnoho antiproliferačních signálů, které udržují buněčný klid a homeostázu. Jde např. o solubilní formy růstových inhibitorů, inhibitory lokalizované v extracelulární matrici či inhibitory na povrchu buněk v blízkém okolí buněk nádorových. Pomocí inhibitorů se buňky z aktivního proliferačního stavu dostávají do stavu klidového (dočasného i trvalého) [5]. Na antiproliferační signály zdravé buňky reagují před vstupem do S-fáze buněčného cyklu. Všechny signály jsou vedeny přes protein retinoblastomu (pRb) a jeho dva příbuzné proteiny, p107 a p130 [7]. Pokud je pRb v hypofosforylovaném stavu, blokuje proliferaci změnou funkce transkripčních faktorů E2F, které řídí expresi genů nezbytných pro přechod z G1 fáze do S fáze [8]. Fosforylaci pRb, která by způsobila jeho deaktivaci, brání hlavně TGF- β (transformující RF- β). Nádorové buňky mohou sníženou expresí („*downregulace*“) receptorů pro TGF- β ztratit schopnost na tento faktor reagovat, případně může dojít i k mutaci receptorů, která způsobí jejich dysfunkci [5]. V pozdějším stádiu nádorového bujení je signalizace TGF- β přesměrována z potlačení proliferace na schopnost transformace epitelu na mezenchym [4]. K mutaci může dojít také přímo u pRb, u karcinomu děložního čípku je funkce pRb eliminována působením onkoproteinu E7, který se nachází u vysoce rizikových lidských papilomavirů [5]. Tento protein přenáší signál pocházející z velké části mimo buňku, signály z intracelulárního prostoru (např. informace o množství glukózy či kyslíku) přenáší tumor supresorový protein p53. Ten rozhoduje o vstupu buňky do dalšího buněčného cyklu, ale také o apoptóze u buňky neopravitelně poškozené [4]. Funkce p53 může být eliminována působením onkoproteinu E6, který se opět nachází u vysoce rizikových lidských papilomavirů ([8], viz Obrázek 2).



Obrázek 2: Důsledky působení onkoproteinů E6 a E7 (převzato a upraveno dle [9]).

pRB – protein retinoblastomu, p53 – tumor supresorový protein p53

Nádorové buňky jsou schopny vyhýbat se apoptóze. Vnější cesta apoptózy může být spuštěna např. vazbou FAS ligandu na FAS receptor, případně vazbou TNF- α (tumor nekrotizující faktor- α) na TNF receptor. Vnitřní cesta apoptózy se spouští detekcí poškozené DNA, signalizační nerovnováhou způsobenou onkogeny či hypoxií. Signály vyvolávající apoptózu se sbíhají v mitochondriích, kde rozhodují o uvolnění cytochromu C proteiny rodiny Bcl-2 [5]. Ty působí proapopticky (např. Bax, Bak) či antiapopticky (např. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W). Tumor supresorový protein p53 může při poškození DNA podpořit zvýšení exprese proapoptického proteinu Bax, který stimuluje mitochondrie k uvolnění cytochromu C. Vazba apoptózu aktivujícího faktoru 1 (APAF1) na cytochrom C způsobí aktivaci kaspáz, které následně štěpí povrchové proteiny buněk a napomáhají fragmentaci DNA. Odolnost nádorových buněk vůči apoptóze je způsobena především mutací genu *TP53*, který kóduje tumor supresorový protein p53. Výsledná inaktivace tohoto proteinu je přítomna až u 50 % nádorových onemocnění a způsobuje zvýšenou expresi antiapoptických členů rodiny Bcl-2 a sníženou expresi členů proapoptických [10]. Zvýšená exprese onkogenu *bcl-2* vzniká také v důsledku chromozomální translokace, konkrétním příkladem může být translokace chromozomů 9 a 22 (tzv. Filadelfský chromozom), která je charakteristická pro chronickou myeloidní leukémii [11].

Pro nádorové buňky je typický expanzivní růst. Nezávisle na dříve zmíněných signálních drahách funguje v buňkách program, který omezuje jejich nekontrolovatelné množení [5]. Již Hayflick v roce 1961 omezený replikační potenciál buněk prokázal. Jakmile buňky projdou

určitým počtem dělení, přestanou se množit a prochází senescencí [12]. Té se dá zabránit deaktivací tumor supresorových proteinů pRb a p53. Při každé replikaci DNA dochází ke ztrátě přibližně 50 až 100 bp (párů bází) telomerické DNA na koncích chromozomů. Telomery chrání DNA před působení enzymů štěpících DNA, při postupném odstranění telomer (cca po 60–70 replikacích) přestává být DNA chráněna, dochází k jejímu štěpení a k buněčné smrti. 85–90 % nádorových buněk má zvýšenou expresi enzymu telomerázy, který přidává na konce telometrické DNA chromozomu hexanukleotidové repetice. Zbytek nádorových buněk zřejmě udržuje telomery pomocí interchromozomálních výměn. Oběma mechanismy dochází k udržení délky telomer nad kritickým prahem, což zajišťuje neomezený replikační potenciál [5].

Pro správnou funkci a přežití buněk je nutné, aby se prakticky všechny nacházely do vzdálenosti maximálně 100 μm od kapilárních krevních cév. Je potřeba zajistit přívod kyslíku a živin a odvod oxidu uhličitého a dalších produktů metabolismu. Během organogeneze je tato blízkost zajištěna koordinovaným růstem cév a parenchymu. Jakmile se vytvoří tkáň, angiogeneze už je pouze přechodná (při hojení ran a v rámci reprodukčního cyklu žen) a pečlivě kontrolovaná [5]. Signály, které iniciují angiogenezi, mohou být např. VEGF (vaskulární endoteliální RF), FGF1/2 (fibroblastový RF 1/2), PDGF či angiopoietiny [13]. Tyto RF se vážou na transmembránové tyrosinkinázové receptory na endoteliálních buňkách. Inhibitorem angiogeneze může být trombospondin-1, který se váže na receptor CD-36 na povrchu buněk endotelu. K rovnováze přispívá i signalizace pomocí integrinů, které zajišťují přilnutí buněk k jiným buňkám či extracelulární matrix, přičemž klidové cévy a cévy rostoucí exprimují integriny rozdílných tříd. Mnoho nádorových buněk má rovnováhu posunutou směrem k signálům iniciujícím angiogenezi. Nejčastěji se jedná o zvýšenou expresi samotného VEGF, samotného FGF či obou najednou. U dalších nádorových buněk je naopak snižená exprese inhibitorů angiogeneze. Bylo zjištěno, že trombospondin-1 je regulován proteinem p53, při ztrátě jeho funkce tak dojde k poklesu trombospondinu-1 a k vychýlení nastavené rovnováhy, opět směrem k angiogenezi [5]. Udržovat pokračující angiogenezi pomáhají také buňky imunitního systému (zejména makrofágy, neutrofilové a žírné buňky), které se shromažďují na okrajích premaligních lézí a mohou paradoxně nádorovou tkáň chránit i před účinky léků zaměřených na signalizaci mezi endoteliálními buňkami [4].

Přítomnost metastáz je příčinou většiny úmrtí u onkologických pacientů. Nádorové buňky unikají z původního místa primárního nádoru a osidlují další místa v těle. Několik tříd proteinů,

kteře se podílejí na ukotvení buněk v rámci příslušné tkáně, je v důsledku nádorového bujení změněno. Mezi tyto proteiny patří adhezivní molekuly mezi buňkami, zejména členové rodiny imunoglobulinů a kadherinů a také již zmiňované integriny. Nejčastěji změněnou molekulou je E-kadherin, který je přítomný na epiteliálních buňkách a jehož funkcí je kromě udržení integrity tkáně také přenos antiproliferačních signálů mezi buňkami [5]. U většiny nádorů je funkce E-kadherinu ztracena, často v důsledku mutace genu *CDH1* [14] či proteolýze kadherinové domény. Pro úspěšnou kolonizaci nových tkání nebo orgánů je nutné, aby se nádorové buňky na nové podmínky adaptovaly, k čemuž dochází pomocí tvorby nových subtypů integrinů [15]. Vliv mají také extracelulární proteázy, kdy jsou geny kódující tvorbu proteáz exprimovány ve vyšší míře, zatímco u genů kódujících tvorbu inhibitorů proteáz dochází k expresi snížené [5]. Invaze nádorových buněk začíná nejprve do nejbližšího okolí, následuje přesun lymfatickým a hematogenním systémem, únik buněk z cév do parenchymu vzdálených tkání, tvorba malých uzlíků (mikrometastáz) a končí růstem do makroskopických rozměrů. U některých typů onemocnění může primární nádor uvolňovat supresorové faktory, které činí mikrometastáze spící a jejich růst se projeví až po odstranění primárního nádoru. U nádorů prsou či melanomů mohou mikrometastáze propuknout v makroskopické nádorové bujení až desítky let po odstranění primární léze, pravděpodobně z důvodu (do té doby neúspěšné) kolonizace nové tkáně.

V roce 2011 Hanahan a Weinberg svou práci rozšířili – kromě již zmíněných šesti znaků přidali další dva a také poznamenali, že všechny tyto schopnosti nádorových buněk vznikají nejen z důvodu genomové nestability (kteřá generuje náhodné mutace i chromozomální přestavby), ale také působením buněk imunitního systému, z nichž některé, namísto aby proti nádorům bojovaly, jejich progresi spíše podporují (viz Obrázek 3). Mezi přidané vlastnosti patří přeprogramování energetického metabolismu buňky a aktivní únik před buňkami imunitního systému.



Obrázek 3: Přidané změny, ke kterým dochází v důsledku maligní transformace u nádorových buněk (nahore) a příčiny transformace v nádorové buňky (dole, převzato a upraveno dle [4]).

Na progresi nádorů mají vliv převážně buňky přirozeného imunitního systému. Zánět v místě léze dodává bioaktivní molekuly (včetně RF, které udržují proliferaci), faktory inhibující buněčnou smrt, proangiogenní faktory a enzymy usnadňující angiogenezi, invazi a tvorbu metastáz. Zánětlivé buňky také uvolňují reaktivní formy kyslíku, které jsou mutagenní pro blízké nádorové buňky a urychlují tak jejich genomovou nestabilitu [4]. Buňkami podporujícími rozvoj nádorů mohou být určité typy makrofágů (tzv. makrofágy asociované s tumorem (MAT) vylučující IL-10 a TGF- β), žírné buňky, neutrofilny (tzv. neutrofilny spojené s nádorem) a také regulační T-lymfocyty a B-lymfocyty [16].

První z nově popsaných vlastností nádorových buněk je přeprogramování energetického metabolismu, tzv. Warburgův efekt [4]. Při tomto procesu dochází k přepnutí oxidativní fosforylace na glykolýzu, a to i v případě, že je přísun kyslíku stále stejný a dostačující [17]. Při vztažení na 1 jednotku glukózy jde o proces méně efektivní než v případě oxidativní fosforylace. Tento proces je označován jako tzv. aerobní glykolýza. Rychlost aerobní glykolýzy je však desetkrát až stokrát vyšší, proto je při dostatečném přísunu glukózy získané množství ATP srovnatelné. Intenzivní proliferace nádorových buněk vyžaduje kromě dostatku energie také zvýšenou syntézu nukleotidů, lipidů a proteinů. Zvýšená spotřeba glukózy vede k přebytku uhlíku, který lze následně použít pro syntézu nových biomolekul. Aby byl zajištěn zvýšený transport glukózy do nádorových buněk, dochází ke zvýšené expresi specifických transportérů na buněčné membráně (konkrétně GLUT1 a GLUT3). Zvýšený metabolismus glukózy má za následek zvýšenou sekreci laktátu do okolí buňky a tím i snížení okolního pH. Díky nízkému

pH se nádorové buňky stávají více invazivními a hrozí jejich rozšíření do blízkého okolí buněk [4]. Zvýšený přísun glukózy je spojen především s aktivací některých onkogenů (*RAS*, *MYC*) a s mutací genu *TP53*. U některých nádorů je kromě populace buněk s Warburgovým efektem přítomna také druhá populace, která přednostně využívá laktát jako svůj hlavní zdroj energie, což může poukazovat na vzájemnou symbiózu obou populací.

Nádorové buňky se vyhýbají imunitnímu systému, který by způsobil jejich destrukci. Normálnímu fungování imunitního systému buňky brání např. snižováním absolutního počtu lymfocytů, zvýšením regulačních T-lymfocytů, MAF, sníženou expresí antigenů v buňkách asociovaných s nádorem či schopností vyvolat apoptózu cytotoxických T-lymfocytů. Metabolismus cytotoxických T-lymfocytů je značně ovlivněn nádorovými buňkami, které jsou schopné vyvolat depleci glukózy, některých aminokyselin (leucin, serin, tryptofan či glutamin) a také nízkou hodnotu pH produkcí laktátu. K přímé inhibici imunitního systému přispívá také VEGF, prostaglandin E2, TGF- β a IL-10 [18].

1.1.2 Základní rozdělení hematolymfoidních a solidních nádorů

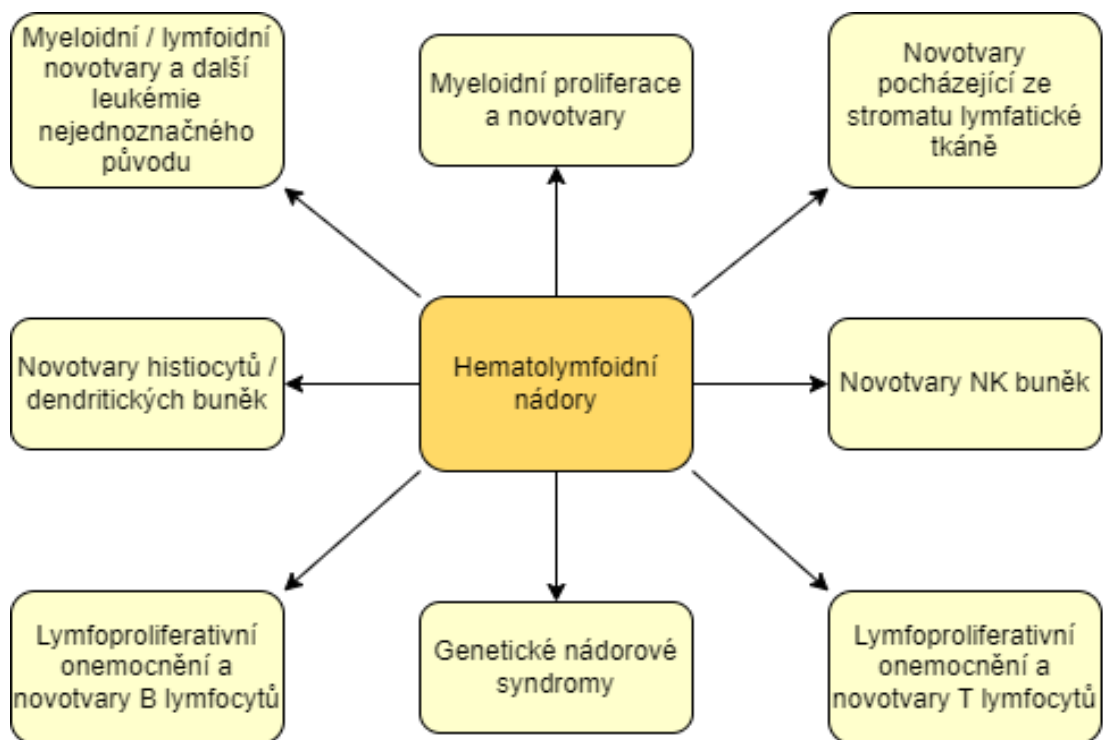
Nádory jsou specialisty rozdělovány do dvou základních skupin – solidní a hematolymfoidní. Hematolymfoidní nádory se nachází v krevním řečišti, solidní nádory postihují všechny ostatní tělesné tkáně a orgány. Obě skupiny mohou být definovány přemnožením nádorových buněk, klíčovým rozdílem je především stáří pacientů a také obecná léčba onemocnění. Solidní nádory nejčastěji postihují jedince ve středním až starším věku, hematolymfoidní nádory jsou naopak nejčastějším onemocněním u dětí (výjimkou může být např. akutní myeloidní leukémie, která postihuje primárně dospělé). Co se týče léčby, chemoterapie je shodná u obou skupin, v rámci hematolymfoidních nádorů však nelze, na rozdíl od solidních nádorů, provádět chirurgické odstranění [19].

1.1.2.1 Hematolymfoidní nádory

První novodobější publikací shrnující rozdělení hematolymfoidních nádorů byla v roce 1994 Revidovaná evropsko-americká klasifikace lymfoidních novotvarů (REAL) [20], která nádory rozdělila do tří skupin: novotvary B-lymfocytů (prekurzorových a zralých), společné novotvary T-lymfocytů a NK-buněk (prekurzorových a zralých) a Hodgkinův lymfom [21]. Tato klasifikace však nebyla dostačující a bylo nutné k jednotlivým typům nádorů doplnit také

histologii, genetiku, klinické rysy, epidemiologii a etiologii. Další publikace vyšla již pod Světovou zdravotnickou organizací (WHO), která vydává od roku 1967 tzv. modré knihy (WHO Blue Books – WBB). Novější klasifikace hematolymfoidních nádorů vznikla před vydáním třetí edice WBB v roce 1999 [20]. Od té doby došlo k dalším úpravám a aktuální klasifikace nesoucí název Hematolymfoidní nádory je součástí pátého vydání WBB z roku 2022.

Klasifikace nádorů je strukturována následovně – je založena na liniích, které se rozvíjí od benigních k maligním, větví se dle kategorie, rodiny, typu (onemocnění či nádoru) a podtypu. Pokud to lze, jsou u každého onemocnění či nádoru zaznamenány tři rozlišovací rysy – původ (na základě imunofenotypizace či imunohistochemie), dominantní klinický rys (např. časový úsek onemocnění či informace, zda dochází k nárůstu či k poklesu buněk) a dominantní biologický rys (např. fúze genů, chromozomální přestavby či mutace) [22]. Stejně jako v ostatních svazcích pátého vydání WBB je ke klasifikaci využita čtyřstupňová hierarchie [23]. Základní klasifikace rozděluje hematolymfoidní nádory do 8 kategorií (viz Obrázek 4). V Příloze 1 jsou zaznamenány jednotlivé kategorie s následným rozdělením: rodina – typ – příklad podtypu.



Obrázek 4: Základní klasifikace hematolymfoidních nádorů dle pátého vydání modré knihy Světové zdravotnické organizace (převzato a upraveno dle [23]).

1.1.2.2 Solidní nádory

Dvěma hlavními typy solidních nádorů jsou karcinomy a sarkomy. Karcinomy pochází z epitelálních buněk a mají tendenci napadat hlavně kůži a sliznice vystýlající tělesné dutiny. Mezi nejčastější typy karcinomů patří adenokarcinom, bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom a karcinom přechodných buněk. Místa, která jsou těmito nádory postižena jsou uvedena v Tabulce 2. Sarkomy pochází z mezenchymálních buněk, které se podílejí na tvorbě mnoha orgánů a tkání (tzv. pojivové tkáně), např. kostí, cév, chrupavek, nervů, svalů, kloubů či vazů. Objevují se obvykle v oblasti břicha, paží nebo nohou, mezi nejčastější typy patří nediferencovaný pleomorfní sarkom, leiomyosarkom, osteosarkom či liposarkom. Místa, která jsou těmito nádory postižena jsou opět uvedena v Tabulce 2 [24].

Oba typy solidních nádorů jsou maligní, mohou být dobře léčitelné, ale i život ohrožující. Vyskytnout se mohou v různém věku, příčina jejich vzniku je často neznámá a diagnostika je obvykle obtížná. Základním rozdílem je jejich četnost výskytu. Karcinomy tvoří až 90 % všech nádorových onemocnění, sarkomy jsou oproti tomu zastoupeny méně než v 1 % případů. Karcinomy obvykle postihují starší jedince, sarkomy jsou častěji diagnostikované u dětí. Rizikovým faktorem pro vznik karcinomů je především životní styl (kouření, váha, sedavé povolání), dále také genetika, věk, virové infekce a záření. Rizikovými faktory pro vznik sarkomů je především radiace, chemoterapie, expozice toxickým látkám v životním prostředí, HIV infekce či genetické syndromy (např. Li-Fraumeniho syndrom). Karcinomy se často šíří lymfatickými cestami, sarkomy obvykle krevním řečištěm. Karcinomy mají tendenci růst a napadat blízké struktury, sarkomy spíše okolní struktury utlačují. Metody léčby obou skupin zahrnují chirurgii, radiační terapii, chemoterapii, cílenou terapii či imunoterapii. Prognóza sarkomů i karcinomů závisí na konkrétním typu rakoviny, agresivitě, věku v době stanovení diagnózy a také na stádiu [25].

Tabulka 2: Tkáně postižené karcinomy a sarkomy (převzato a upraveno dle [24]).

| Typ solidního nádoru | Postižená tkáň |
|-----------------------------------|--|
| Karcinomy | |
| Adenokarcinom | Tkáně s vnitřní a vnější sekrecí (ledviny, prsa, prostata) |
| Bazocelulární karcinom | Kůže (epidermis) |
| Spinocelulární karcinom | Kůže (epidermis až dermis) |
| Karcinom přechodných buněk | Močový systém |
| Sarkomy | |
| Nediferencovaný pleomorfní sarkom | Měkké tkáně a kosti |
| Leiomyosarkom | Hladké svalstvo (krevní cévy, GIT, děloha) |
| Osteosarkom | Kost |
| Liposarkom | Tuková tkáň |

1.2 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění charakterizované nekontrolovaným růstem maligně transformovaných plazmatických buněk (PB) v kostní dřeni (KD) [26]. Poprvé bylo onemocnění popsáno v roce 1844 chirurgem Samuelem Sollym, nejčastěji uznávaný první případ je však až z roku 1850, kdy se nemoc vyskytla u londýnského obchodníka T. A. McBeana. Tento pacient vylučoval v moči vysoké množství bílkovin, které v polovině 19. století zkoumal a následně popsal lékař Henry Bence Jones [27]. Známý je také pražský případ z roku 1885, kdy přijal lékař Otto Kahler pacienta trpícího bolestí v žebrech, páteři i svalstvu s doprovodným hubnutím, bledostí a albuminurií. Kahlera tato nemoc natolik zaujala, že v jejím studiu dále pokračoval. Po několika letech publikoval (v té době velmi obsáhlý) popis MM, právě proto je tato choroba často nazývána také jako Kahlerova nemoc [28].

Plazmatické buňky patří mezi bílé krvinky, konkrétně se jedná o konečné stádium diferencovaných B-lymfocytů. Role těchto buněk je velmi významná pro adaptivní (získanou) imunitní reakci, kde svými konečnými produkty zodpovídají za humorální imunitu. Funkcí PB je produkce a následné vylučování protilátek (imunoglobulinů). Nesprávná proliferace PB může vést ke vzniku novotvarů a imunodeficitů. Novotvary jsou charakteristické proliferací klonálních PB, které produkují monoklonální imunoglobulin (též paraprotein, M-protein či M-komponentu). Tento M-protein na rozdíl od normálních protilátek neplní svou funkci a je tedy pro tělo bezvýznamný, a hlavně také nadbytečný. Mezi novotvary PB patří monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), kdy klonální PB nepřesahují v KD 10 %. Pacienti jsou často asymptomatictí a pravděpodobnost přechodu do malignity je velmi nízká (1–2 %). Pokud klonální expanze poškozených PB ve zvýšené míře pokračuje, jedná se o stádium nazývané jako doutnající myelom (SMM). U této nemoci už klonální PB zabírají 10–59 % KD. Nejzávažnějším novotvarem je mnohočetný myelom, kde jsou klonální PB v KD zastoupeny přes 60 %. Další kritéria, kterými se navzájem stádia novotvarů PB odlišují, lze nalézt v Tabulce 3. Opačným případem, kdy je počet PB nedostatečný, je běžná variabilní imunodeficience (CVID). Takto postižení jedinci jsou výrazně náchylnější k bakteriálním infekcím [29].

Tabulka 3: Kritéria rozdělující novotvary plazmatických buněk (převzato a upraveno dle [30]).

MGUS – monoklonální gamapatie nejasného původu, SMM – doutnající mnohočetným myelom, MM – mnohočetný myelom, PB – plazmatická buňka, KD – kostní dřeň

| | MGUS | SMM | MM |
|---------------------------------|-------------|--|-----------------------------------|
| M-protein v séru | <30 g/l | ≥30 g/l (popř. ≥500 mg/24 h v moči) | +/- (není pro diagnózu vyžadován) |
| Klonální PB v KD | <10 % | 10–60 % | ≥10 % |
| Konečné poškození orgánů | Žádné | Žádné | Přítomné |

Mnohočetný myelom je druhým nejčastějším hematolymfoidním maligním onemocněním (první příčku zaujímají non-Hodgkinové lymfomy), tvoří přibližně 1,8 % všech nádorových onemocnění a více než 17 % hematologických malignit. Incidence MM stoupá s věkem a pohybuje se mezi 0,4 až 5 případy na 100 000 obyvatel. Nejvíce případů je zachyceno v severní Americe, Austrálii, severní a západní Evropě, nejméně případů v asijských zemích. Onemocnění je diagnostikováno především u starších jedinců a častěji postihuje muže. Ve více než 60 % případů je diagnóza potvrzena mezi 65. až 74. rokem života, více než 90 % případů MM je nalezeno u pacientů nad 50 let [31]. Dle České myelomové skupiny je incidence v České republice 2,65 případů na 100 000 obyvatel, ve věkové kategorii 75 až 79 let je incidence dokonce 15,57 případů na 100 000 obyvatel [32]. Relativní míra přežití pacientů s MM je v horizontu pěti let 58 % [33].

1.2.1 Patogeneze vzniku onemocnění

Ve stádiu nezralých B-lymfocytů dochází k přeskupení genových fragmentů kódujících těžký a lehký řetězec imunoglobulinů. Poté, co tento proces (který je z hlediska možných mutací a vzniku MM klíčový) buňky prodělají, postupují z KD do periferních lymfoidních tkání, kde postupně dozrávají.

Aktivace B-lymfocytů je v germinálním centru stimulována cytokiny závislými na T-lymfocytech. Výslednou selekcí zůstávají pouze B-lymfocyty s vysokoafinitními receptory, které organizmu zaručují déle trvající imunitu. Tento proces zahrnuje dvě somatické změny,

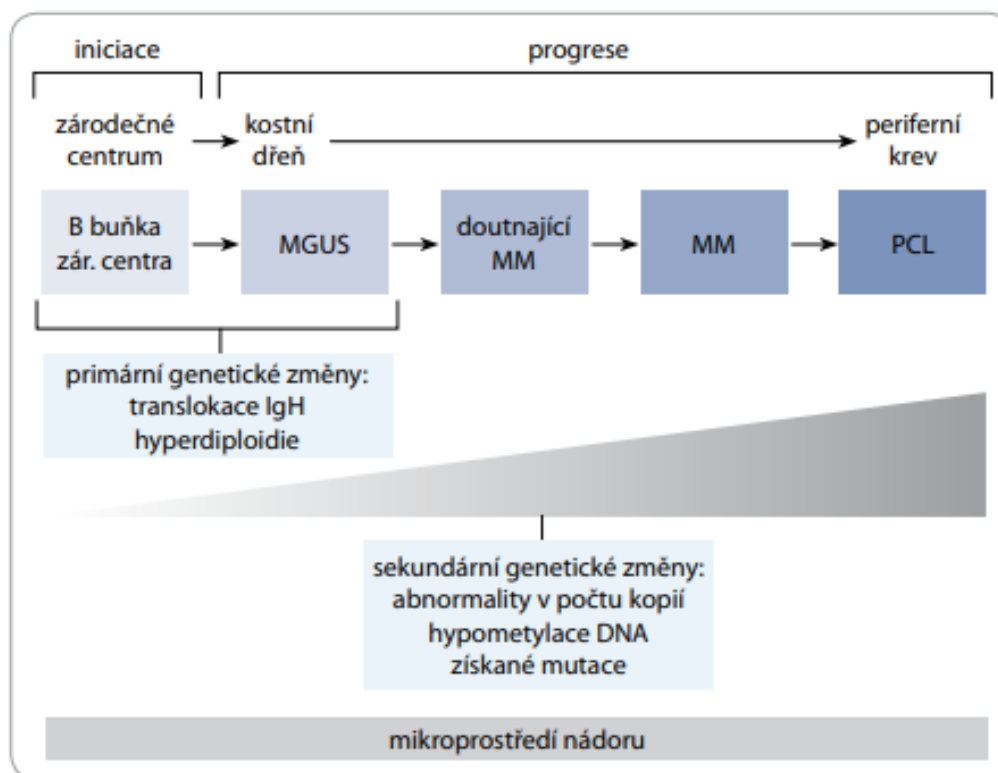
kteře se označují jako somatická hypermutace a přesmyk izotypových tříd. Právě tento moment se zdá být pro možný rozvoj MM kritický, neboť jde o procesy náchylné k chybám. Při somatické hypermutaci dochází ke změně oblasti, která zajišťuje komplementaritu a je důležitá pro zvýšení afinity mezi antigenem a protilátkou. Izotypový přesmyk je proces, kdy dochází k odstranění části těžkého řetězce protilátky, což umožní produkci imunoglobulinů různých izotypů se stejnou antigenní specifitou. Původní naivní B-lymfocyty na svém povrchu nesou pouze imunoglobuliny třídy IgD a IgM, po izotypovém přesmyku jsou schopné exprimovat i třídy IgG, IgA a IgE.

U poloviny pacientů s MM lze nalézt translokace, které způsobují chyby právě při zmiňovaném izotypovém přesmyku. Většina translokací zahrnuje lokus IgH (14q32), který nese geny kódující tvorbu těžkého řetězce protilátek. Translokace zahrnující lokus IgL [34] (22q11 [35]) který obsahuje geny kódující tvorbu lehkého řetězce λ (lambda), jsou přítomny asi u 10 % pacientů s nově diagnostikovaným MM. Tento náleř obvykle znamená špatnou prognózu onemocnění. Translokace v oblasti loku IgK [34] (2p11 [36]) který nese geny kódující tvorbu lehkého řetězce κ (kappa), se vyskytují u méně než 5 % případů. Nejčastěji vyskytující se translokace u pacientů s MM jsou t(11;14), t(12;14), t(6;14) a t(4;14). Kromě translokací je 50–60 % případů MM hyperdiploidních. Předpokladem je, že k hyperdiploidii dochází během rychlé proliferace germinálních center, což má za následek chybné rozdělení chromozomů v PB. Běžně jsou trizomií postižené liché chromozomy [34] (především chromozomy 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 [37]). Další klonální PB mohou být hypodiploidní (44 nebo 45 chromozomů), pseudodiploidní (44 až 47 chromozomů), téměř tetraploidní (nad 74 chromozomů) a hyperhaploidní (24 až 34 chromozomů). Spojeny s agresivnějším klinickým průběhem onemocnění jsou zejména hypodiploidie a hyperhaploidie.

Jelikož je IgH translokace a/nebo hyperdiploidie přítomná i u stádií, která MM předchází, předpokládá se, že jsou pro progresi onemocnění nezbytné i další faktory. Vliv má hlavně mikroprostředí KD. Bylo zjištěno, že u pacientů s MM jsou ve vyšší míře přítomny antiapoptické a chemotaktické cytokiny (IL-6, CXCL12 [34] – chemokinový ligand 12 s CXC motivem [38], IGF1 – inzulínu podobný RF 1 [39] a VEGF-A), které zprostředkovávají růst, přežití a migraci mutovaných buněk a stojí také za potenciálním rozvojem lékové rezistence. Myelomové buňky (maligně transformované PB) produkují také další cytokiny (TNF- α , TGF- β a VEGF), čímž se tvoří smyčka pozitivní zpětné vazby.

U pacientů s MM se vyskytuje nadbytek osteoklastů (buněk resorbujících kost), což má za následek proliferaci myelomových buněk a odolnost vůči apoptóze. Mezi osteoklasty a myelomovými buňkami existuje obousměrná smyčka – osteoklasty produkují IL-6 a osteopontin, čímž stimulují buněčnou proliferaci a angiogenezi. Myelomové buňky na oplátku podporují diferenciaci a aktivitu osteoklastů. V KD je také ve vyšší míře zastoupena podskupina pomocných CD-4+ T-lymfocytů. Konkrétně jde o Th17, které vylučují IL-10 a IL-17, a tím potlačují imunitní dohled nad tvorbou nádorových buněk. Cytotoxické CD-8+ T-lymfocyty exprimují ve vyšší míře PD-1 [34] (protein programované buněčné smrti 1 [40]), jehož ligand (PD-L1) je nadměrně exprimován i na povrchu myelomových buněk, což zprostředkovává další imunitní toleranci.

Vývoj MM začíná asymptomatickým stavem MGUS, který je charakterizován přítomností paraproteinu v krevním řečišti a v KD [26]. Paraprotein, který u MGUS vzniká, je v 70 % třídy IgG, vzácně třídy IgM (15 %) či IgA (12 %) [34]. Při zvýšení populace myelomových buněk v KD nad 10 % přechází choroba do stádia SMM nebo MM. Přejít z MGUS do MM je zachycen u 1–2 % pacientů ročně. Mezistupeň (SMM) je definován zvýšeným obsahem paraproteinu v séru i v moči, zvýšeným počtem myelomových buněk, zatím však bez postižení orgánů, které je charakteristické až pro MM. Přejít ze SMM do MM je způsoben buď další, kontinuální proliferací maligní populace PB nebo získáním dalších translokací, aberací v počtu kopií či dalšími mutacemi. Myelomové buňky zpočátku vytváří jeden větší nádor, tzv. plazmocytom. Ten se následně vyvíjí v mnohočetné léze, které stojí za názvem tohoto onemocnění. MM může dále přejít až do velmi agresivního onemocnění, které se nazývá plazmocelulární leukémie (PCL). V tomto stádiu se myelomové buňky, které byly dosud lokalizovány pouze v KD, přemístí do periferní krve. Schéma vývoje monoklonálních gamapatií je zachyceno na Obrázku 5 [26].



Obrázek 5: Vývoj monoklonálních gamapatií (převzato z [41]).

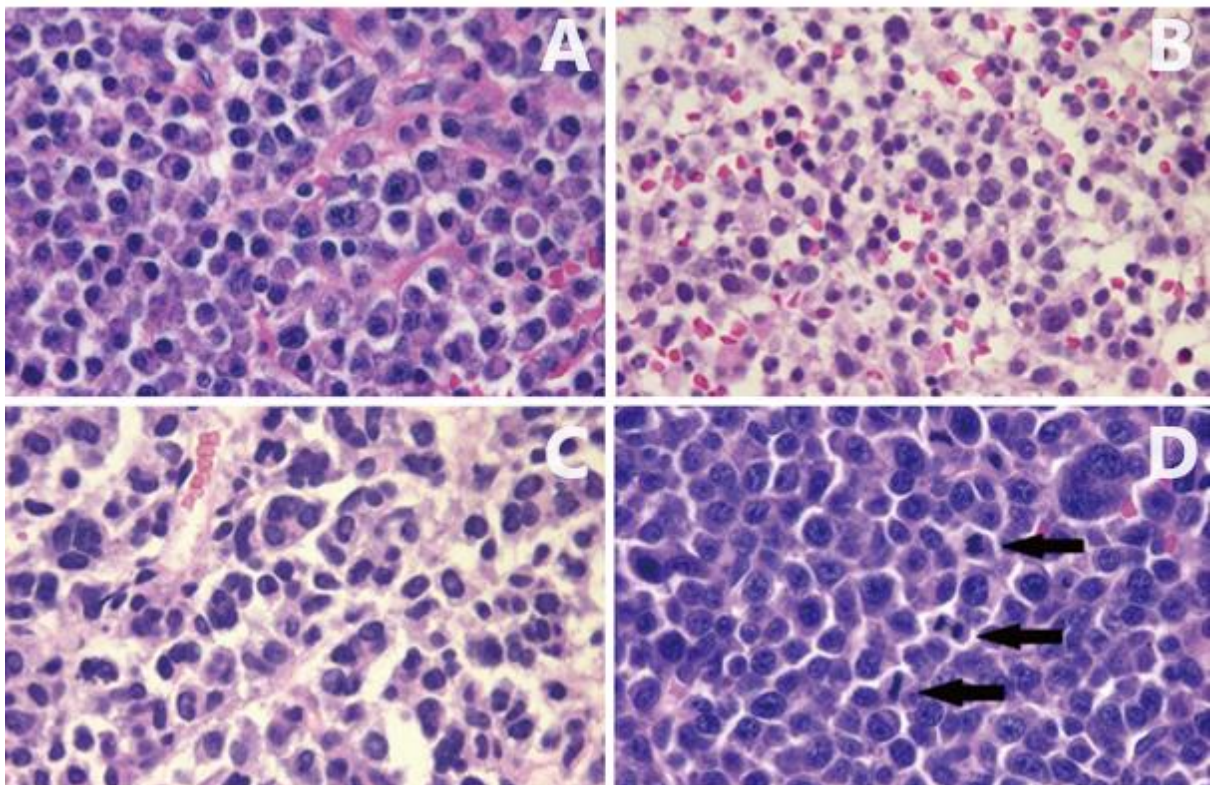
MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu, MM – mnohočetný myelom, PCL – plazmocelulární leukémie

Mnohočetný myelom je považován za heterogenní multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku se podílí mnoho rizikových faktorů. Sem spadá již zmíněný vyšší věk, mužské pohlaví, dále mají vyšší predispozici pro onemocnění i Afroameričané a příbuzní prvního stupně již nemocného jedince. Co se týče životního stylu, prokazatelnými rizikovými faktory jsou nadváha a obezita. Zvýšené riziko existuje u zemědělců, hasičů a kadeřníků, pravděpodobně kvůli expozici pesticidům, kyselině fenoxycetové, chlorfenolům, kovovému prachu a také chemikáliím, které jsou součástí šampónů, kondicionérů, laků a barev na vlasy. Se zvýšeným rizikem výskytu MM jsou spojeny také autoimunitní choroby, jako např. perniciózní anémie či ankylozující spondylitida [31].

1.2.2 Myelomové buňky

Jak již bylo v předchozí podkapitole řečeno, myelomové buňky (MB) jsou maligně transformované PB, které vznikají proliferací jediného klonu produkujícího monoklonální imunoglobulin [34]. Morfologie MB je různá, od vzhledu odpovídajícímu zdravým PB až po

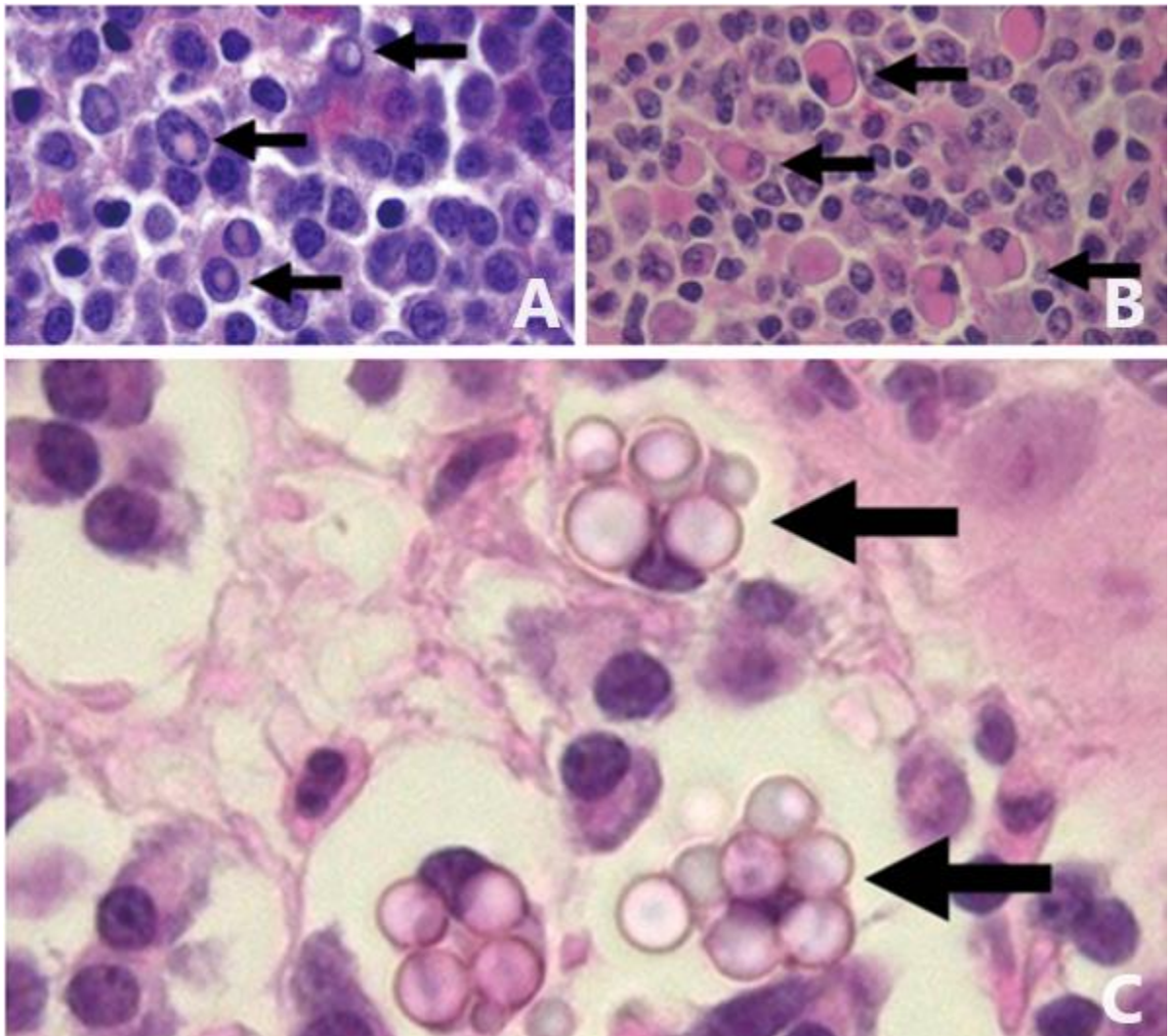
buňky s rozmanitou velikostí a různým tvarem jádra. MB jsou klasifikovány do 4 typů: zralé, nezralé, pleomorfní a plazmablastické (viz Obrázek 6). Zralé MB nelze obvykle rozeznat od normálních PB. Jádro je excentricky umístěno a neobsahuje jadérka, cytoplazma je bazofilní s perinukleárním projasněním. U nezralých MB je jádro nepravidelné, s výraznými jadérky, chromatin je více rozptýlený a poměr jádra a cytoplazmy (N/C) je vyšší. Jádra pleomorfních MB jsou segmentovaná, polymorfní a jadérka jsou opět velmi výrazná. Buňky plazmablastického myelomu jsou velké s polymorfními jádry (která mohou tvarem připomínat proces mitózy) a odpovídající buňkám velkobuněčného B-lymfomu. Jejich přítomnost obvykle značí špatnou prognózu onemocnění. Krátké přežití pacientů indikují především atypické buňky se zvětšeným jádrem, rozptýleným chromatinem, viditelnými jadérky a malou cytoplazmou. Pro potvrzení pleomorfních a plazmablastických MB je nutné imunohistochemické barvení. Pro PB je specifický znak CD-138, v důsledku přítomnosti lehkých řetězců v séru je však někdy obarveno i pozadí. Pro získání jasnějšího obrazu je proto lepší analýza pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Přibližně 90 % MB exprimuje abnormální antigeny, nejčastěji CD-56, CD-20, CD-117 a CD-10 [42].



Obrázek 6: Tkáň infiltrovaná různými typy myelomových buněk (převzato a upraveno dle [42]).

Část A – zralé myelomové buňky, část B – nezralé myelomové buňky, část C – pleomorfní myelomové buňky, část D – plazmablastické myelomové buňky (černými šipkami jsou označeny mitotické vzory)

V MB se často nachází charakteristické struktury – Dutcherova a Russelova tělíska (viz Obrázek 7). Dutcherovo tělísko je inkluze v jádře, která je vysoce specifická pro buňky neoplastického myelomu. Russelovo tělísko je inkluze, která se nachází v cytoplazmě a je tvořena imunoglobuliny. Buňka, která má více inkluzí ve tvaru hroznu se nazývá Mottova buňka (viz Obrázek 7). Russelova tělíska se někdy nachází i v reaktivních PB, proto jejich přítomnost vždy neoplasticitu neznačí [42].

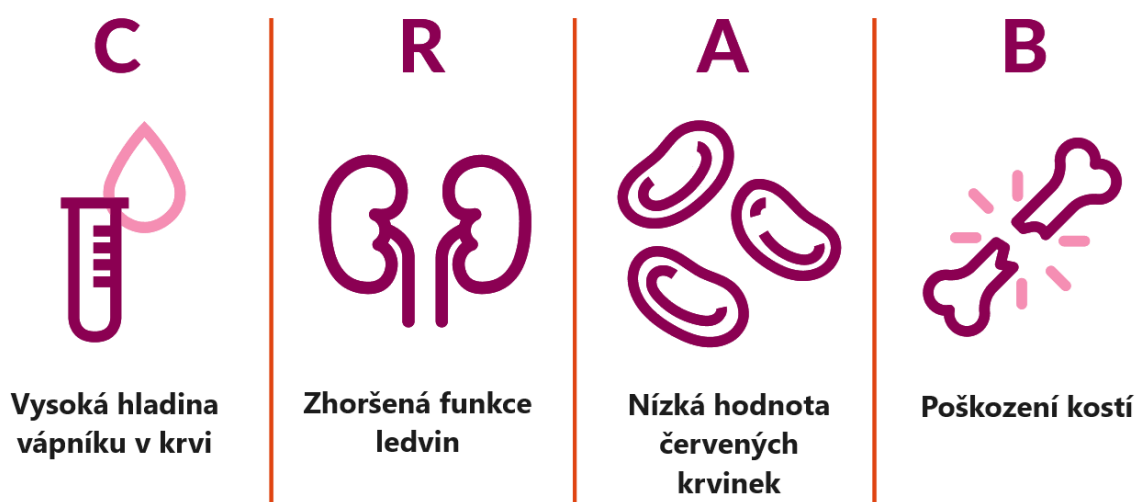


Obrázek 7: Charakteristické struktury v myelomových buňkách označené šipkami (převzato a upraveno dle [42]).

Část A – Dutcherova tělíska, část B – Russelova tělíska, část C – Mottova buňka

1.2.3 Klinické příznaky mnohočetného myelomu

V roce 2003 představila *International Myelom Working Group* diagnostická kritéria pro MM a pro zjednodušení nejčastějších klinických projevů zavedla zkratku CRAB (viz Obrázek 8), která zahrnuje následující příznaky: C – hyperkalcémie (*hypercalcemia*), R – selhání ledvin (*renal failure*), A – anémie (*anemia*) a B – postižení kostí (*bone marrow*) [43].



Obrázek 8: Nejčastější klinické projevy pacientů s mnohočetným myelomem (převzato a upraveno dle [44]).

Jak uvádí Maisnar *et al.* (2022), počáteční fáze MM je obvykle bezpříznaková. Pokud je v této fázi nemoc odhalena, pravděpodobně je to z důvodu abnormálních výsledků získaných při preventivním vyšetření, případně při vyšetření, které je prováděno ze zcela jiného důvodu (např. před operací). Až v 80 % případů je prvním příznakem bolest v oblasti hrudní či bederní páteře. Zpočátku se bolest projevuje pouze po námaze a v klidu mizí. Postupně však její intenzita stoupá, zesiluje se při kašli a kýčání, následně přetrvává i v klidu a později také i v noci. Pokud se zvýšený tlak objeví v hrudní oblasti, bolest obvykle putuje přes hrud, krk a horní končetiny. Pokud je zvýšený tlak na nervy v oblasti beder, bolest putuje hlavně do dolních končetin. Dalším prvotním příznakem může být nadměrná (bezduvodná) únava, sporadicky se objevuje také nechutenství, nevolnost či hubnutí [45].

V důsledku nadměrné tvorby MB v KD dochází ke snížení hladiny krvetvorných buněk. MB se tvoří v takovém množství, že svou produkcí utlačují ostatní buňky krvetvorby. V pokročilém stádiu MM dochází k poklesu množství erytrocytů, leukocytů i trombocytů. Snížení množství červených krvinek vede k anémii, která se projevuje únavou, slabostí, bledostí a dušností.

Snížené množství bílých krvinek, které je spojeno i se snížením protilátek, vede ke zvýšené náchylnosti k opakovaným bakteriálním infekcím. K těm dochází nejčastěji v dýchacích cestách, typickými příznaky jsou proto hlavně bolest na hrudníku a kašel. Nedostatek krevních destiček způsobí nadměrnou krvácivost, nejčastěji z nosu a dásní a vede také ke zvýšené tvorbě modřin a petechií.

Jak již bylo v podkapitole 1.2.1 řečeno, MB podporují diferenciaci a aktivitu osteoklastů. Za normálních okolností je odbourávání kostí osteoklasty v rovnováze se syntézou, kterou zajišťují osteoblasty. Při MM je aktivita osteoklastů podpořena a aktivita osteoblastů potlačena, dochází tedy k postupnému úbytku kostní hmoty [46]. V místech s nahromaděnými MB vznikají nejprve osteolytická ložiska, která již neobsahují vápník. Pokud úbytek kosti dále pokračuje, vznikají dutiny, které mají za následek zeslabení kostí a jsou rizikovým místem pro vznik zlomeniny. Osteolytická ložiska a dutiny obvykle vznikají v oblasti lebky, páteře, žeber a pánve. Pokud se MB nehromadí, ale jsou rozptýleny rovnoměrně v kosti, dochází k osteoporóze (řidnutí kostí). Nevzniká tedy přímo riziková oblast možné zlomeniny, ale ke zlomení může dojít v celé délce oslabené kosti. V případě kompresivních zlomenin obratlů se může výška pacientů s MM snížit až o několik centimetrů.

Při rychlém odbourávání kostní hmoty dochází k vyplavení vápníku do krve, následkem čehož dochází k hyperkalcémii. Zvýšená hladina vápníku může vést k poškození ledvin a ke zpomalení střevní motility [45]. Při zpomalení střev jsou typickými příznaky bolesti břicha, zácpa a nevolnost až zvracení, u ledvin způsobí zvýšená hladina vápníku ztrátu schopnosti koncentrovat moč. Při špatném zakoncentrování moči dochází k nadměrnému vylučování tekutin (polyurie), dehydrataci je zabráněno nadměrným příjmem tekutin (polydipsie). Hyperkalcémie navíc působí i na nervový systém a může vést ke zmatenosti, depresím, bolestem svalů a kloubů a k poruše vědomí [47].

Hyperkalcémie není jedinou příčinou možného poškození ledvin. Endotel glomerulu za normálních okolností nepropouští molekuly větší než 70 kDa [48]. MB mohou tvořit kromě kompletních molekul monoklonálních protilátek (které membránou glomerulu neprocházejí, jelikož je jejich velikost větší než 150 kDa [49]) také volné lehké řetězce kappa a lambda [47], jejichž velikost je okolo 23 kDa [49]. Volné lehké řetězce se mohou při nízkém průtoku v ledvinových kanálcích shlukovat, vysrážet se a společně s Tamm-Horsfallovým

proteinem vytvořit válce, které kanálky zablokují. K poškození ledvin přispívá také zvýšená hladina kyseliny močové či časté bakteriální močové infekce.

U pacientů s MM může být vzácně postižen také nervový systém. Kromě již zmiňovaných příznaků souvisejících s hyperkalcémií může být při postižení periferních nervů přítomné brnění v končetinách a poruchy citlivosti. Pokud se MB rozšíří z obratlů do páteře, může dojít k utlačení míchy, což vede opět k poruchám citlivosti až dokonce k poruchám hybnosti [47].

1.2.4 Diagnostika mnohočetného myelomu

Jak uvádí 29. ročník časopisu *Transfúze a hematologie dnes* (2023, supplementum 2), nejčastějšími projevy MM jsou bolesti kostí, příznaky související se zhoršenou funkcí ledvin, příznaky anémie a opakované infekce. Při podezření na MM by měla být praktickým lékařem provedena následující vyšetření – kompletní krevní obraz, zjištění hladiny celkové bílkoviny, albuminu, močoviny, kreatininu a elektrolytů, elektroforéza bílkovin v séru i v moči a kvantitativní vyšetření imunoglobulinů v séru. Základní vyšetření by mělo obsahovat také rentgen bolestivých míst a použití dalších zobrazovacích technik, např. magnetické rezonance (MR) či počítačové tomografie (CT). Pokud některé z vyšetření potvrdí podezření na MM, pacient je odeslán na specializované pracoviště pro provedení dalších testů a vyšetření [50].

1.2.4.1 Hematologická vyšetření

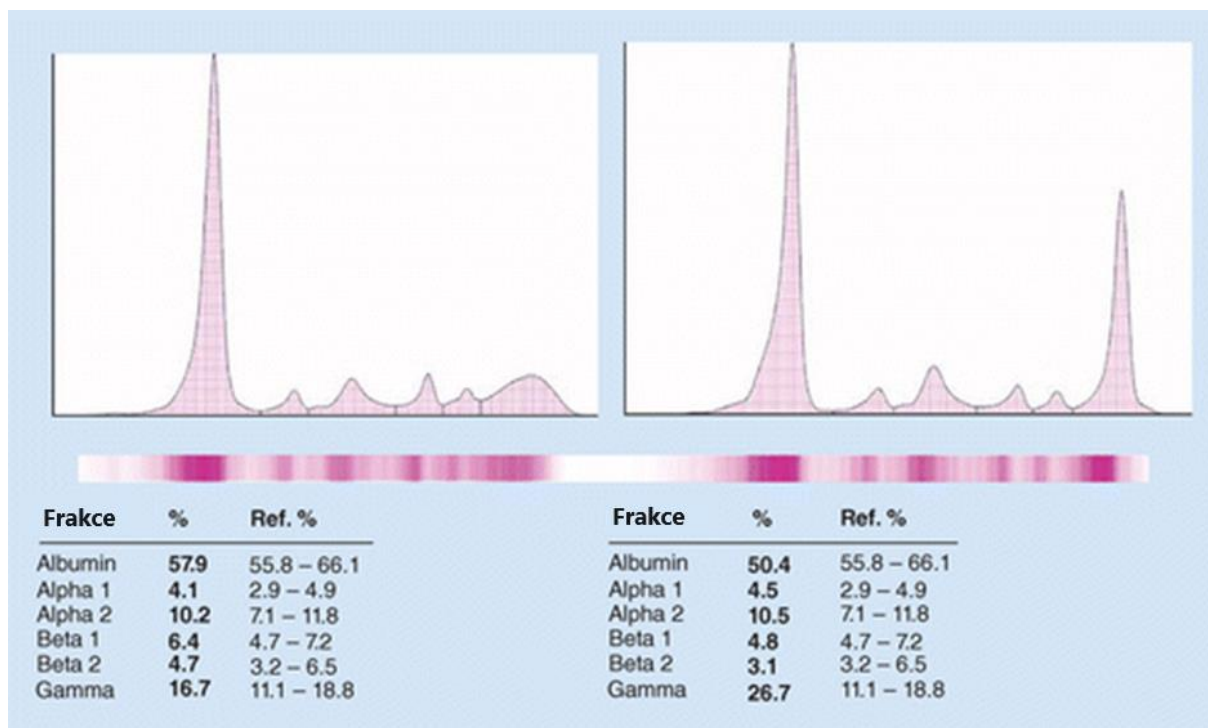
Základním hematologickým vyšetřením je při podezření na MM kompletní analýza krevního obrazu doplněná diferenciálním rozpočtem leukocytů. U pacientů lze nalézt převážně normochromní makrocytární anémii, přítomna může být také trombocytopenie a neutropenie [50]. V důsledku přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu v plazmě je zpomalena rychlost sedimentace erytrocytů, získané hodnoty sedimentace jsou v porovnání se zdravými jedinci zvýšené [51]. Hematologické vyšetření by mělo dále obsahovat také základní koagulační vyšetření [50], u pacientů s MM se objevují zvýšené hodnoty protrombinového času, trombinového času, aktivovaného parciálního tromboplastinového času a D-dimerů. Hladiny faktoru VIII mohou být sníženy [52].

1.2.4.2 Biochemická vyšetření

Základními parametry, které se v rámci biochemických testů u MM stanovují, jsou především hladiny celkové bílkoviny, albuminu, močoviny, kyseliny močové, kreatininu, vápníku a dalších iontů (hlavně sodík, draslík, chlór a fosfor). Dále se zjišťují také hodnoty jaterních enzymů, hladina bilirubinu, glykémie, C-reaktivního proteinu a laktátdehydrogenázy (LDH). U pacientů s MM je obvykle zvýšená hladina celkové bílkoviny [50], kyseliny močové, kreatininu a LDH. Hodnota albuminu může být nižší, než je referenční mez [53] a může signalizovat patologický proces. Nejdůležitějším biochemickým ukazatelem je v souvislosti s MM zvýšený vápník v séru. Hyperkalcémie může signalizovat vysoce agresivní stádium MM, společně s hodnotami močoviny, kreatininu a ostatních elektrolytů může ukazovat i na zhoršenou funkci ledvin. Vhodné je také provést 24hodinový sběr moči z důvodu možné proteinurie a následně změřit či vypočítat kreatinovou clearance. K vyloučení současné primární amyloidózy srdce se doporučuje stanovit také hladiny troponinu a NTproBNP [50] (N-terminální natriuretický propeptid typu B [54]).

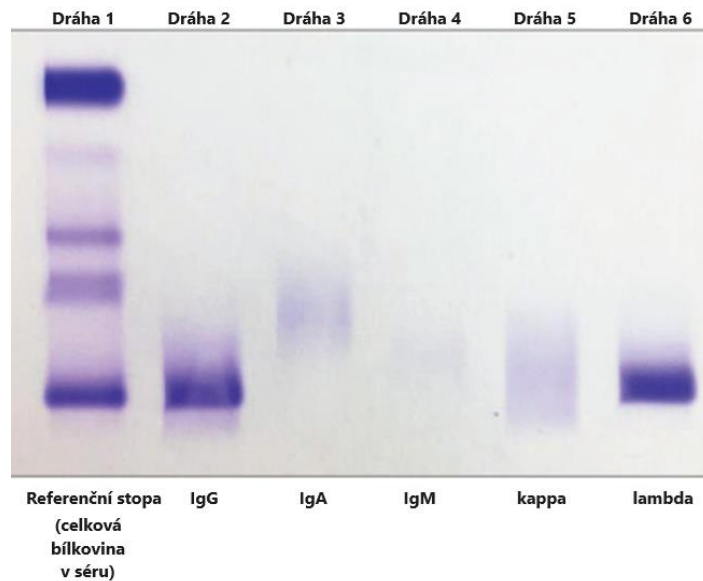
Speciální vyšetření paraproteinů

Pro zjištění přítomnosti paraproteinu se kromě sedimentace erytrocytů používá také elektroforéza proteinů ze séra, případně ze zakoncentrované moči [50]. Proteiny se pomocí elektroforézy dělí do 5 frakcí – α_1 , α_2 , β_1 , β_2 a frakce γ . Právě poslední zmíněné frakci je při diagnostice MM věnována největší pozornost, skládá se totiž převážně z imunoglobulinů [55]. Na Obrázku 9 lze vidět porovnání mezi frakcemi sérových bílkovin zdravého dárce na levém obrázku a pacienta s MM na pravém [56].



Obrázek 9: Porovnání rozdělení frakcí sérových bílkovin u zdravého dárce (vlevo) a u pacienta s MM (vpravo) doplněné o relativní hodnoty jednotlivých frakcí vztahené k celkové bílkovině (převzato z [56]).

Pro potvrzení či vyloučení přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu po elektroforéze následuje proces imunofixace, a to i v případě, že je prvotní elektroforéza negativní [50]. Stejný vzorek je nutné dát celkem do 6 jamek gelu, aby bylo následně možné identifikovat třídu imunoglobulinu. K tomu se používají antiséra proti imunoglobulinům třídy IgA, IgG a IgM a také antiséra proti lehkým řetězcům kappa a lambda. V případě reakce antigenu s protilátkou dochází ke vzniku precipitátu, který je následně obarven [57]. V séru lze zachytit koncentrace kolem 0,2 g/l, v moči kolem 0,04 g/l. Pokud je reakce při použití antisér proti třídám IgA, IgG a IgM negativní, ale zároveň je pozitivní reakce při použití protilátek proti lehkým či těžkým řetězcům, měla by zpravidla následovat imunofixace s antiséry proti zbývajícím dvěma třídám protilátek – IgD a IgE [58]. Na Obrázku 10 lze vidět výsledek imunofixace s přítomností monoklonálního imunoglobulinu IgG λ .



Obrázek 10: Imunofixace séra s přítomným monoklonálním imunoglobulinem IgG λ (převzato a upraveno dle [57]).

V rámci vyšetření se dále provádí kvantitativní denzitometrické stanovení monoklonálního imunoglobulinu a polyklonálních imunoglobulinů v séru. Volné lehké řetězce lze detekovat v séru (i se stanovením indexu κ/λ) i v moči. Zde se jedná buď o náhodný vzorek moči, který je vztažen ke koncentraci kreatininu nebo o měření vzorku moči sbírané 24 hodin [50]. Stanovení volných lehkých řetězců se provádí pomocí Freelite testů (2001), které obsahují latexové částice potažené polyklonálními protilátkami proti řetězcům kappa a lambda. Jedná se o velmi citlivou metodu, která detekuje nízké hladiny lehkých řetězců, které nelze z klasické sérové elektroforézy kvantifikovat. Ve srovnání s imunofixací moči má přibližně desetkrát vyšší citlivost [59], proto je toto vyšetření momentálně jednou z podmínek v revidovaných diagnostických kritériích pro MM. V séru je vhodné stanovit také hodnoty β 2-mikroglobulinu [50].

1.2.4.3 Vyšetření kostní dřeně

Aspirace a biopsie kostní dřeně se provádí za účelem diagnostiky mnoha hematolymfoidních onemocnění. K provádění se využívá jak palpáce (vyšetření pohmatem), tak také řízení pomocí CT. Jedná se o procedury s vysokým stupněm přesnosti a nízkou mírou komplikací [60]. Při podezření na MM by měla být vždy provedena biopsie z lopaty kosti kyčelní. Po odběru zpravidla následuje histologické vyšetření počtu PB a potvrzení či vyvrácení jejich klonality. Výhodou je především získání dostatečného množství vzorku pro další vyšetření. Při aspiraci

kostní dřeni se také zjišťuje počet PB, zpravidla jsou ale relativní počty PB nižší než v histologickém preparátu. K mikroskopickému hodnocení infiltrace je vhodné provést nátěr [50].

1.2.4.4 Cytogenetická a molekulární vyšetření

Jak již bylo řečeno v podkapitole 1.2.1, u pacientů s MM lze často nalézt změny ve struktuře či v počtu chromozomů. Cytogenetické změny se dělí na primární a sekundární. Primární jsou spojeny se vznikem onemocnění a patří mezi ně translokace a hyperdiploidie, sekundární změny souvisí s progresí onemocnění a nejčastěji se jedná o delece. Základní metodou pro určení změn na chromozomech je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která využívá fluorescenční sondy komplementární ke známé sekvenci nukleotidů. Vyšetřovanými buňkami jsou buňky pozitivní na znak CD-138 v kostní dřeni nebo barvením identifikované PB. Rutinní vyšetření pacientů s podezřením na MM zahrnuje vyšetření vysoce rizikových translokací t(4;14), t(4;16) a t(14;20), delecí oblastí 1p a 17p a inzerci oblasti 1q [61].

Pro sledování dalších genetických změn se v současné době společně s FISH používá také sekvenování nové generace (NGS), které umožňuje analýzu celého nádorového genomu. Sekvenační panely mohou detekovat mutace v genech, které jsou pro onemocnění klíčové, změny v DNA (krátké inzerce nebo delece), jednonukleotidové změny či variabilitu v počtu kopií genu. Pomocí NGS lze určit sekvenci a množství imunoglobulinů produkovaných klonálními buňkami, což se následně využívá pro sledování účinnosti terapie [50]. Studie Bolli *et al.* z roku 2016 popisuje návrh panelu sekvenování pro zjištění MM, který obsahoval 246 genů a 2538 jednonukleotidových polymorfismů [62]. V roce 2022 Sudha *et al.* navrhli další komplexní panel sekvenování, který cílí na MM. Obsahoval 228 genů pro zjištění mutací, 6 oblastí pro zjištění translokací a 6 oblastí pro zjištění variability v počtu kopií [63]. V roce 2021 byl přímo v České republice navržen panel LYNX pro analýzu nejběžnějších lymfoidních novotvarů [64]. Vyšetření NGS se doporučuje u nově diagnostikovaných jedinců s MM. Pokud dojde k relapsu, chromozomální či genové mutace se mohou více vyvinout případně i úplně změnit, proto je vhodné nové vyšetření NGS provést ještě před zahájením další léčby [50].

1.2.4.5 Imunofenotypizace

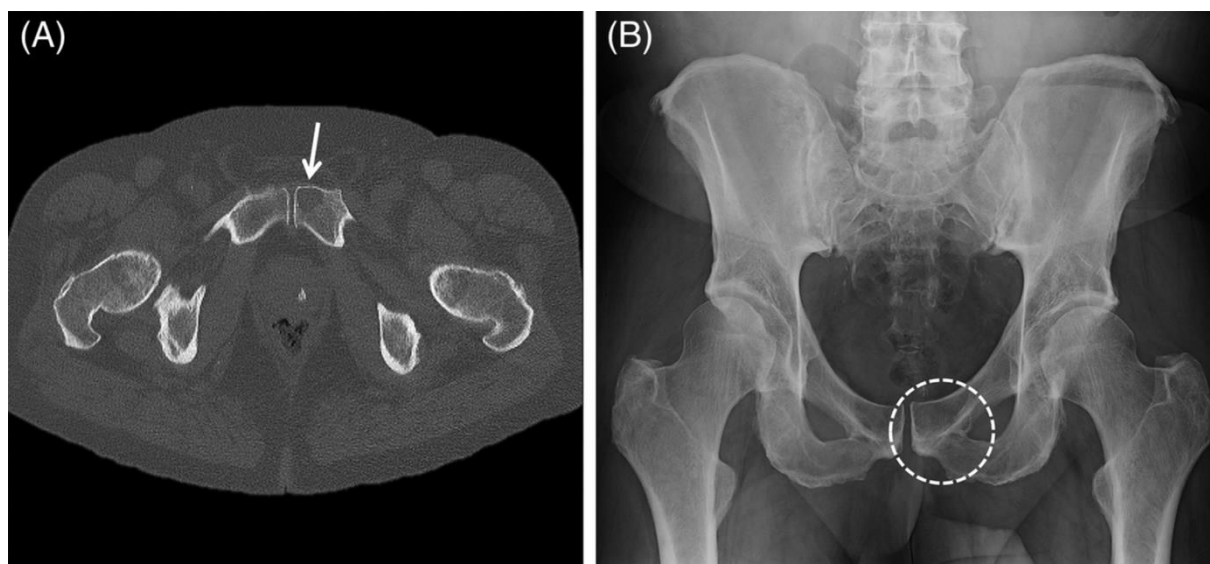
Průtoková cytometrie (FC) je klíčová technika v diagnostice, klasifikaci a monitorování hematolymfoidních onemocnění. Množství, fenotyp a klonální PB můžeme zjistit v KD i v dalších biologických materiálech. Základní panel pro detekci PB by měl obsahovat fluorescenčně značené protilátky proti znakům CD-17, CD-19, CD-38, CD-45, CD-56 a CD-138. Pro stanovení prognózy onemocnění je vhodné zjistit i expresi znaků CD-28, CD-44, CD-20 a CD-200, analýza FC by měla zahrnovat také zjištění exprese lehkých řetězců v cytoplazmě PB [50], [65].

FC má důležitou roli i v rámci monitorování účinnosti terapie, konkrétně při použití T-lymfocytů s chimérickým antigenním receptorem (CAR-T-lymfocytů), jejichž princip je uveden v podkapitole 1.2.5. Česká společnost pro analytickou cytometrii vyvinula panel obsahující značené protilátky proti následujícím znakům – CD-3, CD-4, CD-8, CD-19, CD-20, CD-45 a antigenu zrání B-lymfocytů (BCMA). Anti-BCMA CAR-T-lymfocyty je společně s NK-buňkami, B-lymfocyty a T-lymfocyty vhodné sledovat v periferní krvi první měsíc po podání terapie v týdenních intervalech a následně ve druhém, třetím, šestém, devátém a dvanáctém měsíci po podání. Hodnoty NK-buněk, T-lymfocytů a B-lymfocytů je vhodné zkontrolovat také před zahájením lymfodeplece a den před podáním CAR-T-lymfocytů [50].

1.2.4.6 Zobrazovací techniky

Dřívějším zlatým standardem pro vyhledávání časných stádií nádorového procesu nebo potvrzení diagnózy bylo rentgenové vyšetření. Jde o metodu relativně levnou a snadno dostupnou. Až 80 % pacientů s MM má známky postižení kostry, nejčastěji jde o oblast obratlů, žeber, lebky, ramen, pánve a dlouhých kostí. Myelomové léze se na rentgenových snímcích projevují jako ostře definované. Kromě diagnostiky je metoda vhodná také pro předpověď komplikací, zejména pro zjištění rizika možných zlomenin dlouhých kostí. Nevýhodou rentgenového vyšetření je relativně nízká citlivost, léze jsou zachyceny až při poškození kostí nad 30 %. 10–20 % pacientů s MM má dokonce rentgenové snímky negativní. Další nevýhodou je dlouhá doba potřebná k pořízení snímků celého těla, diskomfort pacientů, potíže s hodnocením některých oblastí (hlavně pánve a páteře) a neschopnost odlišit zlomeniny obratlů od patologických zlomenin souvisejících s MM.

Citlivější zobrazovací metodou je CT, které poskytuje trojrozměrnou informaci o vyšetřované oblasti. Celotělové nízkodávkové („*low-dose*“) CT skvěle detekuje osteolytické onemocnění, nelytické medulární léze i infiltraci dřene PB. Myelomové léze se na rentgenových snímcích projevují jako ostře definované. Jedním z diagnostických kritérií MM je nalezení jednoho či více ložisek osteolyticky destruované kosti, kdy je ložisko větší než 5 mm. Při nejednoznačných výsledcích či nalezení ložisek o velikosti menší než 5 mm se doporučuje se stanovením diagnózy počkat a opakovat vyšetření za dalších 3-6 měsíců. CT je vhodné k detekci patologických zlomenin a také k hodnocení stability páteře v případě patologické fraktury obratlů. Jak již bylo řečeno v podkapitole 1.2.4.3, využívá se také při provedení biopsie. Porovnání CT snímků a rentgenových snímků u pacienta s 15 % klonálních PB v KD lze vidět na Obrázku 11.



Obrázek 11: Lytické léze v levé stydké kosti (šipka) na části (A) získané z CT, negativní léze ve stejné oblasti na části (B) získané z rentgenu u stejného pacienta (převzato z [65]).

Kombinace pozitronové emisní tomografie (PET) s CT (PET/CT) využívá pro diagnostiku, prognózu onemocnění a hodnocení terapie MM [¹⁸F]-fluorodeoxyglukózu. Tato zobrazovací technika kombinuje funkční hodnocení metabolické aktivity nádoru s morfológickými informacemi, které poskytuje CT. Pomocí PET/CT je možné také odlišit SMM od aktivního MM. Kromě [¹⁸F]-fluorodeoxyglukózy se pro detekci MM momentálně hledají specifitější PET indikátory, mezi nově používanými je např. [¹¹C]-methionin, [¹⁸F]-cholin či [¹¹C]-acetát. Nevýhodou PET/CT je především vysoká cena, omezená dostupnost, nedostatek standardizovaných zobrazovacích kritérií, vyšší radiační zátěž a delší doba vyšetření.

Pomocí MR lze detekovat změny v kostní dřeni ještě předtím, než destrukci kostí odhalí CT. Jedná se o nejcitlivější metodu pro detekci časně infiltrace dřene. Ve srovnání s výše popsanými technikami má MR výhodu, že pacienty nevystavuje ionizujícímu záření. Podobně jako PET/CT je MR vhodná pro sledování léčebné odpovědi, ale má omezení při identifikaci lézí v oblasti žeber, lebky a klíčních kostí. Stejně jako u CT lze MR kombinovat s PET. Spojení PET/MR je momentálně oblastí pokračujícího výzkumu a vývoje. Nevýhodou MR je kontraindikace u pacientů s kovovými implantáty. Jde o metodu časově náročnou, dražší a u pacientů s bolestmi může být preferována jiná zobrazovací technika.

Při podezření na MM je pro počáteční vyšetření lytického onemocnění kostí vhodné celotělové nízkodávkové CT. Při podezření na onemocnění mimo páteř se doporučuje PET/CT. Při podezření na postižení páteře a pánve [66] (kompresi míchy či míšních nervů [50]) se upřednostňuje MR. U pacientů, kteří mají diagnostikovaný MM a podstupují léčbu, se pro vyhodnocení úspěšnosti terapie používá především PET/CT [66]. Pro vyloučení minimální reziduální choroby (MRD) se doporučuje využití PET/CT či PET/MR [50].

1.2.4.7 Diagnostická kritéria

Základním charakteristickým znakem MM je přítomnost paraproteinu v séru. Jelikož je ale jeho přítomnost typická i pro MGUS, AL-amyloidózu nebo B-buněčné ne Hodgkinské lymfomy, nepatří již dnes mezi podmínky pro stanovení diagnózy MM [50]. První diagnostická kritéria byla v roce 2003 představena *International Myelom Working Group* a zahrnovala nejčastější klinické příznaky (CRAB), přítomnost paraproteinu v krvi či v moči, více než 10 % klonálních PB v KD anebo potvrzení plazmocytomu ve vzorku tkáně [43]. V roce 2014 byla diagnostická kritéria MM revidována, momentální platná kritéria lze nalézt na Obrázku 12 [50].

Počet klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 10\%$ nebo biopticky potvrzený kostní nebo extramedulární plazmocytom¹ a přítomnost jedné nebo více následujících skutečností s myelomem souvisejících (*myeloma defining events – MDE*):

známky poškození orgánů nebo tkání podmíněné proliferací plazmatických buněk, zejména:

- hyperkalcémie: koncentrace sérového Ca o $> 0,25$ mmol/l (1 mg/dl) vyšší než horní limit normálního rozmezí nebo $> 2,75$ mmol/l (11 mg/dl)
- renální insuficience: snížení clearance kreatininu < 40 ml/min (= 0,67 ml/s) nebo koncentrace sérového kreatininu > 177 μ mol/l (2 mg/dl)
- anémie: koncentrace hemoglobinu o > 20 g/l nižší než dolní limit normálního rozmezí nebo < 100 g/l
- kostní postižení: jedno nebo více osteolytických ložisek na RTG skeletu, CT nebo CT/PET²

jedna nebo více z následujících známek maligního procesu:

- zmnožení klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 60\%$ ¹
- poměr postižených/nepostiženým volným řetězcům v séru ≥ 100 ³
- > 1 ložisko při vyšetření pomocí MR⁴

¹ klonalita by měla být stanovena pomocí průkazu κ/λ restrikce lehkých řetězců při vyšetření pomocí průtokové cytometrie, imunohistochemie nebo imunofluorescence, počet plazmatických buněk by měl být přednostně stanoven z biopie kostní dřene; v případě rozdílu v procentuálním zastoupení plazmatických buněk zjištěném v aspirátu a bioptickém vzorku by měla být použita vyšší hodnota

² pokud je počet klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $< 10\%$, pak je nutná přítomnost více než jednoho ložiska k odlišení od solitárního plazmocytomu s minimálním postižením kostní dřene

³ při použití stanovení pomocí metody Freelite© (The Binding Site, Birmingham, UK)

⁴ velikost ložiska musí být minimálně 5 mm

Obrázek 12: Revidovaná diagnostická kritéria mnohočetného myelomu dle *International Myeloma Working Group* (2014, převzato z [50]).

Ca – vápník, RTG – rentgen, CT – počítačová tomografie, CT/PET – počítačová tomografie spojená s pozitronovou emisní tomografií, MR – magnetická rezonance

1.2.5 Terapie mnohočetného myelomu

Jak již bylo v podkapitole 1.2 řečeno, MM je druhým nejčastějším hematolymfoidním maligním onemocněním [31]. Díky řadě nových léčebných kombinací se dlouhodobé přežití pacientů výrazně zlepšuje. V roce 1976 byla relativní míra přežití pacientů s MM v horizontu 5 let 23,7 %, v roce 2022 už byla tato hodnota na 58 %. Vzestupný trend relativní míry přežití ukazuje, že jsou nové léčebné strategie účinné [33].

Léčba MM zahrnuje dvě linie. První linie je zaměřena na snížení až úplnou eliminaci MB, druhá linie poté zahrnuje léčbu podpůrnou. Snížení počtu MB je žádoucí zejména pro zmírnění klinických příznaků – v KD se opět obnoví správná krevtvorba, se zvýšením počtu erytrocytů, leukocytů a trombocytů vymizí příznaky anémie a nadměrné krvácivosti alepší se také obranyschopnost organismu proti infekcím. S úbytkem MB se také obnovuje stabilita kostí a klesá riziko vzniku zlomenin. Podpůrná léčba se zaměřuje přímo na klinické příznaky [45].

1.2.5.1 Terapie cílená na myelomové buňky

Cílem této linie léčby je co největší snížení počtu MB a dosažení tzv. minimální reziduální choroby (MRD) [45]. MRD je stav, kdy i po vyléčení zůstává v těle malý počet nádorových buněk. Tyto zbytkové buňky již nelze najít v nátěru KD, nezpůsobují klinické příznaky, mají však potenciál vést k relapsu onemocnění. Proto je jejich množství nutné pravidelně sledovat, nejčastěji metodou FC [67]. Hlavním cílem léčby MM je samozřejmě úplná eliminace MB a dosažení tzv. MRD negativity [45].

Počáteční léčba

Léčba MM obvykle začíná podáváním kombinace tří léků s různými mechanismy účinku, počet cyklů této léčby je dva až šest. Na počátku 21. století byla kombinace léčiv následující – bortezomib (2003 [68]), thalidomid (1953 [69]) a lenalidomid (2004 [70]) [50]. Bortezomib se řadí do skupiny léčiv, která se nazývají proteazomové inhibitory (PI) [45]. Proteazom zajišťuje odbourávání poškozených či nepotřebných proteinů. MB produkují v nadměrné míře již zmíněný paraprotein, pokud dojde k inhibici proteazomu, nádorová buňka z důvodu hromadění špatně složených a nesložených proteinů umírá [68]. Thalidomid i lenalidomid patří mezi imunomodulační látky (IMiD), které podporují imunitní buňky v rozpoznávání buněk nádorových, navíc brání i jejich růstu a podporují apoptózu [70]. Po roce 2010 se začaly bortezomib či lenalidomid podávat v kombinaci s dexametazonem (1957 [71]), třetím používaným lékem byl karfilzomib (2012 [68]), ixazomib (2015 [72]), daratumumab (2015 [73]), elotuzumab (2015 [74]) nebo isatuximab (2020 [75]). Dexametason patří mezi glukokortikoidy, které selektivně poškozují MB, ale netlumí tvorbu ostatních krevních buněk [76]. Karfilzomib a ixazomib patří mezi PI. Daratumumab a isatuximab jsou monoklonální protilátky proti povrchovému antigenu MB CD-38. Navázáním na MB může dojít k přímé destrukci nebo ke zničení leukocyty, protilátka může také obsahovat toxickou látku, kterou takto specificky dopraví do cílových MB. Poslední zmíněný elotuzumab je monoklonální protilátka proti povrchovému antigenu CD-319 (též SLAMF7 [77]), který je na povrchu buněk plazmatických i myelomových. Používání těchto léčiv může vést k řadě nežádoucích účinků, kterými jsou např. snížení počtu krvinek, únava, nevolnost, průjem, vyrážky či riziko vzniku krevních sraženin [45].

Autologní transplantace

Po vstupní léčbě kombinací výše zmíněných látek následuje (zpravidla u pacientů do 70 let) sběr kmenových buněk [50], který se obvykle provádí z periferní krve (viz Obrázek 13). Na počátku procesu se podá chemoterapeutikum, nejčastěji cyklofosfamid nebo cytosinarabinosid. Cyklofosfamid patří mezi alkylační činidla, která mají schopnost vazby na DNA či proteiny a způsobují apoptózu. Cytosinarabinosid je antimetabolit, který strukturou připomíná cytosin, zabudovává se do DNA a pravděpodobně opět způsobuje apoptózu. Po cyklu chemoterapie, která má za cíl pokles leukocytů, následuje podání růstových faktorů stimulujičích granulopoézu. S nárůstem počtu leukocytů zároveň dochází k vyplavení kmenových buněk do periferní krve [45]. Nejčastějšími metodami separace kmenových buněk je centrifugace v hustotním gradientu nebo separace pomocí průtokové cytometrie se značenými protilátkami proti antigenu CD-34 [78]. Odebírané množství by mělo ideálně stačit na více než jednu transplantaci. Do měsíce po odběru následuje vysokodávková chemoterapie. Podávaným cytostatikem je melfalan, což je stejně jako cyklofosfamid alkylační činidlo. 24 až 48 hodin po chemoterapii je provedena autologní transplantace dříve získaných kmenových buněk. Jelikož melfalan ničí nádorové i zdravé buňky, je funkce KD oslabena a její obnova trvá přibližně dva týdny. Po tuto dobu by měl být pacient ve speciální izolaci, která omezí možný přenos infekcí [45]. Počet autologních transplantací je v rámci standardní léčby jedna až dvě.



Obrázek 13: Proces autologní transplantace (převzato a upraveno dle [79]).

Potransplantační léčba

Následný režim by měl obsahovat tři až čtyři cykly léčiv zmiňovaných v počátku, kombinace léčiv by však měla být oproti prvotní léčbě odlišná. Při dosažení MRD negativity se po dobu 2–3 let podává lenalidomid.

Pokud je první linie léčby neúspěšná nebo dojde k relapsu, využívá se opět trojkombinace léků, z nichž by alespoň jeden neměl být dříve používaným. Následně se opět provádí vysokodávková chemoterapie a autologní transplantace. U agresivních relapsů se rovnou přistupuje k autologní transplantaci, u mladších jedinců je možné zvážit také transplantaci alogenní, která se ale většinou provádí pouze jako součást klinických studií. V případě čtvrtého relapsu se nasazují nejmodernější metody imunoterapie MM – použití bispecifických protilátek (BSP) a CAR-T-lymfocytů [50].

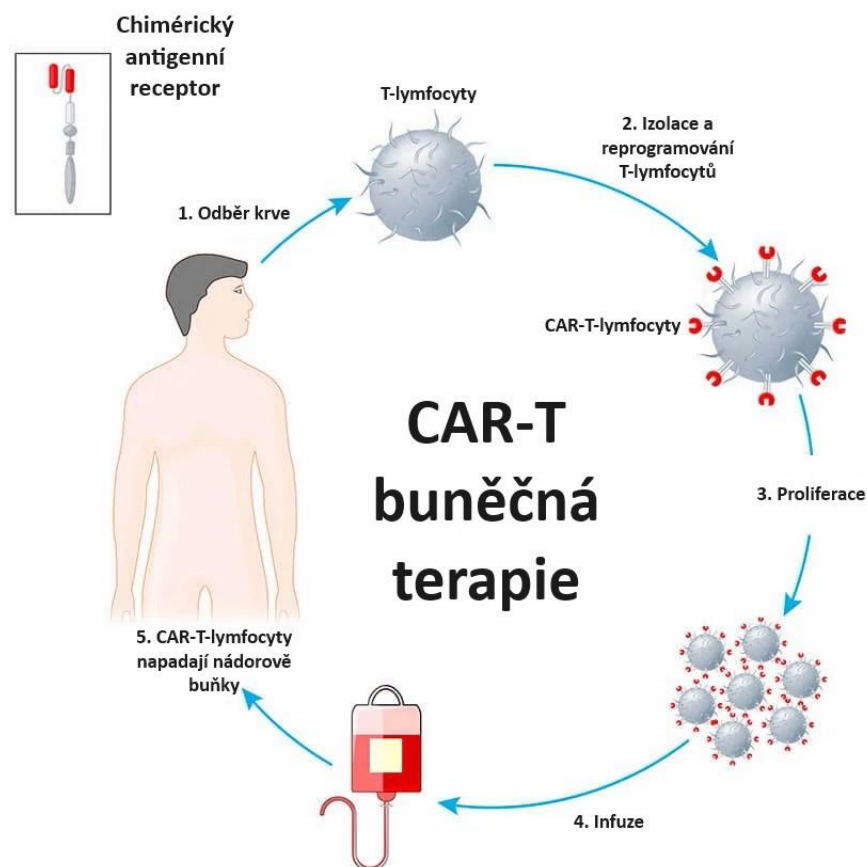
Bispecifické protilátky a CAR-T-lymfocyty

BSP mají dvě odlišné vazebné domény, které umožňují vazbu na dva antigeny nebo epitopy současně. V rané fázi klinického vývoje je momentálně přes 100 různých BSP, od roku 2014 bylo americkou FDA (*U. S. Food And Drug Administration*) schváleno zatím 9. Přímou léčbu MM byla v roce 2022 schválena BSP s názvem Tecvayli [80]. Účinnou látkou je teclistamab, který se váže na antigen zrání B-lymfocytů (BCMA) a také antigen CD-3 exprimovaný na povrchu T-lymfocytů [81].

CAR-T buněčná terapie využívá geneticky upravené CAR-T-lymfocyty. Funkce těchto buněk je stejně jako u klasických cytotoxických T-lymfocytů (Tc-lymfocytů) usmrcení nežádoucích a nebezpečných buněk. CAR-T-lymfocyty jsou navrženy tak, aby byly vysoce specifické pro cílový antigen, zároveň však na rozdíl od Tc-lymfocytů nepotřebují k aktivaci vazbu Tc-receptoru na hlavní histokompatibilní komplex (MHC) první třídy. Stejně tak nejsou potřebné ani další kostimulační signály.

Prvním krokem CAR-T buněčné terapie je získání pacientských T-lymfocytů pomocí leukaferézy. Výroba CAR-T-lymfocytů může trvat až šest týdnů, během této doby dochází k jejich proliferaci a expanzi. Buňky jsou vystavovány různým prorůstovým cytokinům, anti-CD-3 protilátkám a IL-2. Do genomu buněk je následně pomocí virového vektoru přenesen gen kódující tvorbu chimérického antigenního receptoru [82]. Tento receptor cílí (v případě MM)

na antigen zrání B-lymfocytů (BCMA), který je exprimován výhradně na buňkách B-linie. Chybí na naivních a paměťových B-lymfocytech, nalézt ho však lze u diferencovaných PB a ve zvýšené míře právě také u MB [83]. V průběhu výroby CAR-T-lymfocytů je u pacienta fáze tzv. překlenovací terapie, jejíž cílem je zabránit zhoršení zdravotního stavu, obvykle zahrnuje opět výše zmíněná léčiva (dexametazon, daratumumab, karfilzomib a bortezomib [50]) či chemoterapii (cyklofosfamid) nebo ozařování. Před podáním upravených CAR-T-lymfocytů je provedena další chemoterapie, která má za cíl snížit počet lymfocytů (tzv. lymfodeplece) [84]. Po infuzi CAR-T-lymfocytů dochází k navázání buněk na cílový antigen, proliferaci buněk a k podpoře reakce dalšími imunitními buňkami. Mnohostranná imunitní odpověď následně vede k masivnímu usmrcení MB [82]. Celý proces je graficky znázorněn na Obrázku 14. CAR-T buněčná terapie má dva poměrně specifické možné vedlejší účinky. Prvním je syndrom uvolnění cytokinů, který se nejčastěji projevuje horečkou, zvýšenou tepovou frekvencí a nízkým tlakem. Druhý je syndrom neurotoxicity spojený s imunitními efektorovými buňkami, který se projevuje hlavně bolestí hlavy, zmateností a třesem [45].



Obrázek 14: Proces CAR-T buněčné terapie (převzato a upraveno dle [85]).

V souvislosti s MM jsou momentálně schváleny dva preparáty, z nichž ani jeden ke konci roku 2023 není dostupný (z důvodu výrobní kapacity) v České republice. Ide-cel (2021) je indikován u pacientů s relabujícím či refrakterním MM, u kterých byla v předchozích liniích neúspěšná léčba pomocí PI, IMiD a anti-CD-38 protilátek. Podání předchází chemoterapie cyklofosfamidem a fludarabinem (antimetabolitikum). Indikace druhého preparátu, cilta-cel (2022), je shodná, opět musí nejdříve proběhnout léčba PI, IMiD a anti-CD-38 protilátkami. Těsně před podáním se opět provádí chemoterapie cyklofosfamidem a fludarabinem [50]. Cena jedné infuze preparátu ide-cel je 419 500 dolarů (cca 9 820 000 Kč) a preparátu cilta-cel 465 000 dolarů (cca 10 885 000 Kč). Do budoucna mohou být dalšími potenciálními cílovými antigeny kromě BCMA také transmembránový receptor GPRC5D (receptor spřažený s G-proteinem, třída C, skupina 5, člen D [86]), či povrchový antigen CD-319 (SLAMF7) [82].

1.2.5.2 Podpůrná terapie

K omezení poškození kostí se používají bisfosfáty, které působí na syntetickou dráhu cholesterolu v osteoklastech. Vznikající osteoklasty mají abnormality v cytoskeletu, oddělují se od obvodu kosti a stávají se tak neúčinnými. Mezi dva nejpoužívanější bisfosfáty patří pamidronát a kyselina zolendronová, dávka se však musí vždy přizpůsobit aktuální funkci ledvin. Na povrchu osteoklastů se nachází receptorový aktivátor jaderného faktoru kappa B (RANK [87]), který po navázání svého ligandu z osteoblastů (RANKL) osteoklasty aktivuje. Monoklonální protilátka denosumab zvládne tento ligand také navázat a k aktivaci osteoklastů tak nedojde [88]. K roku 2022 je však použití denosumabu v České republice u pacientů s MM omezené.

Prevencí vzniku zlomenin je přiměřený pohyb. Pacientům se nedoporučuje běh, skákání, prudké otáčení či zvedání těžkých věcí. Preventivními pomůckami mohou být berle, ortézy či břišní pás, vhodné jsou také rehabilitace. Pokud dojde vlivem zlomeniny k poškození míchy, je nutné přistoupit k operaci. Na chronickou bolest se předepisují kromě analgetik také léčiva ovlivňující psychiku pacientů, nejčastěji antidepresiva či léky proti úzkosti [45].

Častou virovou infekcí je u pacientů s MM pásový opar, preventivně se proto používají antivirotika, kterými mohou být např. aciclovir či valaciclovir. Co se týče bakteriálních infekcí, důrazně se doporučuje sezónní očkování proti chřipce a pneumokokům [88]. V některých případech je doporučeno preventivní podávání antibiotik, v období respiračních onemocnění by

se měli jedinci vyhýbat místům se zvýšenou koncentrací lidí [45]. Snížené hodnoty protilátek lze řešit podáváním intravenózních imunoglobulinů (IVIG), tato procedura se však zatím rutinně neprovádí.

U pacientů s MM je častá také tromboembolická nemoc. U rizikových pacientů by se měl preventivně podávat nízkomolekulární heparin (LMWH) či warfarin, případně novější perorální antikoagulancia, u ostatních pacientů kyselina acetylsalicylová [88]. Při akutních příznacích anémie se podává krevní transfuze, dlouhodobé zvýšení hemoglobinu lze řešit podáváním erythropoetinu ve formě injekcí [45].

1.3 Biomarkery nádorových onemocnění a jejich význam v diagnostice, prognóze a sledování účinků terapie onemocnění

Biomarker (též nádorový marker) je molekula, kterou lze nalézt v krvi, jiných tělesných tekutinách i ve tkáních v důsledku nádorového bujení. Nejčastěji jde o molekuly detekovatelné v krevním oběhu (plná krev, sérum či plazma) nebo v sekretech či exkretech (sputum, moč či stolice) [89]. Mohou být produkovány přímo nádorovými buňkami nebo organismem v reakci na probíhající patologický proces [90]. Mezi biomarkery patří nejčastěji proteiny (např. enzymy, receptory či protilátky), dále také glykoproteiny, hormony, onkogeny [91] či nukleové kyseliny [89]. Příklad nejčastěji stanovovaných nádorových markerů je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4: Nejčastěji stanovované nádorové markery pojící se s danými místy nádorového bujení a odebíraný materiál pro stanovení markerů (převzato a upraveno dle [90], [91]).

| Nádorový marker | Místo nádorového bujení | Odběrový materiál |
|--------------------------------------|---|-------------------|
| α -fetoprotein (AFP) | Játra, varlata | Krev |
| Karcino-embryonální antigen (CEA) | Játra, slinivka břišní, plíce, žaludek, srdce | Krev |
| Prostatický specifický antigen (PSA) | Prostata | Krev |
| Nádorový antigen (CA) 125 | Vaječníky | Krev |
| CA 19.9 | Tlusté střevo | Krev |
| CA 15.3 | Prsa | Krev |

Biomarkery lze využít k odhadu rizika onemocnění (např. mutace *BRCA* genu), vyhledávání časných stádií nádorového procesu (např. PSA), k rozlišení benigních a maligních nálezů, dále také k monitorování průběhu onemocnění (účinnost terapie, zjištění relapsu) a ke stanovení prognózy onemocnění. Většinu nádorových markerů ve snížené míře produkují i zdravé buňky, proto je u každého markeru nutné zjistit fyziologické hladiny a následně určit, od které hodnoty již budou výsledky považovány za patologické. V časných stádiích nádorových onemocnění nemusí být markery vždy přítomné a jejich zvýšená hladina nemusí vždy nutně znamenat

nádorové onemocnění [89]. V Tabulce 4 je také vidět, že ne každý nádorový marker je specifický pouze pro dané místo či orgán. Každý rok je identifikováno vysoké množství nádorových markerů, ale jen několik z nich může být nakonec klinicky využito. Ideální nádorový marker by měl mít následujících 7 vlastností:

- Specifická produkce v premaligní či maligní tkáni v časné fázi onemocnění
- Detekovatelné hladiny u všech pacientů s daným onemocněním
- Exprese ve specifickém místě či orgánu
- Přítomnost v tělesných tekutinách, které lze nejlépe neinvazivně odebrat, případně přítomnost ve snadno dostupné tkáni
- Hladiny kvantitativně korelující s objemem nádorů, biologickým chováním či progresí onemocnění
- Relativně krátký čas rozpadu, který odráží časové změny v nádorové zátěži a odpovědi na terapii
- Existence standardizovaného, reprodukovatelného a ověřeného kvantitativního testu

Žádný momentálně využívaný marker všechny tyto vlastnosti nesplňuje. Pokud se nádorový marker využívá k vyhledávání časných stádií nádorových procesů („*screening*“), mezi další požadované charakteristiky patří možnost neinvazivního a bezpečného odběru biologického materiálu, levné, vysoce výkonné, validované a standardizované testy a relativně vysoká senzitivita a specifita, aby došlo k minimalizaci počtu falešně pozitivních i falešně negativních výsledků [92].

Následná část textu bude zaměřena na konkrétní biomarker spojený s mnohočetným myelomem – enzym enolázu 1 a také na další možný biomarker, autoprotilátky proti enoláze 1.

1.3.1. Enzym enoláza 1

Enoláza (ENO), dalšími názvy také 2-fosfo-D-glycerátdehydratáza či fosfoenolpyruváthydratáza, je enzym, který se účastní glykolýzy. Konkrétně se podílí na předposledním kroku glykolýzy, tj. na přeměně 2-fosfo-D-glycerátu na fosfoenolpyruvát. Enoláza má celkem 4 izoenzymy, značené jako ENO1 až ENO4. ENO1 (též α -enoláza) tvoří 90 % celkové enolázové aktivity v glykolýze, je exprimována ve většině lidských tkání

a vyskytuje se také u nesčetných typů nádorů. Právě díky svému majoritnímu zastoupení v glykolýze je celková enoláza často rovnou nahrazována tímto izoenzymem. ENO2 (též β -enoláza či neuron-specifická enoláza) je exprimována primárně v neuronech, případně u neuroendokrinních nádorů, ENO3 (též γ -enoláza) je exprimována ve svalech a ENO4 se vyskytuje v oblasti bičíku spermie, kde napomáhá k sestavení vazivového pouzdra.

ENO1 se nachází na povrchu buněk i v cytoplazmě. Kromě primární funkce v glykolýze se dále podílí na organizaci mikrotubul a mezifázového cytoskeletu. V cytoplazmě udržuje stabilitu mitochondriální membrány a reguluje také intracelulární signální dráhy. Co se týče extracelulárního prostoru, zde buď asociuje s exozomy nebo je vylučována jako rozpustný protein [17].

1.3.1.1 Role enolázy 1 v nádorových buňkách

Svým zapojením do glykolýzy dereguluje ENO1 buněčnou energii, podporuje proliferaci a inhibuje apoptózu nádorových buněk. U nádorových buněk je častý Warburgův efekt, který je podrobně popsán v podkapitole 1.1.1. Kromě enolázy jsou u nádorových buněk nadměrně exprimovány také další enzymy glykolýzy, kterými jsou např. hexokináza či fosfofruktokináza [93].

ENO1 působí na povrchu buňky jako receptor pro plazminogen, který podporuje angiogenezi a je spojen s vyšší invazivitou a možností tvorby metastáz v jiných tkáních. Plazminogen je po vazbě na ENO1 přeměněn na plazmin, který je aktivován při zánětlivém procesu. Následkem aktivace dochází k lýze fibrinu a k degradaci extracelulární matrix [94]. Tento proces často využívají také bakterie, aby se snadno dostaly do hostitelských tkání [95]. ENO1 dále také indukuje transformaci epiteliálních buněk na mezenchymální. Během tohoto přechodu dochází ke ztrátě polarity a adheze mezi epiteliálními buňkami, což umožní jejich migraci, proliferaci a diferenciaci do dalších tkání a orgánů [96]. ENO1 také přispívá k orgánové fibróze, terapeutické rezistenci, zánětu a imunosupresi [97]. Tento proces byl zatím popsán u nádorů plic [98] a žaludku [99].

ENO1 je bifunkční gen, který kromě proteinu ENO1 kóduje i vazebný protein DNA, který se nazývá c-MYC vazebný protein 1 (MBP1). ENO1 a MBP1 vzájemně interagují pomocí onkoproteinu c-MYC. Tento onkoprotein dereguluje glykolýzu aktivací několik složek metabolické dráhy glukózy, včetně nadměrné zvýšené exprese ENO1 [100]. MBP1 naopak při

buněčném stresu a nízké hladině glukózy buněčnou proliferaci, migraci a invazi zpomaluje. Může také indukovat buněčnou smrt podobnou nekróze [101]. Při hypoxii nádorových buněk dochází ke zvýšené expresi proteinu c-MYC, čímž dochází ke zvýšení hladiny ENO1 a snížení hladiny MBP1 [102]. Prokázaná korelace mezi poklesem MBP1 a zhoršením prognózy onemocnění byla zatím potvrzena pouze u karcinomu prsu [103].

1.3.1.2 Enoláza 1 jako diagnostický a prognostický marker

Výskyt vně i uvnitř buňky činí z ENO1 vhodný nádorový marker, jak z hlediska prognózy a diagnostiky, tak také jako potenciálně dostupný onkoterapeutický cíl. Další významnou vlastností je rozdílná míra exprese ve zdravých a nádorových buňkách. Nádorové buňky exprimují ENO1 v nadměrné míře, zdravé buňky mají naopak expresi ENO1 nízkou. Posledním důležitým znakem je možná korelace mezi nadměrnou expresí ENO1 a horší prognózou onemocnění – toto tvrzení bylo doposud dokázáno např. u karcinomu plic, prsu, pankreatu a také u kolorektálního a hepatocelulárního karcinomu [17]. V Tabulce 5 je zachyceno využití ENO1 jako prognostického či diagnostického markeru u jednotlivých typů nádorů [104].

Tabulka 5: Výskyt ENO1 u jednotlivých typů nádorů a jejich význam jako biomarker nádorového bujení (převzato a upraveno dle [104]).

ENO1 – enoláza 1

| Místo/typ nádorového bujení | Molekula | Biomarker | Literatura |
|-----------------------------|----------|--------------------------------|---|
| Močový měchýř | ENO1 | Prognostický | Ji et al., 2019 [105] |
| Prsa | ENO1 | Prognostický | Tu et al., 2010 [106]; Cancemi et al. 2019 [107] |
| Kolorektální oblast | ENO1 | Prognostický | Zhan et al., 2017 [108] |
| Žaludek | ENO1 | Prognostický | Qian et al., 2017 [109]; Qiao et al., 2019 [110]; Sun et al., 2019 [111]; Xu et al., 2019 [112] |
| Hlava a krk | ENO1 | Prognostický | Tsai et al., 2010 [113] |
| Játra | ENO1 | Prognostický i diagnostický | Takashima et al., 2005 [114]; Hamaguchi et al., 2008 [115]; Zhang et al., 2020 [116] |
| Plíce | ENO1 | Prognostický i diagnostický | Chang et al., 2006 [117]; He et al., 2007 [118]; Dai et al., 2017 [119]; Zhang et al., 2018 [120]; |
| Slinivka břišní | ENO1 | Prognostický | Tomaino et al., 2011 [121]; Sun et al., 2017 [122]; Yin et al., 2018 [123]; Wang et al., 2019 [124]; |
| Mnohočetný myelom | ENO1 | Prognostický | Ray et al., 2020 [125] |
| Non-Hodkingové lymfomy | ENO1 | Prognostický | Zhu et al., 2015 [126] |

1.3.1.3 Enoláza 1 jako terapeutický cíl

ENO1 umožňuje urychlit proces nádorového bujení podporou glykolýzy a aktivací onkogenních signálních drah. Působí také jako hnací síla migrace a invaze nádorových buněk a podporuje tvorbu metastáz [17]. V roce 2013 Jung *et al.* popsali první inhibitor různých izoform enolázy, tzv. ENOblock [127]. Specifičnost tohoto inhibitoru byla však o 3 roky

později zpochybněna [128]. V roce 2018 navrhli Wang *et al.* léčivo pHCT74, které cílí na ENO1 a používá se v kombinaci s doxorubicinem [129]. Novější studie týkající se účinnosti léčiva pHCT74 zatím nebyly publikovány. V roce 2022 publikovali Chen *et al.* studii o protilátce, která cílí na ENO1 u pokročilého karcinomu prostaty. Léčivo, nazývané jako HuL227, působilo na snižování objemu i hmotnosti nádoru, bylo schopné inhibovat angiogenezi a také zánětem aktivovanou migraci při dávkování dvakrát týdně [130]. Huang *et al.* v roce 2023 navázali na využití tohoto léčiva (které bylo publikováno již pouze pod názvem HL227) v případě plicního zánětu a fibrózy. Po jeho použití docházelo k utlumení fibrózy. V obou studiích byla účinnost léčiva zatím zjišťována pouze na myších modelech [131].

1.3.2. Autoprotilátky proti enoláze 1

Jak již bylo řečeno, nádorové buňky oproti zdravým exprimují ENO1 ve zvýšené míře. Nadměrnou expresí tohoto enzymu může dojít k produkci autoprotilátek proti enoláze 1 (anti-ENO1). Již na začátku 21. století bylo zjištěno, že se anti-ENO1 nachází u různých autoimunitních a zánětlivých onemocnění, jakými mohou být např. systémový lupus erytematodes (SLE), revmatoidní artritida, systémová skleróza, Bechtěrevova choroba, ulcerózní kolitida, Crohnova choroba či retinopatie [132]. V patogenezi revmatoidní artritidy se objevují anti-ENO1 třídy IgG1 a IgG3, u SLE jde o protilátky třídy IgG2, v případě Bechtěrevovy choroby může k diferenciální diagnostice přispět titrace anti-ENO1 třídy IgM. U ulcerózní kolitidy a systémové sklerózy jsou obvykle nacházeny autoprotilátky anti-ENO1 třídy IgG1 nebo IgG2 [133]. V roce 2010 publikovali Sarapik *et al.* studii, která prokázala spojení anti-ENO1 protilátek také s endometriózou, předčasným selháním vaječníků a s astmatem [134]. V Tabulce 6 je zachyceno využití autoprotilátek anti-ENO1 jako prognostického či diagnostického markeru u jednotlivých typů nádorů [104].

Tabulka 6: Výskyt anti-ENO1 u jednotlivých typů nádorů a jejich význam jako biomarker nádorového bujení (převzato a upraveno dle [104]).

Anti-ENO1 – protilátky proti enoláze 1

| Místo/typ nádorového bujení | Molekula | Biomarker | Literatura |
|------------------------------------|-----------|-----------------------------|---|
| Hlava a krk | Anti-ENO1 | Prognostický | Pranay et al., 2013 [135] |
| Játra | Anti-ENO1 | Prognostický i diagnostický | Zhang et al., 2020 [115] |
| Plíce | Anti-ENO1 | Prognostický i diagnostický | He et al., 2007 [117]; Shih et al., 2010 [136]; Hsiao et al., 2015 [137]; Dai et al., 2017 [118]; Zhang et al., 2018 [119]; Zang et al., 2019 [138]; |
| Slinivka břišní | Anti-ENO1 | Prognostický | Tomaino et al., 2011 [120] |
| Retinopatie asociovaná s rakovinou | Anti-ENO1 | Prognostický | Adamus et al., 1998 [139] |
| Chronická lymfatická leukémie | Anti-ENO1 | Prognostický | Griggio et al., 2017 [140] |

Se vzestupem anti-ENO1 autoprotiátok se pojí i některé infekční choroby, konkrétně byly popsány případy zánětu středního ucha způsobené *Streptococcus pneumoniae*, ať už samotnou bakterií, tak také při souběžné kolonizaci s kvasinkou *Candida albicans*. Dalším infekčním stavem je i poststreptokoková revmatická horečka, kde se v rámci terapie využívá plazmaferéza k odstranění anti-ENO1 autoprotiátok. Výskyt anti-ENO1 u infekcí je obvykle předzvěstí komplikací či možnou tvorbou specifických tkáňových lézí v těle pacienta [134].

V roce 2007 byla publikována studie Magrys *et al.*, která zachycuje roli anti-ENO1 protiátok v patogenezi retinopatie. Předchozí studie těchto autorů zjistily, že autoprotiátky proti α -enoláze jsou schopné indukovat apoptózu buněk sítnice *in vitro* i *in vivo*. Tato studie přinesla významnou informaci o tom, že anti-ENO1 jsou schopné blokovat katalytickou funkci ENO1, snižovat množství ATP v buňkách a zároveň také zvyšovat intracelulární vápenaté ionty. Tato souvislost zatím bohužel není u smrti indukované patologickými protiátkami více prozkoumána [141].

Studie Tomain *et al.* z roku 2011 uvádí, že ve zdravých tkáních slinivky břišní byly nalezeny celkem 4 izoformy ENO1 (značené jako ENOA3, ENOA4, ENOA5 a ENOA6), které měly všechny podobnou molekulovou hmotnost 47 kDa. U pacientů s pankreatickým duktálním adenokarcinomem (PDAC) byla exprese těchto 4 izoform přibližně 2x vyšší. Zároveň u nich byly nalezeny ještě další dvě izoformy (značené jako ENOA1 a ENOA2). 62 % pacientů s PDAC produkovalo autoprotilátky proti ENOA1 a ENOA2. Pacienti s těmito autoprotilátkami měli významně nižší riziko progresu onemocnění či úmrtí ve srovnání s pacienty, u kterých se nacházely autoprotilátky pouze proti izoformám ENO1, které se vyskytují i ve zdravé tkáni. Dalším zajímavým výsledkem byla skutečnost, že autoprotilátky anti-ENOA1 a anti-ENOA2 se nacházely i u pacientů s PDAC, kteří měli zároveň normální hodnoty dalšího nádorového markeru (CA 19.9) v séru. Jedná se však o biomarker, který neposkytuje dostatečnou specifitu a ani senzitivitu. Navíc může být zvýšen i při akutní či chronické pankreatitidě, hepatitidě či obstrukci žlučových cest, i jiných typech zánětů. Kombinace stanovení jak CA 19.9, tak i anti-ENOA1 a anti-ENOA2 by tedy mohla být přesnějším diagnostickým nástrojem, než stanovení samotného CA 19.9 a také potenciální screeningovou metodou pro nádory slinivky břišní do budoucna [120]. Curcio *et al.* k tématu PDAC v roce 2023 doplnili opačnou informaci o roli anti-ENO1 autoprotilátek a popsali skutečnost, že vysoké hladiny anti-ENO1 jsou negativním prognostickým faktorem [142].

Studie Hsiao *et al.* z roku 2015 zkoumala anti-enolázové autoprotilátky jako možný prognostický marker u pacientů s pooperačním nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC). Bylo zjištěno, že hladiny anti-ENO1 autoprotilátek u zdravých dárců a pacientů před operací byly odpovídající. Při následném porovnání hodnot měsíc po operaci byla u většiny pacientů hladina anti-ENO1 autoprotilátek zvýšena. Tento výsledek naznačuje tomu, že existence nádoru významně ovlivňuje hladiny anti-ENO1 v krvi. Přibližně u 30 % pacientů s NSCLC dochází k recidivě, která se nejčastěji objeví během prvních dvou let od provedení operace. Proto byla následně sledována možná korelace mezi recidivou onemocnění a změnami v hladinách anti-ENO1 autoprotilátek. Zde bylo zjištěno, že pacienti bez recidivy mají vyšší hodnoty anti-ENO1 autoprotilátek oproti pacientům, u kterých onemocnění znovu propuklo [137].

V roce 2017 zkoumali nemalobuněčný karcinom plic a možné zvýšení senzitivity zachycení onemocnění při kombinaci nádorových markerů CEA, CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19) a autoprotilátek anti-ENO1 také Dai *et al.* Anti-ENO1 byly zachyceny u 35,1 % pacientů

s NSCLC. Nádorový marker CEA byl zachycen u 48,7 % pacientů s NSCLC, marker CYFRA 21-1 dokonce u 61,2 % pacientů. Po zkombinování anti-ENO1 s CEA nebo CYFRA 21-1 se frekvence výskytu zvýšila na 68,7 %, respektive na 76,5 %. Při detekci všech tří biomarkerů frekvence dosáhla dokonce 84 %. Tento výsledek naznačuje, že by autoprotilátka anti-ENO1 mohla potenciálně působit jako komplementární klinický biomarker právě v kombinaci s nádorovými proteiny, jakými jsou CEA a CYFRA 21-1 [118].

Studie Griggio *et al.*, také z roku 2017, zkoumala imunitní reakce na nádorové antigeny u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). ENO1 byla nejrelevantnějším antigenem, který byl sérem pacientů s CLL rozpoznáván. Anti-ENO1 autoprotilátky byly zachyceny u 54 % pacientů. Přítomnost těchto autoprotilátek nebyla spojena s výskytem klinických autoimunitních projevů a byly častěji detekovány v séru pacientů s progresivním onemocněním než u pacientů stabilizovaných. U pacientů s pozitivními autoprotilátkami byl významně zkrácený čas do první nutné léčby (7 měsíců), než u pacientů bez nich (107 měsíců). Jedním z možných důvodů rozdílného klinického dopadu anti-ENO1 autoprotilátek u solidních nádorů a u CLL je to, že ENO1 je ve zvýšené míře exprimovaná intracelulárně, ale ne na buněčné membráně. I přes to, že není známo, jak se může vnitřní autoantigen stát imunogenní, předpokládá se, že v průběhu apoptózy leukemických buněk dochází ke zviditelnění antigenu a k následné autoreaktivní imunitní reakci [140].

Zhu *et al.* publikovali v roce 2018 studii na téma ENO1 a rakoviny jater. Zde bylo zjištěno, že je ENO1 u hepatocelulárního karcinomu jater exprimována ve zvýšené míře. Vysoká hladina ENO1 byla spojena s pokročilým stádiem rakoviny a pacienti s vyššími hladinami měli kratší celkové přežití, než pacienti s nižší expresí [143]. Na tuto studii navázali v roce 2020 Zhang *et al.*, kteří zjistili, že exprese ENO1 je vyšší v maligní jaterní tkáni než v případě benigních jaterních lézí. V případě pacientů s rakovinou jater byly rovněž vyšší autoprotilátky anti-ENO1 v porovnání s benigními lézemi a kontrolní skupinou. Stejně jako studie Griggio *et al.* hovoří o tom, že je mechanismus tvorby protilátek stále nejasný. Proces buněčné smrti u nádorových buněk způsobuje možnou trvalou expozici intracelulárnímu antigenu. Ten následně prochází posttranslačními modifikacemi a remodelacemi, což stimuluje imunitní systém k produkci autoprotilátek. Současně tvrdí, že k této imunitní odpovědi dochází již v časném stádiu nádorového onemocnění, produkovaná autoprotilátka má poté v periferní krvi stabilní titr a mohla by být použita jako možný nádorový marker [115].

Studie Lincz *et al.* z roku 2024 se zabývá expresí ENO1 a hladinami anti-ENO1 autoprotiáték u pacientů s myelodysplastickým syndromem a akutní myeloidní leukémií (AML). Zvýšená exprese ENO1 u pacientů s AML byla významně spojena se špatnou prognózou. Autoprotiátky anti-ENO1 byly detekovány u 80,8 % vzorků, nižší hladiny cirkulující anti-ENO1 byly nalezeny u pacientů s AML. Pacienti s AML byli následně rozděleni podle evropské klasifikace do tří skupin (příznivá, středně příznivá a nepříznivá prognóza). Hladiny anti-ENO1 byly nejnižší u pacientů s nepříznivou prognózou, významně se však od dalších dvou skupin nelišily. Hladiny anti-ENO1 byly následně zkoumány i ve vztahu k celkovému přežití pacientů s AML (u 20 pacientů ze 34 došlo během dvou let ke smrti), ani zde však nebyly nalezeny rozdíly mezi pacienty s nízkou a vysokou hladinou cirkulujících autoprotiáték anti-ENO1 [144].

Závěrem lze poznamenat, že ani v jedné z těchto studií nebyla nalezena korelace mezi hladinami anti-ENO1 a pohlavím, věkem či klinickým stádiem. Pouze ojediněle byla nalezena spojitost mezi prognózou vývoje onemocnění a hladinou anti-ENO1 (ať u negativní či pozitivní), jde tedy stále o oblast aktivního výzkumu. Je tedy nutné čekat na nové studie, aby bylo možné autoprotiátky zařadit mezi potenciální diagnostické či prognostické nádorové markery.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo provést:

- 1) Optimalizaci podmínek Western-Blot metody s využitím zařízení Turbo-Blot
- 2) Použít optimalizovaný postup 2D-WB s imunochemickou detekcí (SERPA) pro průkaz a monitoring výskytu specifických anti-ENO1 IgG molekul v lidském séru
- 3) Ověřit postup normalizace metody 2D-WB s imunochemickou detekcí (SERPA) pro průkaz anti-ENO1 IgG protilátek pomocí vnitřního standardu (β -aktinu)
- 4) Proměřit vzorky sér pacientů a zdravých jedinců s cílem vyhodnotit klinickou významnost výskytu těchto protilátek v séru léčených pacientů v době diagnózy a v průběhu onemocnění
- 5) K vyhodnocení výsledků a jejich statistické významnosti použít vhodné bioinformatické nástroje

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam laboratorního vybavení

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- Analyzátor Beckman Coulter Multisizer™ 4e Coulter Counter (Beckman Coulter, Indianapolis, USA)
- Aparatura pro diskontinuální elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, CA, USA)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Blotovací nitrocelulózová membrána (NC) Trans-Blot® Transfer Medium, porozita 0,2 µm (Bio-Rad, CA, USA)
- Centrifugační zařízení MiniSpin Plus (Merck, Eppendorf, Darmstadt, Německo)
- Destilační zařízení pro úpravu čistoty vody (zásobník s redestilovanou vodou) Halios 40 Type 1 (Neptec, Elbtal, Německo)
- Gelové proužky s imobilizovaným gradientem pH Immobiline™ DryStrip pH 3–10 NL, 7 cm (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
- Krycí skla Mini-PROTEAN® Short Plates (Bio-Rad, CA, USA)
- Laboratorní třepačky: multifunkční Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko), Vortex mixer Wx (VELP Scientifica, Usmate, Italy), Mini-rotátor Bio RS-24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- Mikrozkuřavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Skla Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 1,0 mm Integrated Spacers (Bio-Rad, CA, USA)
- Svářečka folií Freshie 1762 a plastové fólie (Eta, Praha, ČR)

- Špičky Eppendorf GELoader (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Termostat (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, CA, USA)
- Ultrasonikátor UP200H (Hielsches, Teltow, Německo)
- Zařízení pro izoelektrickou fokuzaci PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, CA, USA)
- Zdroj napětí Power-Pac Basic (Bio-Rad, CA, USA)
- Zobrazovací systém G:BOX Chemi XX6 (CCD kamera s GeneSys a GeneTools softwary) (Syngene, USA)

3.2 Seznam chemikálií

- 2x Laemmli Sample Buffer (roztok G, BioRad, CA, USA)
- 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat – CHAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Aktin from rabbit muscle (původ králíčí, A9044, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, ČR)
- Butanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Citronan sodný (LachNer, Neratovice, ČR)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg, Německo)
- Destilovaná voda, redestilovaná voda
- DeStreak Reagent, hydroxyethyl disulfid (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dithiothreitol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodecylsírán sodný, SDS (Lachema, Neratovice, ČR)
- DPBS, Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Dusičnan stříbrný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Fenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Formaldehyd (Penta, Chrudim, ČR)
- Glutaraldehyd 50% ve vodě (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycerol (Penta, Chrudim, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Hexakynoželozitan tridraselný (Penta, Chrudim, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydroxid amonný (Penta, Chrudim, ČR)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid draselný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Inaktivační médium (80% RPMI 1640, 20% FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Jodacetamid, IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kultivační médium pro RPMI-8226 (90% RPMI 1640, 10% FBS, 2mM glutamin, penicilin 50 µl/ml, streptomycin 50 µl/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Kyselina citronová bezvodá (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina octová 99% (Penta, Chrudim, ČR)
- Methanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Minerální olej (Bio-Rad, CA, USA)
- Močovina (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, TEMED (Bio-Rad, CA, USA)
- N,N'-methylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Odtučněné sušené mléko (Nutristar, Praha, ČR)
- PBS pH 7,2 (10x, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Peroxodisíran amonný, APS (Penta, Chrudim, ČR)
- Síran železnatý heptahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Směs amfolytů Pharmalyte pH 3–10 pro IEF (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)

- Směs amfolytů Pharmalyte pH 8–10,5 pro IEF (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko)
- Standard molekulových hmotností (10–250 kDa) Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, USA)
- Substrát Clarity Western ECL (Enhanced Chemiluminescence, luminol, peroxid vodíku, Bio-Rad, CA, USA)
- Thiomočovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Thiosíran sodný (Sigma, St. Luis, MO, USA)
- Trans-Blot Turbo RTA Mini 0.2 μ m Nitrocellulose Transfer Kit, for 40 blots (Bio-Rad, CA, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.3 Seznam biologického materiálu

3.3.1 Biologicky aktivní látky

- Protilátka anti- β -aktin (původ myši, A5316, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Protilátka anti-human IgG (WM, HRP, původ kozí, A8667, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Protilátka anti-human IgG (H+L) (HRP, původ kozí, 172-1050, Bio-Rad, CA, USA)
- Protilátka anti-mouse IgG (HRP, původ králíčí, A9044, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.3.2 Nádorové buněčné linie

- RPMI-8226 (Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)

3.3.3 Vzorky patientských sér

- Sérum pacientky s mnohočetným myelomem s velmi silnou a specifickou imunoreaktivitou (Klinika hematologie a transfúziologie LF UK, SZU a UNB)

Tato pacientka s diagnostikovaným mnohočetným myelomem má vysoce a specificky imunoreaktivní anti-ENO1 protilátky. Odběr krve probíhal v období dlouhodobé remise. Mnohočetným myelom byl pacientce diagnostikován v lednu 2002, v Národním onkologickém ústavu v Bratislavě podstoupila chemoterapii a autologní transplantaci kmenových buněk. Po léčbě došlo k částečné remisi a také k rozvoji sekundární amyloidózy. Během let 2004-2005 došlo u pacientky k relapsu a byla léčena IFN- α . Léčba však byla kvůli intoleranci přerušena, pacientka je stále v částečné remisi a je nadále pozorována.

- Séra dobrovolných dárců bez nádorového a autoimunitního onemocnění (Katedra biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice)

Séra byla od ZD ve věku 50 až 75 let, kteří v době odběru netrpěli nádorovým ani autoimunitním onemocněním. Dárci byli poučeni o účelu, za kterým se vzorek odebírá

a podepsali informovaný souhlas. Vzorky krve byly odebrány odborným pracovníkem laboratoře MeDiLa spol. s r.o.

- Séra pacientů s mnohočetným myelomem (Biobanka Kliniky hematologie Fakultní nemocnice v Ostravě)

Všichni pacienti byli poučeni o účelu, za kterým se vzorky odebírají a podepsali informovaný souhlas (viz Příloha 2). Všechny vzorky byly označeny kódem, společně s touto informací bylo uvedeno také pohlaví pacienta a datum odběru.

3.4 Sérologická proteomová analýza (SERPA)

3.4.1 Příprava suché pelety buněk

Přístroje a pomůcky:

- Centrifuga, zkumavky, pipety, špičky, kultivační lahvička, kryozkumavka, analyzátor Beckman Coulter, termostat

Reagencie a roztoky:

- DPBS, inaktivační médium, kultivační médium

Biologický materiál:

- Nádorová buněčná linie RPMI-8226

Pracovní postup:

Buňky nádorové buněčné linie RPMI-8226 se vyndají z tekutého dusíku a rozmrazí se ve vodní lázni. Po rozmrazení se buňky přenesou do zkumavky se 3 ml inaktivačního média. Následuje centrifugace při 1500 otáčkách po dobu 5 minut. Po odstředění se odebere supernatant, peleta na dně zkumavky se resuspenduje v 1 ml kultivačního média. Celý obsah zkumavky se přeneso do kultivační lahvičky, kam se přidá ještě dalších 9 ml kultivačního média. Kultivace buněk trvá 4 dny.

Po ukončení kultivace se pipetou do nové zkumavky odebere použité kultivační médium, dno kultivační lahvičky se opláchne 3 ml DPBS, aby došlo k uvolnění buněk, které přisedly na dno. DPBS s uvolněnými buňkami se přeneso do zkumavky se zbytkem použitého média. Následuje centrifugace při 1500 otáčkách po dobu 5 minut. Po odstředění se odebere supernatant, peleta na dně zkumavky se resuspenduje v 5 ml DPBS. Ke zjištění počtu buněk se odebere 100 μ l směsi, která se vloží do analyzátoru. Po zjištění počtu buněk se daný objem přeneso do kryozkumavky a opět následuje centrifugace při 1500 otáčkách po dobu 5 minut. Po odstředění se odebere DPBS, peleta na dně zkumavky zůstává. Kryozkumavka se následně třikrát ponoří do tekutého dusíku a uchovává se v -80 °C.

3.4.2 Příprava buněčného lyzátu

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, vortex, minicentrifuga, sonikátor, pipety, špičky, zkumavky, buničina

Reagencie a roztoky:

- Lyzační roztok (7M močovina, 2M thiomočovina, 4% CHAPS, 1% DTT, 0,2% Pharmalyte 3–10, 1mM PMSF)
- Ethanol

Biologický materiál:

- Suchá peleta buněk RPMI-8226 (5×10^6 buněk, uskladněno v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v kryozkumavce)

Pracovní postup:

Prvním krokem je příprava části lyzačního roztoku. Na přípravu 5 ml této směsi se naváží 2,1 g močoviny, 0,76 g thiomočoviny a 0,2 g CHAPS. Objem směsi se doplní na 5 ml destilovanou vodou, alikvoty se následně skladují po 450 μl v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím je nutné alikvot rozmrazit a důkladně protřepat z důvodu přítomných krystalů močoviny. Do zkumavky se naváží 0,004 g DTT, přidá se 400 μl rozmrazené směsi, 8 μl Pharmalyte 3–10 a 4 μl PMSF. Po řádném rozpuštění DTT je roztok připraven.

Suchou peletu buněk je nutné postupně rozmrazovat. Nejprve se z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dává do mrazáku ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), poté se přemístí do lednice ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a teprve poté se s peletou za laboratorní teploty pracuje. 400 μl kompletního lyzačního roztoku se napipetuje do kryozkumavky a důkladně se pipetou promíchá s peletou buněk. Směs lyzačního roztoku a buněk se přenese do nové zkumavky a následuje sonikace, která se provádí za účelem rozrušení buněk a uvolnění intracelulárního obsahu do roztoku. Jehla sonikátoru se před použitím otírá buničinou s ethanolem. Podmínky sonikace jsou následující: cyklus 1, amplituda 80 %, čas 17 sekund. Po sonikaci se opět jehla sonikátoru očistí stejným způsobem a následuje centrifugace při 12 300 rpm po dobu 10 minut. Po centrifugaci se supernatant odebere do nové zkumavky, původní zkumavka obsahující buněčnou peletu se vyhodí. Buněčný lyzáat je možné ihned využít k rehydrataci gelových proužků, případně lze uchovávat v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a použít později.

3.4.3 Rehydratace gelových proužků

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, gelové proužky Immobiline DryStrip (pH 3–10 NL, 7 cm), plastová kazetka, pinzety, stanice PROTEAN® IEF Cell, pipety, špičky, vortex

Reagencie a roztoky:

- Rehydratační roztok (6M močovina, 2M thiomočovina, 4% CHAPS, 40mM Tris, 1,2% DeStreak, 1% bromfenolová modř)
- Pharmalyte 3–10
- Pharmalyte 8–10,5
- Minerální olej

Biologický materiál:

- Buněčný lyzát buněk RPMI-8226

Pracovní postup:

Prvním krokem je příprava rehydratačního roztoku. Na přípravu 5 ml roztoku se naváží 1,8 g močoviny, 0,76 g thiomočoviny, 0,2 g CHAPS a 0,024 g TRIS. Následně se přidá 60 µl Destreak a 10 µl bromfenolové modři. Objem směsi se doplní na 5 ml destilovanou vodou a alikvoty se následně skladují po 750 µl v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím je nutné alikvot rozmrazit a důkladně protřepat z důvodu přítomných krystalů močoviny.

Objem směšného roztoku pro rehydrataci gelových proužků se odvíjí od jejich počtu. Na 1 proužek se do zkumavky napipetuje 80 µl rehydratačního roztoku, 60 µl buněčného lyzátu 1,3 µl Pharmalyte 3–10 a 0,65 µl Pharmalyte 8–10,5. Pro rehydrataci se používá bílá plastová kazetka, do jedné jamky (na 1 proužek) se dává 120 µl směšného roztoku.

Gelové proužky se uchovávají v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do směšného roztoku se gelové proužky vkládají pinzetou, gelovou stranou dolů a následně se převrstvují 1 ml minerálního oleje. Pod proužky nesmí být vzduchové bubliny. Připravená kazetka se uzavře a umístí se do stanice PROTEAN® IEF Cell, kde se nastavuje program REHYDRATATION → PASSIVE ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$, bez proudu) → START. Rehydratace gelových proužků trvá 16–18 hodin, zahajuje se obvykle odpoledne okolo

15. hodiny a končí následující den ráno okolo 8. hodiny. Následně se pokračuje v izoelektrické fokuzaci.

3.4.4 Izoelektrická fokuzace (IEF)

Přístroje a pomůcky:

- Gelové proužky Immobiline DryStrip (pH 3–10 NL, 7 cm), proužky filtračního papíru pro IEF (velikost cca 2 × 7 mm), kazetka pro IEF, pinzety, filtrační papíry, fólie, stanice PROTEAN® IEF Cell, pipety, špičky

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Minerální olej

Pracovní postup:

Proužky filtračního papíru pro IEF je nutné navlhčit destilovanou vodou a položit na drátky elektrod v kazetce pro IEF. Gelové proužky se po rehydrataci opláchnou stříčkou s destilovanou vodou a osuší se filtračním papírem, bez dotyku gelové strany. Gelové proužky se do kazetky vkládají pinzetou, gelovou stranou dolů a následně se převrstvují 1 ml minerálního oleje. Pod proužky nesmí být vzduchové bubliny. Připravená kazetka pro IEF se uzavře a umístí se do stanice PROTEAN® IEF Cell, kde se nastavuje program STORED METHOD → 3–10 RYCHLE → RUN METHOD → zadat počet proužků → nastavit 75 μ A/gel → START. IEF trvá okolo 8 hodin, před ukončením je nutné hlídat volthodiny (Vh). Při hodnotě mezi 9 000 až 10 000 Vh proces IEF končí. Úspěšnou fokuzaci indikuje žluté zbarvení na konci gelových proužků. Ty se po IEF opláchnou stříčkou s destilovanou vodou a osuší se filtračním papírem, opět bez dotyku gelové strany. Suché proužky se vkládají do bílé kazetky (ideálně po 2 nebo 4 ks), kazetka se uzavře, popíše a zabalí do fólie. Připravené gelové proužky se uchovávají v -20 °C.

3.4.5 Gelová elektroforéza

1) Gelová elektroforéza SDS-PAGE následující po IEF

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, třepačka, vortex, 1 mm skla, 1 mm hřebínky, aparatura pro přípravu gelů, perlan, parafilm, nůžky, pipety, špičky, zkumavky, víčka na zkumavky, plastové misky, fólie, gelové proužky po IEF, pinzety, kovová špachtle, filtrační papír, alobal, elektroforetická vana, pH metr, termostat, třepačka

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Ethanol
- Roztok A (30% směs akrylamidu a bisakrylamidu)
- Roztok B (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)
- Roztok C (1M Tris-HCl, pH 6,8)
- Roztok D (10% roztok SDS)
- Roztok E (10% roztok APS)
- TEMED
- Ekvilibrační roztok (6M močovina, 30% glycerol, 0,07M SDS, 1,5M Tris-HCl, pH 8,8)
- 1% DTT v ekvilibračním roztoku
- 4% IAA v ekvilibračním roztoku
- 0,5% agaróza
- Elektrodový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3–8,6)
- Standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein Dual Color Standards)

Pracovní postup:

Prvním krokem je příprava roztoků, ze kterých se následně připravují gely pro elektroforézu (viz Tabulka 7). Před použitím je nutné alikvot roztoku E rozmrazit, roztok D je při 4 °C

v pevném stavu, musí se před použitím vložit do teplé vody. Před použitím by měly mít roztoky laboratorní teplotu a ideálně být i dostatečně promíchány na vortexu.

Tabulka 7: Příprava roztoků na gely.

HCl – kyselina chlorovodíková, SDS – dodecylsírán sodný, APS – peroxodisíran amonný.

| Roztok | Příprava | Uchování |
|---------------|--|--|
| Roztok A | 11,68 g akrylamidu, 0,32 g bisakrylamidu, 12 ml destilované vody; 30 minut na třepačce (nabobtnání), poté doplnění destilovanou vodou na 40 ml | 4 °C (lednice) |
| Roztok B | 7,26 g Tris, doplnění destilovanou vodou na 40 ml, úprava pH pomocí 6M HCl na 8,8 | 4 °C (lednice) |
| Roztok C | 4,84 g Tris, doplnění destilovanou vodou na 40 ml, úprava pH pomocí 6M HCl na 6,8 | 4 °C (lednice) |
| Roztok D | 1 g SDS, doplnění destilovanou vodou na 10 ml | 4 °C (lednice) |
| Roztok E | 0,1 g APS, doplnění destilovanou vodou na 1 ml | -20 °C (mrazák), aliquoty po 250 µl |

Pro přípravu gelů se musí dostatečně umýt a očistit 1 mm skla (pomocí perlanu či ubrousku s ethanolem). Skla se vkládají do aparatury pro přípravu gelů, ze spodní strany se zalepí parafilmem. Objemy jednotlivých roztoků pro přípravu gelů jsou uvedeny v Tabulce 8. Jako první se připraví 12% dělicí gel, po přidání TEMEDu a roztoku E se směs bez přístupu vzduchu promíchá a pipetuje se mezi skla. Roztok se převrství butanolem a nechává se 40 minut polymerovat. Po ztuhnutí dělicího gelu se filtračním papírem odsaje butanol. Zaostřovací směs se musí opět před přidáním promíchat. Poté se roztok pipetuje mezi skla (až po horní okraj skel), nahoru se vkládá 1 mm hřebínek tak, aby pod ním nebyly bublinky. Polymerace zaostřovacího gelu trvá 20 minut. Skla s hotovými gely se oplachují destilovanou vodou a vkládají se do misek s fólií a mokrými papírovými utěrkami. Gely se mohou ihned použít nebo se skladují v 4 °C.

Tabulka 8: Objemy jednotlivých roztoků pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu.

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin.

| Roztok | 12% dělicí gel (množství na 2 gely) | Zaostřovací gel (množství na 2 gely) |
|------------------|--|---|
| Destilovaná voda | 3,36 ml | 2,1 ml |
| Roztok A | 4 ml | 0,5 ml |
| Roztok B | 2,5 ml | – |
| Roztok C | – | 0,375 ml |
| Roztok D | 0,1 ml | 0,03 ml |
| Roztok E | 0,1 ml | 0,03 ml |
| TEMED | 0,004 ml | 0,003 ml |

Před elektroforézou je nutné rozmrazit gelové proužky a provést jejich ekvilibraci. Na přípravu ekvilibračního roztoku se naváží 18 g močoviny a 1 g SDS. Ke směsi se následně přidá 15 ml glycerolu a 1,67 ml roztoku B. Objem se po rozpuštění močoviny (v teplé vodě) doplní destilovanou vodou na 50 ml. Následně se připraví dvě zkumavky, do jedné se naváží 0,1 g DTT, do druhé 0,4 g IAA. Obě zkumavky se doplní na 10 ml ekvilibračním roztokem, IAA a DTT se musí dokonale rozpustit a protřepat. Nejprve se do nové bílé kazetky napipetuje roztok DTT. Na každý proužek se do jamky dá 1,5 ml, proužky se pinzetou vkládají gelovou stranou dolů. Inkubace s roztokem DTT probíhá 15 minut na třepačce. Následně se proužky oplachují stříčkou s destilovanou vodou a osuší se filtračním papírem bez dotyku gelové strany. Roztok IAA je do dalších jamek napipetován opět po 1,5 ml, inkubace probíhá 15 minut na třepačce bez přístupu světla. Během inkubace se připraví elektrodový pufr (na 1 l se naváží 3,03 g Tris, 1 g SDS a 14,4 g glycinu, doplnění na objem 1 l destilovanou vodou) a rozeřeje se 0,5% agaróza.

Do elektroforetické vany se umístí stojánky s gely, 1 mm hřebínek se vyndá, jamky se promyjí elektrodovým pufrem a vysuší se filtračním papírem. Po inkubaci gelových proužků s IAA jsou proužky opět opláchnuty destilovanou vodou a osušeny, před vkládáním do stojánek s gely se mohou uchovat krátce v elektrodovém pufru. Gelové proužky se před vkládáním do

elektroforetické vany zastříhují v místech, kde končí gel. Gelová strana směřuje k vnitřnímu (kratšímu) sklu, + konec proužku směřuje k jamce pro marker. Proužky jsou následně převrstveny 250 μ l agarózy a zatlačují se kovovou špachtlí, aby pod nimi nebyly bublinky. Po ztuhnutí agarózy se elektroforetická vana naplní po rysku pufrem, standard molekulových hmotností (4 μ l) se pipetuje do jamky pro marker u + konce proužku. Na elektroforetickou vanu se nasadí víko a připojí se ke zdroji napětí. Na přístroji se nastaví následující hodnoty: 0,03 A (na 1 gel), 60 V, čas 5 minut \rightarrow RUN. Po uběhnutí doby se napětí přenastavuje na 180 V a čas na 60 minut. Elektroforéza je ukončena v momentě, kdy čelo dosáhne konce gelu.

2) Gelová elektroforéza SDS-PAGE

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, vortex, 1 mm skla, 1 mm hřebínky, aparatura pro přípravu gelů, perlan, parafilm, pipety, špičky, zkumavky, víčka na zkumavky, plastové misky, fólie, elektroforetická vana, pH metr, termostat, třepačka

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Ethanol
- Roztok A (30% směs akrylamidu a bisakrylamidu)
- Roztok B (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)
- Roztok C (1M Tris-HCl, pH 6,8)
- Roztok D (10% roztok SDS)
- Roztok E (10% roztok APS)
- TEMED
- Roztok G (2x Lemmli Sample Buffer)
- Roztok aktinu 1 mg/ml
- PBS pufr
- Elektrodotový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3–8,6)

- Standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein Dual Color Standards)

Biologický materiál:

- Buněčný lyzát buněk RPMI-8226

Pracovní postup:

Proces přípravy roztoků na gely a příprava gelů je popsán u elektroforézy SDS-PAGE (která následuje po IEF), rozdílný je pouze typ hřebínku. Před samotnou elektroforézou se musí připravit roztoky, které se budou pipetovat do jamek gelu. Roztok G se vždy ředí se vzorkem, kterým může být buněčný lyzát nebo aktin smíchaný s PBS pufrém. Připravené roztoky (v požadovaném ředění) se 3 minuty povaří. Do jamek gelu se následně pipetuje 10 µl roztoků, standard molekulových hmotností se pipetuje v objemu 4 µl. Elektrodový pufr a nastavované podmínky na elektroforetické vaně jsou opět stejné jako u předchozí SDS-PAGE elektroforézy.

3.4.6 Semi-dry Western Blot

Přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy, špachtle, Petriho misky, filtrační papíry (tlusté i tenké), nitrocelulózová membrána, nůžky, pinzety, váleček, válce, Trans-Blot Turbo, Trans-Blot Turbo souprava

Reagencie a roztoky:

- Komerční transferový pufr (20% 5x koncentrovaný komerční pufr, 20% ethanol)
- Vlastní transferový pufr (25mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol, 0,05% SDS)
- Destilovaná voda

Pracovní postup:

Prvním krokem je příprava transferového pufru. Komerční transferový pufr se připravuje následovně: 40 ml 5x koncentrovaného pufru, 40 ml ethanolu a doplnění na 200 ml destilovanou vodou. Na vlastní transferový pufr (1 l) se naváží 0,5 g SDS, 3,03 g Trisu a 14,4 g glycinu. Ke směsi se následně přidá 200 ml methanolu a doplní se na 1 l destilovanou vodou. Nitrocelulózová membrána (NCM) se nastříhá podle šablony.

Po ukončení elektroforézy se skla opláchnou destilovanou vodou a oddělí se špachtlí. Odstraní se zaostřovací část gelu, zbytek gelu se přenesou do Petriho misky s transferovým pufrem. Do dalších Petriho misek s transferovým pufrem se namočí filtrační papíry a NCM. Na spodní část kazety TransBlot Turbo se pinzetou položí tlustý mokrý filtrační papír, na něj se položí tenký filtrační papír, NCM, gel a nahoru opět tenký a následně tlustý filtrační papír. Vše se přiklopí víkem a kazety se vloží do přístroje. Na přístroji se nastavuje program LIST → BIO-RAD DEFINED → zvolit počet gelů → HIGH MW (na 2 gely: 2,5 A, 25 V, 10 min). Po ukončení procesu Western-Blot (WB) se membrány i gely přenesou do Petriho misek s destilovanou vodou, kde se třikrát promyjí, každé promytí trvá 5 minut. Následujícím krokem je kontrola úspěšnosti přenosu proteinů z gelu na membránu.

3.4.7 Barvení proteinů na nitrocelulózové membráně

Přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy, nitrocelulózová membrána (po přenosu), Petriho misky, pinzety, G:BOX Chemi XX6, alobal

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Barvicí roztok (0,2% AgNO₃, 0,8% FeSO₄, 2% citrát sodný)
- Odbarvovací roztok (50 mM thiosíran sodný, 15 mM hexakynoželezitan draselný)

Pracovní postup:

Před detekcí proteinů na NCM je nutné si připravit barvicí roztok (0,17 g AgNO₃, 0,8 g FeSO₄, 2 g citrátu sodného, doplnění na 100 ml destilovanou vodou), který je nutné uchovávat ve tmě. Pro přípravu odbarvovacího roztoku je nutné si navážit 1,24 g thiosíranu sodného a 0,494 g hexakynoželezitanu draselného a opět doplnit na 100 ml destilovanou vodou.

Membrány promyté destilovanou vodou zůstávají v Petriho miskách a inkubují se 6 minut s barvicím roztokem na třepačce. Po inkubaci se membrány opláchnou destilovanou vodou, aby se odstranil přebytečný barvicí roztok. Zviditelněná proteomová mapa se vyfotí pomocí stanice G:BOX v programu GeneSys. Po vyfocení se membrána inkubuje s odbarvovacím roztokem.

Následně se několikrát promyje destilovanou vodou, dokud není voda i membrána čistá. Dalším krokem po barvení je imunochemická detekce a vizualizace.

3.4.8 Barvení proteinů na gelu

1) Barvení proteinů na gelu pomocí barviva Coomassie Blue

Přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy, gel (po přenosu) válce, Petriho misky, G:BOX Chemi XX6, třepačka

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Fixační roztok (5% kyselina octová, 50% ethanol)
- Roztok barviva Coomassie Blue (0,001% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% kyselina octová)
- Odbarvovací roztok (0,1% kyselina octová, 14% methanol)

Pracovní postup:

Před detekcí proteinů na gelu je nutné si připravit barvicí roztok Coomassie Blue (na přípravu 1 l je nutné navážit 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, přidat 500 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové a 400 ml destilované vody) a také fixační roztok (na 1 l se odměří 50 ml kyseliny octové, 500 ml ethanolu a 450 ml destilované vody).

Gely promyté destilovanou vodou zůstávají v Petriho miskách, nejprve se inkubují 30 minut s fixačním roztokem. Po fixaci následuje 30 minut rehydratace gelů v destilované vodě. Po rehydrataci se gely inkubují 10 minut s roztokem barviva Coomassie Blue, po obarvení se promývají v odbarvovacím roztoku (75 ml kyseliny octové, 100 ml methanolu a 530 ml destilované vody), který je vhodné několikrát vyměnit. V odbarvovacím roztoku gely zůstávají v lednici do druhého dne. Proteiny, které zůstaly po přenosu na gelu, se vyfotí pomocí stanice G:BOX v programu GeneSys. Po focení se gely likvidují.

2) Barvení proteinů na gelu pomocí dusičnanu stříbrného

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, gel (po přenosu), válce, Petriho misky, G:BOX Chemi XX6, pipety, špičky, třepačka

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Fixační roztok (5% kyselina octová, 50% ethanol)
- 10% roztok glutaraldehydu
- 20% roztok AgNO₃
- 9M roztok NaOH
- 26% vodný roztok amoniaku
- Vyvolávací roztok (0,05% kyselina citrónová, 0,04% formaldehyd)
- Ustalovací roztok (5% kyselina octová)

Pracovní postup:

Před detekcí proteinů na gelu je nutné si připravit následující roztoky: fixační roztok (na 1 l se odměří 50 ml kyseliny octové, 500 ml ethanolu a 450 ml destilované vody), 10% roztok glutaraldehydu (na 50 ml se odměří 10 ml 50% glutaraldehydu a 40 ml destilované vody), 20% AgNO₃ (6 g AgNO₃ se rozpustí ve 30 ml destilované vody), 9M roztok NaOH (3,6 g NaOH se rozpustí v 10 ml destilované vody), vyvolávací roztok (0,25 g kyseliny citrónové, 540 μl formaldehydu a 500 ml destilované vody) a ustalovací roztok (50 ml kyseliny octové a 950 ml destilované vody).

Gely promyté destilovanou vodou zůstávají v Petriho miskách, nejprve se inkubují 30 minut s fixačním roztokem. Po fixaci následuje 30 minut rehydratace gelů v destilované vodě. Po rehydrataci se gely inkubují 30 minut s 10% roztokem glutaraldehydu. Následuje šestkrát promytí destilovanou vodou, každé promytí trvá 5 minut. Po promytí se gel inkubuje 15 minut s roztokem amoniakálního stříbra (12,5 ml destilované vody, 60 μl 9M NaOH, 350 μl 26% roztoku amoniaku, k tomuto roztoku se titruje 20% AgNO₃ do béžovo-hnědé barvy). Následuje promytí destilovanou vodou a inkubace s vyvolávacím roztokem, dokud nejsou proteiny na

gelu dostatečně zviditelněné. Posledním krokem je vložení gelů do ustalovacího roztoku a vyfocení pomocí stanice G:BOX v programu GeneSys.

3.4.9 Imunochemická detekce a vizualizace reaktivních proteinových skvrn

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, plastové misky, nitrocelulózová membrána (po přenosu), pipety, špičky, fólie, svářečka fólií, rotátor, izolepa, třepačka, G:BOX Chemi XX6

Reagencie a roztoky:

- PBS-T pufr (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, 25% Tween 20)
- Blokovací roztok (5% odtučněné sušené mléko)
- Komerční primární protilátka (anti- β -aktin)
- Konjugát (*anti-human IgG*, *anti-mouse IgG*)
- Chemiluminescenční substrát Clarity Western ECL

Biologický materiál:

- Pacientské sérum, sérum zdravého dárce

Pracovní postup:

Prvním krokem je příprava PBS-T pufru (na 1 l se naváží 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 a 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, následně se přidá 1,25 ml Tween 20 a vše se doplní destilovanou vodou na 1 l) a blokovacího roztoku (15 g sušeného mléka do 300 ml PBS-T pufru). Po obarvení se NCM promyjí destilovanou vodou a následně také PBS-T pufrem, dvakrát po dobu 10 minut. Po promytí následuje blokace membrány, 1 h s blokovacím roztokem na třepačce. Po inkubaci se membrány dvakrát promyjí PBS-T pufrem, každé promytí trvá 10 minut. Podle šablony se nastříhá zatavací fólie a na jedné straně se svaří. Do fólie se následně umístí NCM a zataví se další strany. Před zatavením poslední strany se na membránu pipetuje roztok primární protilátky (na jednu membránu se pipetuje 1,5 ml blokovacího roztoku s pacientským sérum či komerční protilátkou v požadovaném ředění). Zatavená fólie s NCM se přilepí na rotátor, který se dá do lednice. Inkubace s primární protilátkou probíhá přes noc (17 h). Druhý

den ráno se membrána vyndá z fólie, vloží se do plastové misky a promyje se čtyřikrát PBS-T pufrem, každé promytí trvá 5 minut. Po promytí následuje inkubace 1 h se sekundární protilátkou (na jednu membránu se pipetuje 10 ml blokovacího roztoku s konjugátem v požadovaném ředění) na třepačce. Po inkubaci se NCM promyje šestkrát PBS-T pufrem, každé promytí trvá 5 minut. Posledním krokem je chemiluminescenční detekce s ECL substrátem. Roztok ECL substrátu se připravuje následovně: na 1 membránu se pipetuje 1 ml luminolu a 1 ml peroxidu vodíku. Inkubace ECL substrátu s membránou se provádí v přítmí po dobu 30 s. NCM se následně vyfotí pomocí stanice G:BOX v programu GeneSys, komplexy proteinu s primární protilátkou, na které se navázal konjugát, svítí. Vyhodnocení snímku následně probíhá v programu GeneTools.

3.5 Statistické vyhodnocení výsledků

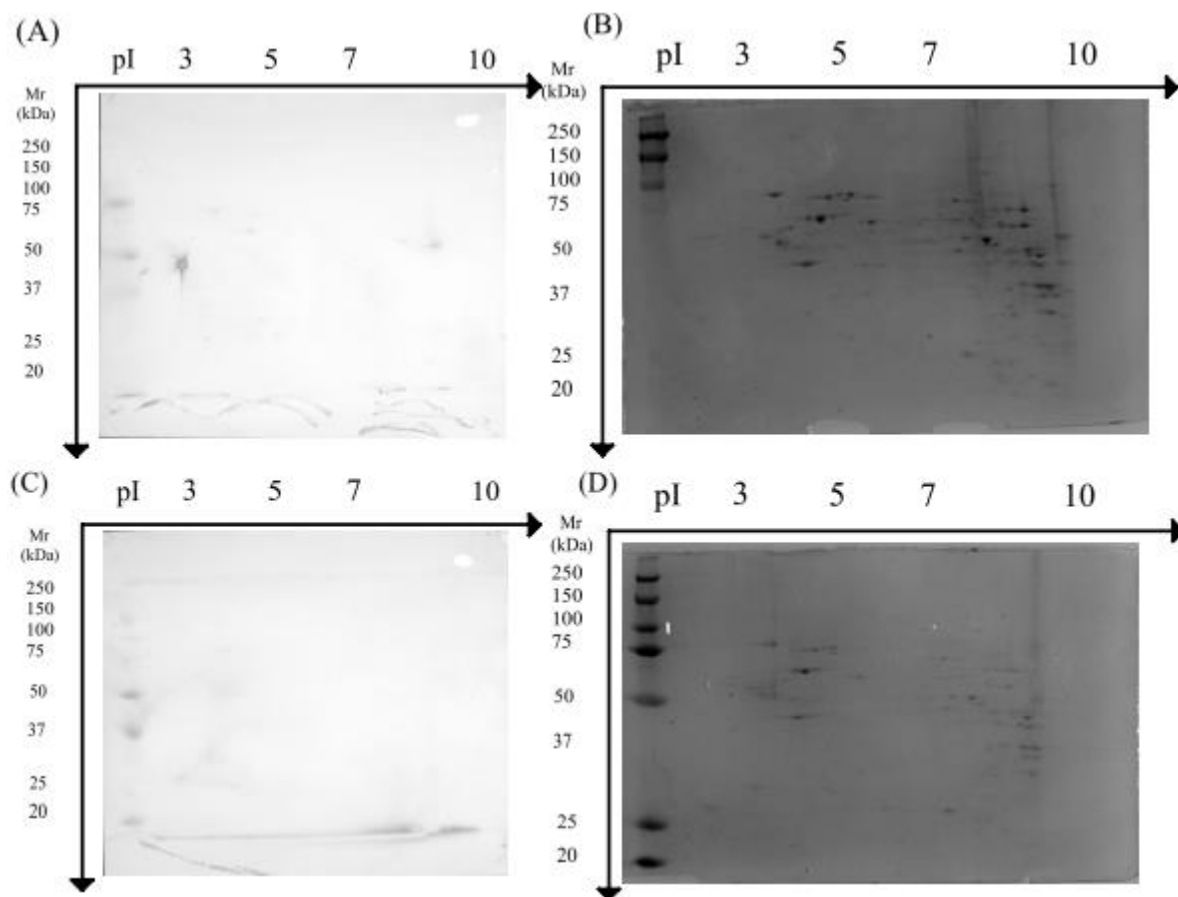
Statistické vyhodnocení dat výskytu anti-ENO1 protilátek u vzorků sér ZD a u pacientů s MM bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu. Nulovou hypotézou je, že mezi vzorky sér ZD a pacientů s MM není rozdíl ve výskytu anti-ENO1 protilátek, hladina významnosti je $\alpha = 0,05$.

4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace podmínek Western-Blot metody s využitím zařízení Trans-Blot Turbo

Prvním úkolem praktické části byla optimalizace podmínek přenosu proteinů z gelu po elektroforéze na NCM. Na původním přístroji pro WB trval přenos 70 minut. Za účelem zrychlení této části metody SERPA byl zakoupen přístroj Trans-Blot Turbo, cílem bylo zjistit optimální podmínky, za kterých přenos spolehlivě funguje, ideálně v co nejkratším čase. Během optimalizace byla vždy použita celá metoda SERPA (viz podkapitola 3.4). Nejprve bylo nutné získat buněčný lyzát (viz podkapitoly 3.4.1 a 3.4.2), poté bylo provedena rehydratace a IEF gelových proužků (viz podkapitoly 3.4.3 a 3.4.4) a následovala SDS-PAGE elektroforéza (viz podkapitola 3.4.5). Změna podmínek se vždy týkala pouze části semi-dry WB (viz podkapitola 3.4.6). Všechny optimalizace byly vždy prováděny ve dvojím opakování.

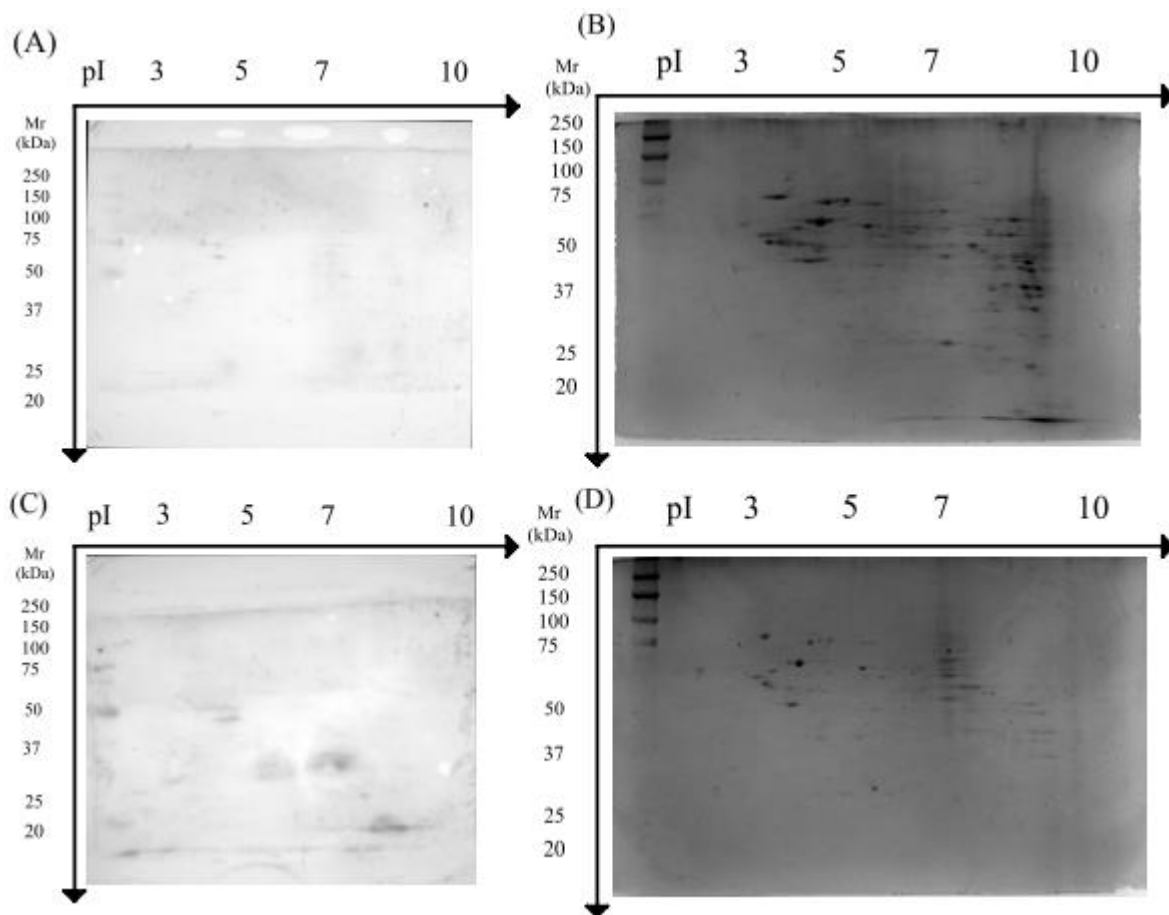
Při prvním pokusu bylo postupováno dle návodu, který byl součástí soupravy pro přístroj Trans-Blot Turbo. Použit byl komerční pufr, jeho příprava je uvedena v podkapitole 3.4.6 a také tenké filtrační papíry, vše součástí komerčního balení. Jelikož jde o přenesení buněčného lyzátu se směsí proteinů a peptidů, byl vybrán byl program MIXED MW (2,5 A; 25 V; 7 min pro dva gely). Po WB byly gely obarveny roztokem Coomassie Blue, který umožní vizualizaci nepřenesených proteinů na gelu v prostředí SDS, membrány s přenesenými proteiny byly obarveny stříbrem (viz podkapitoly 3.4.7 a 3.4.8, Obrázek 15).



Obrázek 15: Kontrola přenosu proteinů z gelů na membrány (NCM) při programu MIXED MW. Část (A) a (C) – NCM s přenesenými proteiny, část (B) a (D) – gely s nepřenesenými proteiny

Jak lze na Obrázku 15 vidět, k přenosu proteinů na NCM nedošlo. Zároveň lze vidět, že v gelech zůstala pouze část proteinů.

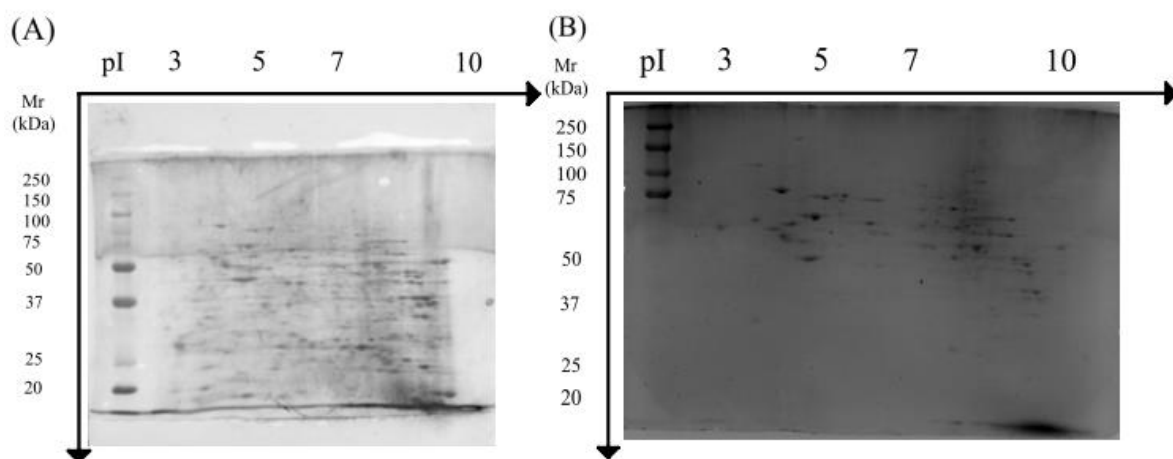
Při dalším pokusu proběhla změna podmínek v přístrojovém programu. Zvolen byl program HIGH MW (2,5 A; 25 V; 10 min pro dva gely), který je určen pro vysokomolekulární proteiny a trvá delší dobu než původně zvolený program. Po WB byly opět gely obarveny roztokem Coomassie Blue, membrány byly obarveny stříbrem (viz Obrázek 16).



Obrázek 16: Kontrola přenosu proteinů z gelů na membrány (NCM) při programu HIGH MW. Část (A) a (C) – NCM s přenesenými proteiny, část (B) a (D) – gely s nepřenesenými proteiny

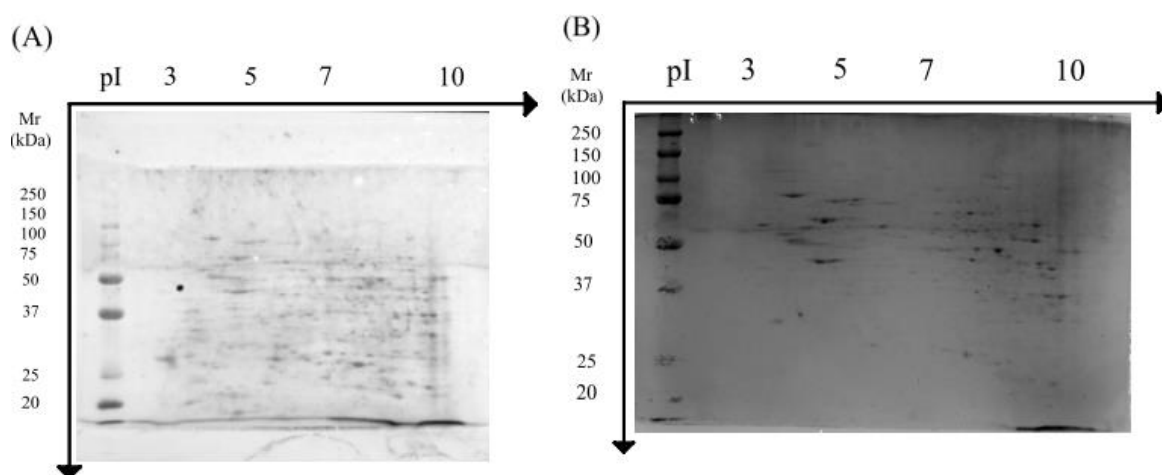
Jak lze na Obrázku 16 vidět, ani při těchto podmínkách nedošlo k přenosu proteinů na membrány, v gelech zůstala pouze část proteinů.

Dalším krokem bylo zjistit, zda není při přenosu nutné zesílit kontakt gelu s membránou pomocí vyšší vrstvy filtračního papíru. Úvodní proces byl opět stejný, uspořádání vrstev při WB bylo následující (od spodu): tlustý filtrační papír, tenký filtrační papír, NCM, gel, tenký filtrační papír a opět tlustý filtrační papír. V tomto kroku byly provedeny dva samostatné přenosy, první při programu HIGH MW (1,3 A; 25 V; 10 min), druhý při programu HIGH MW (1,3 A; 25 V; 20 min). Po WB byly opět gely obarveny roztokem Coomassie Blue, membrány byly obarveny stříbrem (viz Obrázek 17 a 18).



Obrázek 17: Kontrola přenosu proteinů z gelu na membránu (NCM) při době přenosu 10 minut.

Část (A) – NCM s přenesenými proteiny, část (B) – gel s nepřenesenými proteiny



Obrázek 18: Kontrola přenosu proteinů z gelu na membránu (NCM) při době přenosu 20 minut.

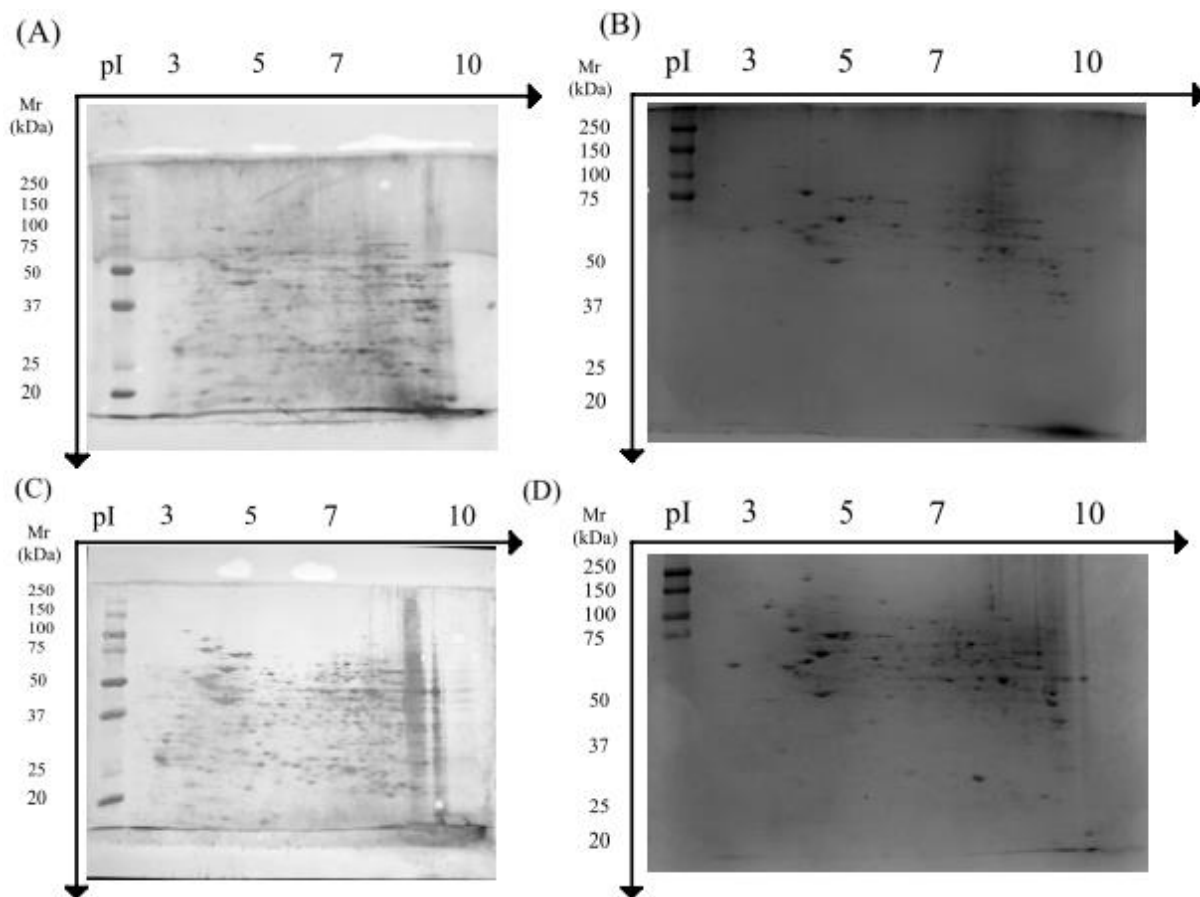
Část (A) – NCM s přenesenými proteiny, část (B) – gel s nepřenesenými proteiny

Jak lze na Obrázku 17 a 18 vidět, při vyšší vrstvě filtračních papírů byl již přenos na membránu úspěšný. Proto byl pro další analýzy volen program HIGH MW s podmínkami 2,5 A; 25 V; 10 min s vyšší vrstvou filtračních papírů.

4.1.1 Porovnání účinnosti přenosu při použití komerčního a vlastního transferového pufru

Vzhledem k ceně soupravy pro Trans-Blot Turbo bylo nutné zjistit, zda je přenos úspěšný i při použití vlastního transferového pufru, který byl připravován do původního přístroje pro WB. Opět byla použita celá metoda SERPA (viz podkapitola 3.4). Příprava vlastního transferového

pufry je uvedena v podkapitole 3.4.6, pro přenos byly nastaveny podmínky z předchozí části, tedy program HIGH MW (2,5 A; 25 V; 10 min). Po WB byly opět gely obarveny roztokem Coomassie Blue, membrány byly obarveny stříbrem (viz Obrázek 19).



Obrázek 19: Kontrola přenosů proteinů z gelů na membrány (NCM) při použití rozdílných pufřů.

Část (A) a (B) – NCM s přenesenými proteiny a gel s nepřenesenými proteiny při použití komerčního pufřu

Část (C) a (D) – NCM s přenesenými proteiny a gel s nepřenesenými proteiny při použití vlastního pufřu

Jak lze na Obrázku 19 vidět, účinnost přenosu proteinů z gelu na membránu je srovnatelná při použití komerčního i vlastního pufřu.

4.2 Ověření postupu normalizace metody SERPA pomocí vnitřního standardu β -aktinu

B-aktin (BA) je izoformu aktinu, který je vysoce konzervovaný a podílí se na pohybu, struktuře a integritě buněk. Aktin má celkem šest izoform, čtyři z nich se nachází primárně v buňkách příčně pruhovaného a hladkého svalstva, další dvě, BA a γ -aktin jsou exprimovány všudypřítomně [145].

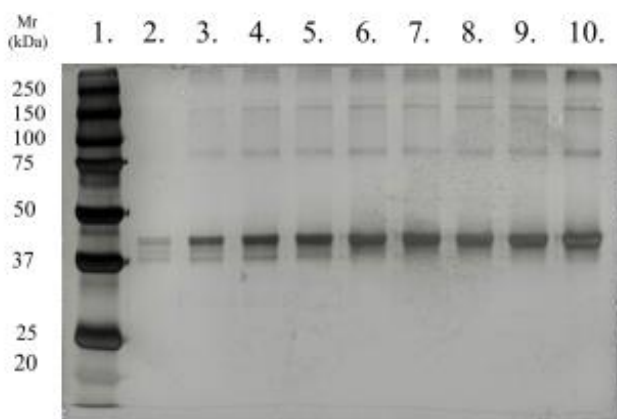
Normalizace pomocí vnitřního standardu se při WB provádí z důvodu rozdílných podmínek při jednotlivých analýzách. Klíčové chyby vznikají především při přípravě vzorků, pipetování a při nerovnoměrném přenosu proteinů. Typicky se jako kontroly používají „*house-keeping*“ proteiny, u nichž jsou hladiny exprese konstantní. Příkladem může být právě BA či β -tubulin [146]. Signály hledaného i „*house-keeping*“ proteinu je nutné po přenosu kvantifikovat, vypočítat normalizační faktor z hodnot „*house-keeping*“ proteinu a následně přepočítat hodnoty hledaného proteinu [147].

4.2.1 SDS-PAGE – kontrola komerčního standardu β -aktinu

SDS-PAGE elektroforéza (viz podkapitola 3.4.5) byla prováděna za účelem nalezení optimálního dávkovaného množství BA pro další analýzy a také pro zjištění čistoty chemikálie. Králičí BA (5 mg) byl rozpuštěn v 5 ml ultračisté vody (tj. koncentrace roztoku 1 mg/ml), po rozpuštění byla vytvořena ředící řada (viz Tabulka 9). Jednotlivé směsné roztoky vznikly smícháním roztoku BA, PBS pufru a roztoku G, byly povařeny po dobu 3 minut a následně byly dávkovány do jamek gelu v objemu 10 μ l. Standard molekulových hmotností byl napipetován do první jamky v objemu 4 μ l. Po elektroforéze byl gel obarven roztokem dusičnanu stříbrného (viz podkapitola 3.4.7).

Tabulka 9: Příprava ředící řady β -aktinu.

| Množství β -aktinu v jamce (μg) | B-aktin (μl) | PBS pufr (μl) | Roztok G (μl) |
|--|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0,25 | 0,5 | 9,5 | 10 |
| 0,5 | 1 | 9 | 10 |
| 0,75 | 1,5 | 8,5 | 10 |
| 1 | 2 | 8 | 10 |
| 1,25 | 2,5 | 7,5 | 10 |
| 1,5 | 3 | 7 | 10 |
| 1,75 | 3,5 | 6,5 | 10 |
| 2 | 4 | 6 | 10 |
| 2,25 | 4,5 | 5,5 | 10 |



Obrázek 20: Gel po separaci β -aktinu (BA) metodou SDS-PAGE obarvený roztokem dusičnanu stříbrného.

Jamka č. 1 – standard molekulových hmotností, jamka č. 2 – BA 0,25 μg , jamka č. 3 – BA 0,5 μg , jamka č. 4 – BA 0,75 μg , jamka č. 5 – BA 1 μg , jamka č. 6 – BA 1,25 μg , jamka č. 7 – BA 1,5 μg , jamka č. 8 – BA 1,75 μg , jamka č. 9 – BA 2 μg , jamka č. 10 – BA 2,25 μg .

Jak lze na Obrázku 20 vidět, v každé jamce byl vizualizován intenzivní proužek mezi 37 kDa a 50 kDa. Molekulová hmotnost BA je 42 kDa, fragmenty BA mohou mít velikost mezi 38 kDa až 41 kDa [148]. Koncentrace BA ve vzorku, která je po elektroforéze dostatečně viditelná je

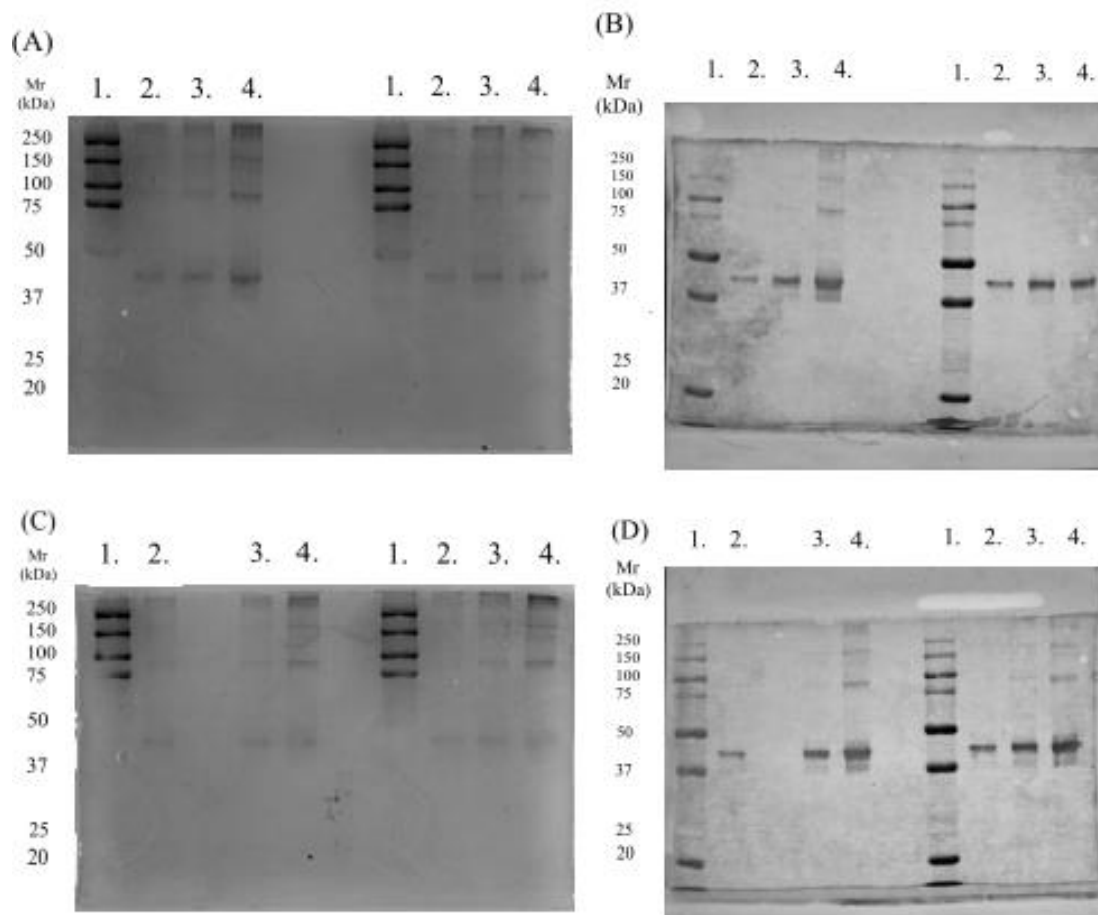
0,5 µg/10 µl (jamka č. 3), se stoupající koncentrací BA dochází již k přesycení separační dráhy. Pro další analýzy (s přihlédnutím na ztráty, ke kterým dochází během IEF, SDS-PAGE elektroforézy a WB) byly používány následující koncentrace BA: 0,5 µg/10 µl, 1 µg/10 µl a 2,5 µg/10 µl.

4.2.2 SDS-PAGE, Western-Blot (WB) a imunochemická detekce β-aktinu

Dalším krokem bylo ověřit, zda se na BA vážou specifické anti-β-aktin protilátky (proti králíčimu β-aktinu (*anti-rabbit* β-aktin), myší původ) a zda na takto vzniklý komplex nasedá konjugát (proti myším IgG (*anti-mouse* IgG), králíčí původ). Nejprve byla opět provedena SDS-PAGE elektroforéza. Ředící řada BA je popsána v Tabulce 10, úprava roztoků a dávkovaný objem byly stejné jako v předchozí podkapitole. K analýze byly použity 2 gely rozdělené na dvě části. V každé části byly 4 jamky. Do první jamky byl pipetován standard molekulových hmotností (4 µl), do jamky č. 2 až 4 BA v množství 0,5 µg, 1 µg a 2,5 µg. Po elektroforéze následoval přenos proteinů z gelu na NCM pomocí přístroje Trans-Blot Turbo (viz podkapitola 3.4.6). Po WB byly gely obarveny roztokem Coomassie Blue, membrány byly obarveny stříbrem (viz podkapitoly 3.4.7 a 3.4.8, Obrázek 21).

Tabulka 10: Příprava ředící řady β-aktinu.

| Množství β-aktinu v jamce (µg) | B-aktin (µl) | PBS pufr (µl) | Roztok G (µl) |
|--------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| 0,5 | 4 | 36 | 40 |
| 1 | 8 | 32 | 40 |
| 2,5 | 20 | 20 | 40 |



Obrázek 21: Kontrola přenosu proteinů z gelů na nitrocelulózkové membrány (NCM).

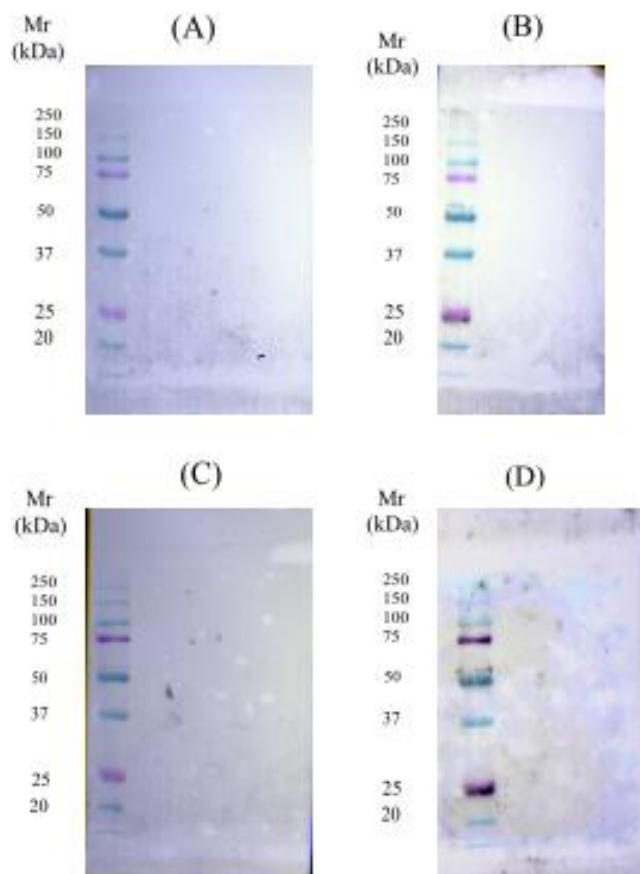
Část (A) a (C) – gely s nepřenesenými proteiny. Jamka č. 1 – standard molekulových hmotností, jamka č. 2 – β -aktin (BA) 0,5 μ g, jamka č. 3 – BA 1 μ g, jamka č. 4 – BA 2,5 μ g.

Část (B) a (D) – NCM s přenesenými proteiny. Jamka č. 1 – standard molekulových hmotností, jamka č. 2 – BA 0,5 μ g, jamka č. 3 – BA 1 μ g, jamka č. 4 – BA 2,5 μ g.

Posledním krokem byla imunochemická detekce a vizualizace (viz podkapitola 3.4.9). Příprava a dávkování primární protilátky (anti- β -aktin) a konjugátu je uvedeno v Tabulce 11. Rozdílné ředění primární protilátky a konjugátu bylo provedeno z důvodu nalezení optimálního množství a vzájemného poměru obou složek pro zajištění detekovatelnosti „house-keeping“ proteinu na NCM. Inkubace s primární protilátkou probíhala 17 h přes noc na rotátoru v ledničce (4 °C), inkubace s konjugátem druhý den 1 h na třepačce za laboratorní teploty. Nakonec byla pomocí roztoku ECL provedena chemiluminescenční detekce. Vyfocení membrán proběhlo na stanici G:BOX Chemi XX6, vyhodnocení molekulových hmotností proběhlo v programu GeneTools. Membrány po imunochemické detekci (s různými ředěními primární protilátky a konjugátu) jsou zachyceny na Obrázku 22.

Tabulka 11: Příprava primární protilátky a konjugátu a dávkovaný objem roztoků na membránu.

| Ředění protilátky | Primární protilátka (anti-β-aktin) (μl) | Blokovací roztok (5% mléko, ml) | Dávkováno na membránu (ml) |
|--------------------------|--|--|-----------------------------------|
| 1:1500 | 10 | 15 | 1,5 |
| 1:2000 | 10 | 20 | 1,5 |
| 1:3000 | 10 | 30 | 1,5 |
| Ředění konjugátu | Konjugát (proti myším IgG) (μl) | Blokovací roztok (5% mléko, ml) | Dávkováno na membránu (ml) |
| 1:3000 | 7 | 21 | 10 |
| 1:5000 | 5 | 25 | 10 |



Obrázek 22: Snímky nitrocelulóзовých membrán (NCM) po SDS-PAGE, WB a imunochemické detekci za různých podmínek ředění primární protilátky (pAb) a konjugátu (sAb).

Část (A) – NCM po detekci, ředění pAb 1:3000, ředění sAb 1:3000

Část (B) – NCM po detekci, ředění pAb 1:2000, ředění sAb 1:5000

Část (C) – NCM po detekci, ředění pAb 1:2000, ředění sAb 1:3000

Část (D) – NCM po detekci, ředění pAb 1:1500, ředění sAb 1:5000

Jak lze na Obrázku 22 vidět, ani u jedné ze čtyř membrán nebyla po imunochemické detekci a vizualizaci imunoreaktivita prokázána. Dle Obrázku 21 proběhl přenos proteinů z gelu na NCM v pořádku, na gelech zůstaly převážně vysokomolekulární proteiny.

4.3 Analýza sér zdravých dárců metodou SERPA

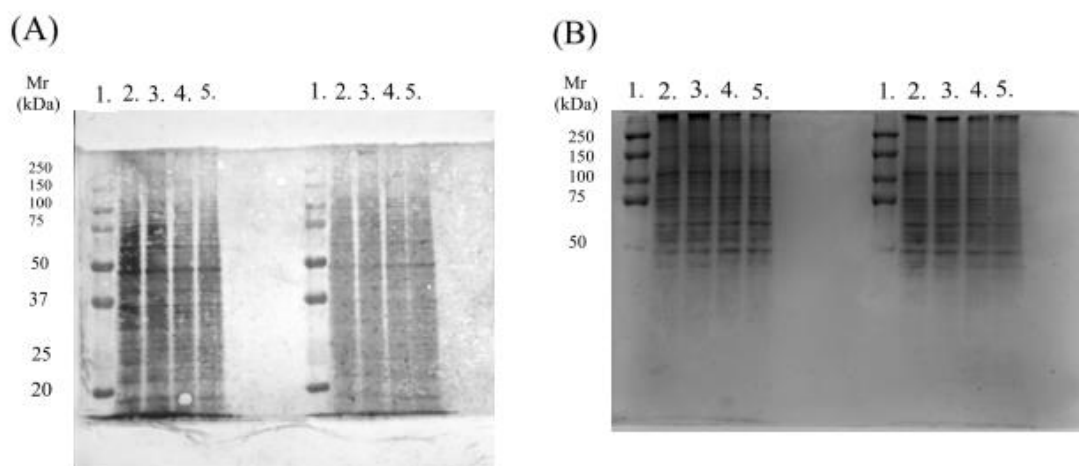
Imunoproteomické profilování vzorků sér zdravých dárců (ZD) bylo provedeno za účelem zjištění četnosti výskytu anti-ENO1 protilátek, aby bylo možné určit jejich význam u pacientů s MM. Pro ověření reaktivity použitých protilátek byla nejprve provedena metoda SERPA s SDS-PAGE elektroforézou, pro porovnání ZD a pacientů s MM byla následně provedena metoda SERPA s 2D-elektroforézou. Celkem byly analyzovány 4 vzorky.

4.3.1 Metoda SERPA s SDS-PAGE – optimalizace podmínek analýzy vzorků sér zdravých dárců

Nejprve byla provedena SDS-PAGE elektroforéza (viz podkapitola 3.4.5) za účelem ověření reaktivity použitých protilátek s proteiny séra zdravých dárců. Před elektroforézou bylo nutné připravit buněčný lyzát (viz podkapitoly 3.4.1 a 3.4.2). Ředící řada buněčného lyzátu je popsána v Tabulce 12, jednotlivé roztoky vznikly smícháním buněčného lyzátu a roztoku G. Směsné roztoky byly povařeny po dobu 3 minut a následně byly dávkovány do jamek gelu v objemu 10 μ l. K analýze byly použity 2 gely rozděleny na dvě části. V každé části bylo 5 jamek. Do první jamky byl pipetován standard molekulových hmotností, do jamky č. 2 a č. 3 buněčný lyzát s roztokem G v ředění 1:1 a do jamky č. 4 a č. 5 buněčný lyzát s roztokem G v ředění 1:2. Po elektroforéze následoval přenos proteinů z gelu na NCM pomocí přístroje Trans-Blot Turbo (viz podkapitola 3.4.6). Po WB byly gely obarveny roztokem Coomassie Blue, membrány byly obarveny stříbrem (viz podkapitoly 3.4.7 a 3.4.8, Obrázek 23).

Tabulka 12: Příprava ředící řady buněčného lyzátu.

| Ředění buněčného lyzátu | Buněčný lyzát (μ l) | Roztok G (μ l) |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| 1:1 | 100 | 100 |
| 1:2 | 70 | 140 |



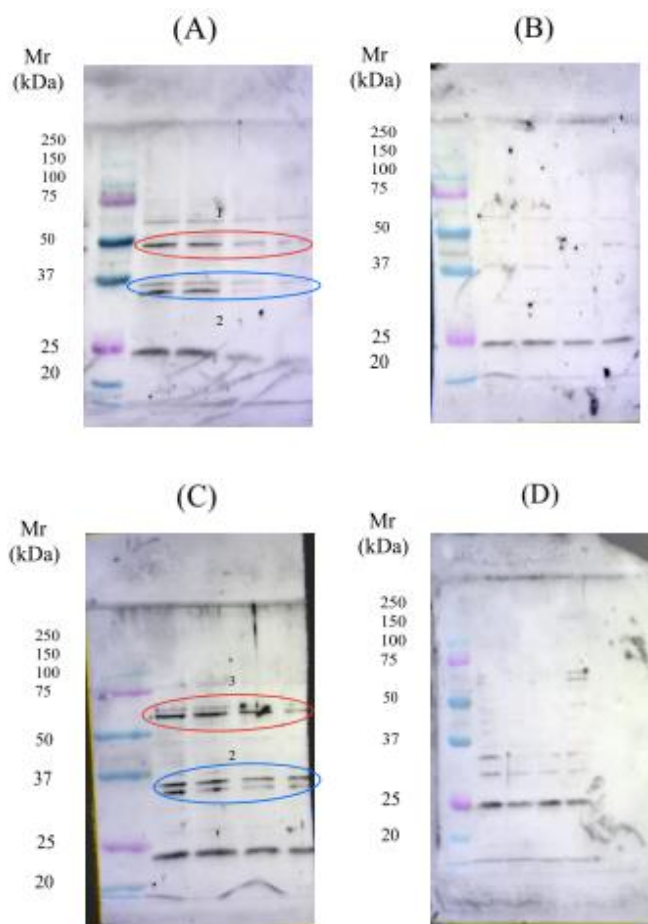
Obrázek 23: Kontrola přenosů proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu (NCM).

Část (A) – NCM s přenesenými proteiny, část (B) – gel s nepřenesenými proteiny

Posledním krokem byla imunochemická detekce a vizualizace (viz podkapitola 3.4.9). Příprava a dávkování séra a konjugátu je uvedeno v Tabulce 13. Inkubace s primární protilátkou probíhala 17 h přes noc na rotátoru v ledničce (4 °C), inkubace s konjugátem druhý den 1 h na třepačce za laboratorní teploty. Nakonec byla pomocí roztoku ECL provedena chemiluminescenční detekce. Vyfocení membrán proběhlo na stanici G:BOX Chemi XX6, vyhodnocení molekulových hmotností proběhlo v programu GeneTools. Membrány po imunochemické detekci jsou zachyceny na Obrázku 24. Významné imunoreaktivní proužky jsou na membránách označeny, jejich molekulová hmotnost je zaznamenána v Tabulce 14.

Tabulka 13: Příprava primární protilátky a konjugátu a dávkovaný objem roztoků na membránu.

| Typ protilátky | Ředění protilátky | Objem protilátky (μl) | Blokovací roztok (5% mléko, ml) | Dávkováno na membránu (ml) |
|----------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Sérum | 1:500 | 3 | 1,5 | Celý objem |
| Konjugát | 1:5000 | 2 | 10 | Celý objem |



Obrázek 24: Snímky nitrocelulózových membrán (NCM) po imunochemické detekci (SERPA s SDS-PAGE elektroforézou).

Část (A) – NCM zdravého dárce (ZD) č. C201011002349 po detekci

Část (B) – NCM ZD č. C201009107647 po detekci

Část (C) – NCM ZD č. C201009108182 po detekci

Část (D) – NCM ZD č. C201009108384 po detekci

Tabulka 14: Molekulové hmotnosti proužků vyznačených na Obrázku 24.

| Část A | | Část C | |
|---------|---------------------------|---------|---------------------------|
| Proužek | Molekulová hmotnost (kDa) | Proužek | Molekulová hmotnost (kDa) |
| 1 | 49,7 | 3 | 62,2 |
| 2 | 36,1 | 2 | 36,6; 33,9 |

Jak lze na Obrázku 24 vidět, po imunochemické detekci a vizualizaci došlo ke zviditelnění imunoreaktivních proužků u každé membrány. Pro následné porovnání ZD a pacientů s MM bylo nutné dále provést metodu SERPA s 2D-elektroforézou.

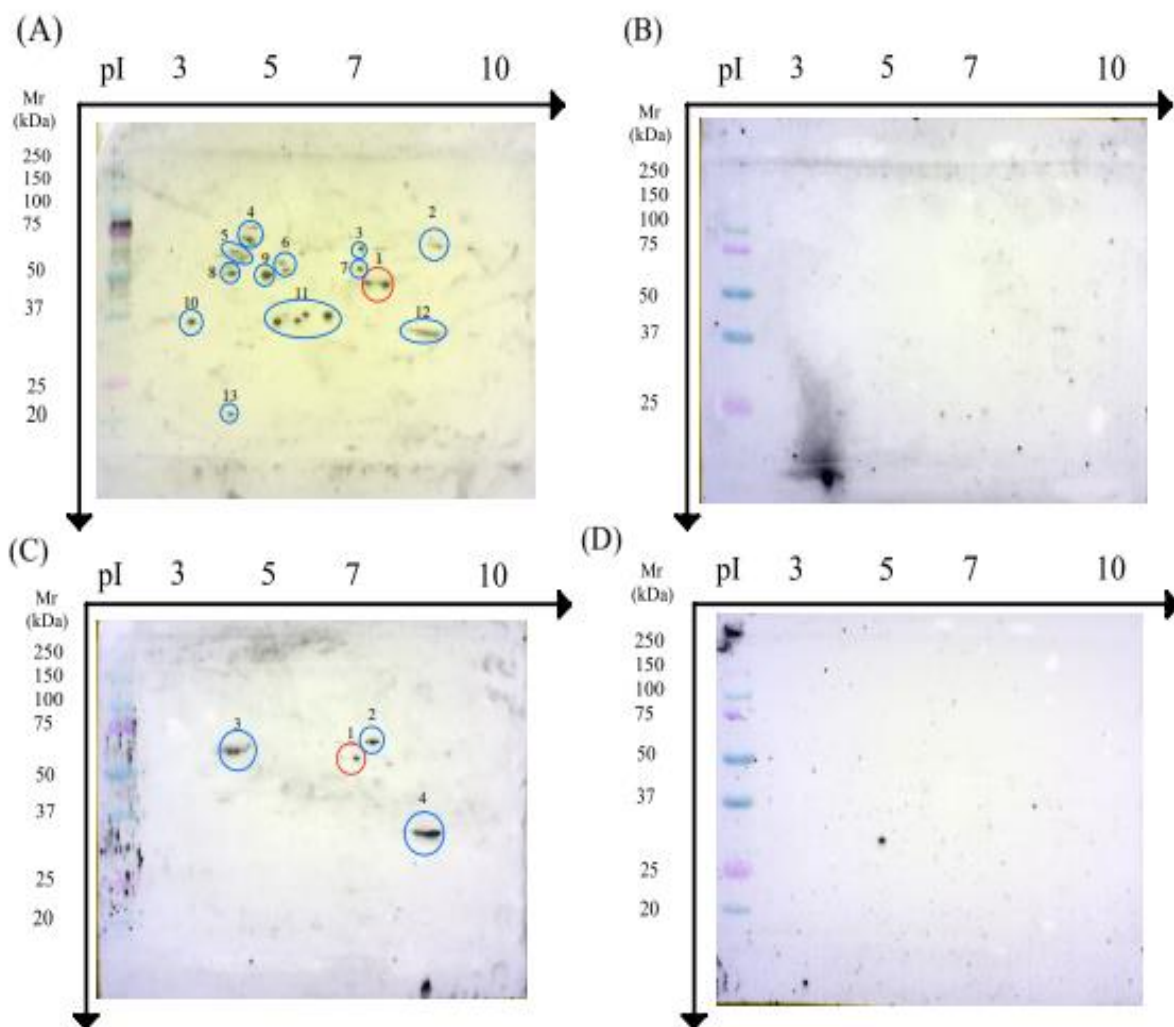
4.3.2 Analýza vzorků sér zdravých dárců metodou SERPA

Pro 2D-elektroforézu bylo nejprve nutné získat buněčný lyzát. Poté bylo provedena rehydratace a IEF gelových proužků (viz podkapitoly 3.4.3 a 3.4.4), následovala SDS-PAGE elektroforéza (viz podkapitola 3.4.5) a přenos proteinů z gelu na NCM technikou WB. Úspěšnost přenosu byla následně zjištěna barvením gelu roztokem Coomassie Blue a obarvením NCM roztokem stříbra.

Posledním krokem byla imunochemická detekce a vizualizace. Příprava a dávkování séra a konjugátu je uvedeno v Tabulce 15. Podmínky inkubace a následné vyhodnocení je stejné jako v předchozí podkapitole. Membrány po imunochemické detekci jsou zachyceny na Obrázku 25. Významné imunoreaktivní skvrny jsou na membránách označeny, jejich molekulová hmotnost a izoelektrický bod (pI) jsou zaznamenány v Tabulce 16. Sledovaný protein, ENO1, má molekulovou hmotnost 47,169 kDa a pI 7,01 [149]. Imunoreaktivní skvrna, která odpovídá svojí polohou na membráně proteinu ENO1, je vždy označena červeně a číslem 1, ostatní skvrny jsou označeny modře. Pro vlastní identifikaci proteinu by bylo nutné provést in-gel digest metodu společně s MALDI-MS analýzou (laserová desorpce/ionizace pomocí laseru za účasti matrice ve spojení s hmotnostní spektrometrií).

Tabulka 15: Příprava protilátek a dávkovaný objem roztoků na membránu.

| Typ protilátky | Ředění protilátky | Objem protilátky (μl) | Blokovací roztok (5% mléko, ml) | Dávkováno na membránu (ml) |
|----------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Sérum | 1:1000 | 10 | 10 | 1,5 |
| Konjugát | 1:5000 | 2 | 10 | Celý objem |



Obrázek 25: Snímky nitrocelulózových membrán (NCM) po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou).

Část (A) – NCM zdravého dárce (ZD) č. C201011002349 po detekci

Část (B) – NCM ZD č. C201009107647 po detekci

Část (C) – NCM ZD č. C201009108182 po detekci

Část (D) – NCM ZD č. C201009108384 po detekci

Tabulka 16: Molekulové hmotnosti a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 25.

| Část A | | | Část C | | |
|--------|---------------------------|-----|--------|---------------------------|-----|
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 48,2 | 7–8 | 1 | 52,2 | 7 |
| 2 | 64,1 | 9 | 2 | 63,3 | 7–8 |
| 3 | 63,3 | 7 | 3 | 56,6 | 4–5 |
| 4 | 73,9 | 4–5 | 4 | 32,6 | 8–9 |
| 5 | 68,1 | 4–5 | | | |
| 6 | 56,7; 53,8 | 5–6 | | | |
| 7 | 54,3 | 7 | | | |
| 8 | 52,2 | 4–5 | | | |
| 9 | 51,5 | 5 | | | |
| 10 | 35,6 | 3 | | | |
| 11 | 36,1; 36,7; 37,5; 37,1 | 5–7 | | | |
| 12 | 33,7 | 8–9 | | | |
| 13 | 20,9 | 4–5 | | | |

Jak lze na Obrázku 25 vidět, po imunochemické detekci a vizualizaci došlo ke zviditelnění imunoreaktivních skvrn u membrán (A) a (C). Imunoreaktivní skvrny 1 mají molekulovou hmotnost i izoelektrický bod odpovídající proteinu ENO1 (viz Tabulka 16).

4.4 Analýza sér pacientů s mnohočetným myelomem metodou SERPA

Imunoproteomické profilování vzorků sér pacientů s MM bylo provedeno z důvodu zjištění četnosti výskytu anti-ENO1 protilátek. Celkem bylo (i s kontrolními vzorky) analyzováno 25 vzorků. Analýza byla provedena metodou SERPA, jejíž podrobný postup je popsán v podkapitole 3.4. Po imunochemické detekci je pro identifikaci daného proteinů možnost provést metodu in-gel digest společně s MALDI-MS analýzou.

4.4.1 Analýza kontrolních vzorků metodou SERPA

Pozitivní kontrolou byl vzorek séra pacientky s MM, jako negativní kontrola bylo vybráno sérum ZD č. C201009107647, podrobnější informace o těchto vzorcích jsou uvedeny v podkapitole 3.3.

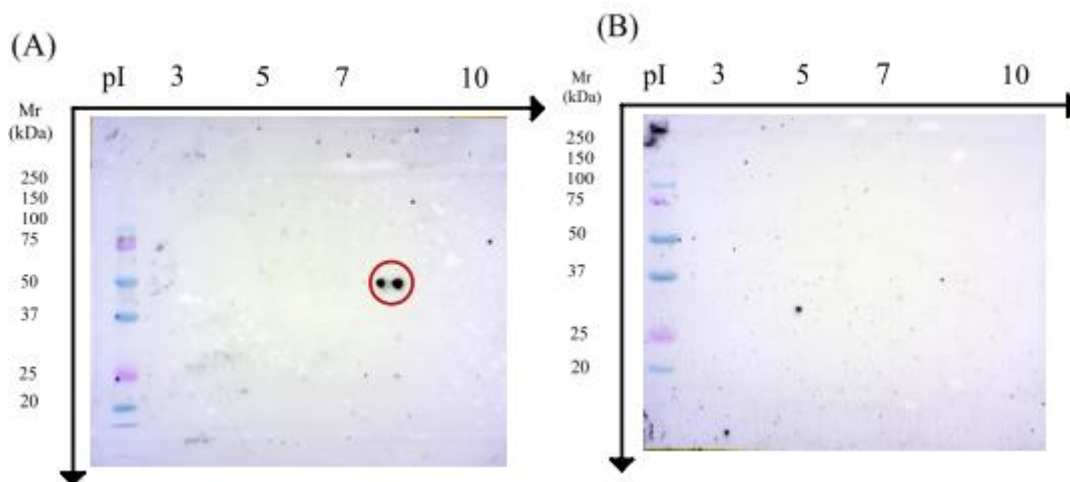
Nejprve bylo nutné získat buněčný lyzát (viz podkapitoly 3.4.1 a 3.4.2), poté bylo provedena rehydratace a IEF gelových proužků (viz podkapitoly 3.4.3 a 3.4.4), následovala SDS-PAGE elektroforéza (viz podkapitola 3.4.5) a přenos proteinů z gelu na NCM technikou WB (viz podkapitola 3.4.6). Úspěšnost přenosu byla následně zjištěna barvením gelu roztokem Coomassie Blue (viz podkapitola 3.4.7) a obarvením NCM roztokem stříbra (viz podkapitola 3.4.8). Posledním krokem byla imunochemická detekce a vizualizace (viz podkapitola 3.4.9). Příprava a dávkování séra a konjugátu je uvedeno v Tabulce 17 a 18. Inkubace s primární protilátkou probíhala 17 h přes noc na rotátoru v ledničce (4 °C), inkubace s konjugátem druhý den 1 h na třepačce za laboratorní teploty. Nakonec byla pomocí roztoku ECL provedena chemiluminescenční detekce. Vyfocení membrán proběhlo na stanici G:BOX Chemi XX6, vyhodnocení molekulových hmotností proběhlo v programu GeneTools. Membrány po imunochemické detekci lze vidět na Obrázku 26.

Tabulka 17: Příprava protilátek a dávkovaný objem roztoků na membránu (pozitivní kontrolní vzorek).

| Typ protilátky | Ředění protilátky | Objem protilátky (μl) | Blokovací roztok (5% mléko, ml) | Dávkováno na membránu (ml) |
|----------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Sérum | 1:1500 | 1 | 1,5 | Celý objem |
| Konjugát | 1:5000 | 2 | 10 | Celý objem |

Tabulka 18: Příprava protilátek a dávkovaný objem roztoků na membránu (negativní kontrolní vzorek).

| Typ protilátky | Ředění protilátky | Objem protilátky (μl) | Blokovací roztok (5% mléko, ml) | Dávkováno na membránu (ml) |
|----------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Sérum | 1:1000 | 10 | 10 | 1,5 |
| Konjugát | 1:5000 | 2 | 10 | Celý objem |



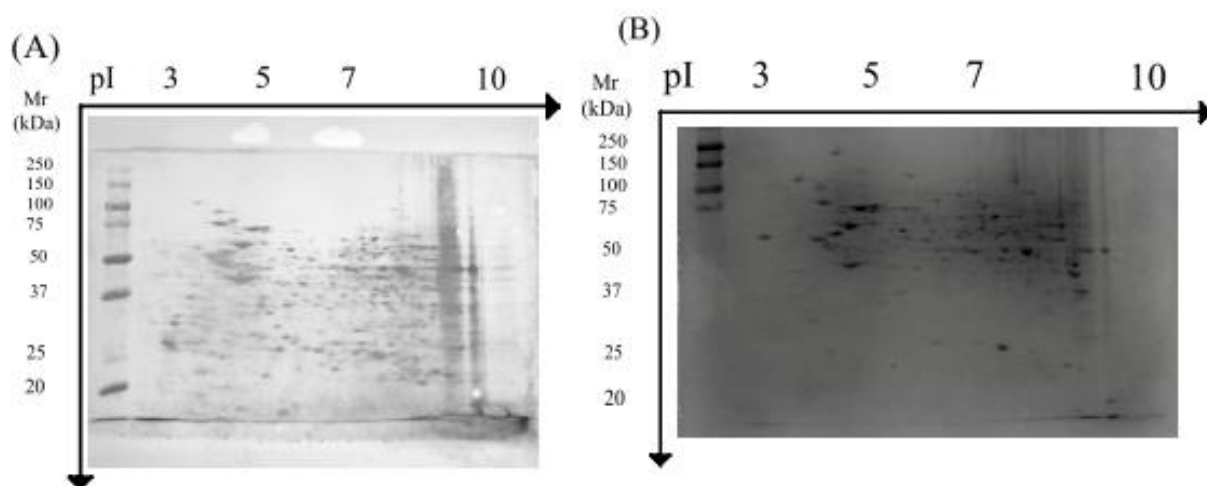
Obrázek 26: Snímky nitrocelulózových membrán (NCM) po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou).

Část (A) – NCM pozitivní kontroly po detekci, část (B) – NCM negativní kontroly po detekci

4.4.2 Analýza vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem metodou SERPA

Celkem bylo analyzováno 23 vzorků sér šesti pacientů s MM. U pěti pacientů byly vzorky odebírány v pravidelných intervalech, u jednoho pacienta byl analyzován pouze jeden vzorek po transplantaci. Jinak byl vždy první odběr v době stanovení diagnózy MM, další odběry byly už u jednotlivých pacientů individuálně, nejčastěji před transplantací (Tx), před tandemovou transplantací (TTx) a po Tx, případně ještě v rámci kontroly po delší době od transplantace.

Podrobný popis metody SERPA je popsán v podkapitole 3.4. Nejprve bylo nutné získat buněčný lyzát, poté bylo provedena rehydratace a IEF gelových proužků, následovala SDS-PAGE elektroforéza a přenos proteinů z gelu na NCM technikou WB. Úspěšnost přenosu byla následně zjištěna barvením gelu roztokem Coomassie Blue a obarvením NCM roztokem stříbra. Kontrolu úspěšnosti přenosu lze vidět na Obrázku 27.



Obrázek 27: Kontrola přenosů proteinů z gelu na nitrocelulóзовou membránu (NCM).

Část (A) – NCM s přenesenými proteiny, část (B) – gel s nepřenesenými proteiny

Posledním krokem byla imunochemická detekce a vizualizace. Příprava a dávkování séra a konjugátu je uvedeno v Tabulce 19. Podmínky inkubace a následné vyhodnocení je stejné jako v předchozí podkapitole. Membrány po imunochemické detekci jsou zachyceny u jednotlivých pacientů. Významné imunoreaktivní skvrny jsou na membránách označeny, jejich molekulová hmotnost je zaznamenána v tabulkách u jednotlivých pacientů. Imunoreaktivní skvrna, která odpovídá svojí polohou na membráně proteinu ENO1, je vždy označena červeně a číslem 1, ostatní skvrny jsou označeny modře. Skvrny, které se u pacienta objevují na více membránách jsou vedeny pod stejným číslem. Pro vlastní identifikaci proteinu by bylo nutné provést in-gel digest metodu společně s MALDI-MS analýzou. Touto metodou byly již dříve provedeny identifikace imunoreaktivních proteinů v poloze odpovídající ENO1 a to Mgr. Rudolfem Kupčíkem, Ph.D. na pracovišti Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové u jiných vzorků pacientů s MM, výskyt proteinu ENO1 v nich byl potvrzen.

Tabulka 19: Příprava protilátek a dávkovaný objem roztoků na membránu.

| Typ protilátky | Ředění protilátky | Objem protilátky (μl) | Blokovací roztok (5% mléko, ml) | Dávkováno na membránu (ml) |
|----------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Sérum | 1:500 | 10 | 5 | 1,5 |
| Konjugát | 1:5000 | 2 | 10 | Celý objem |

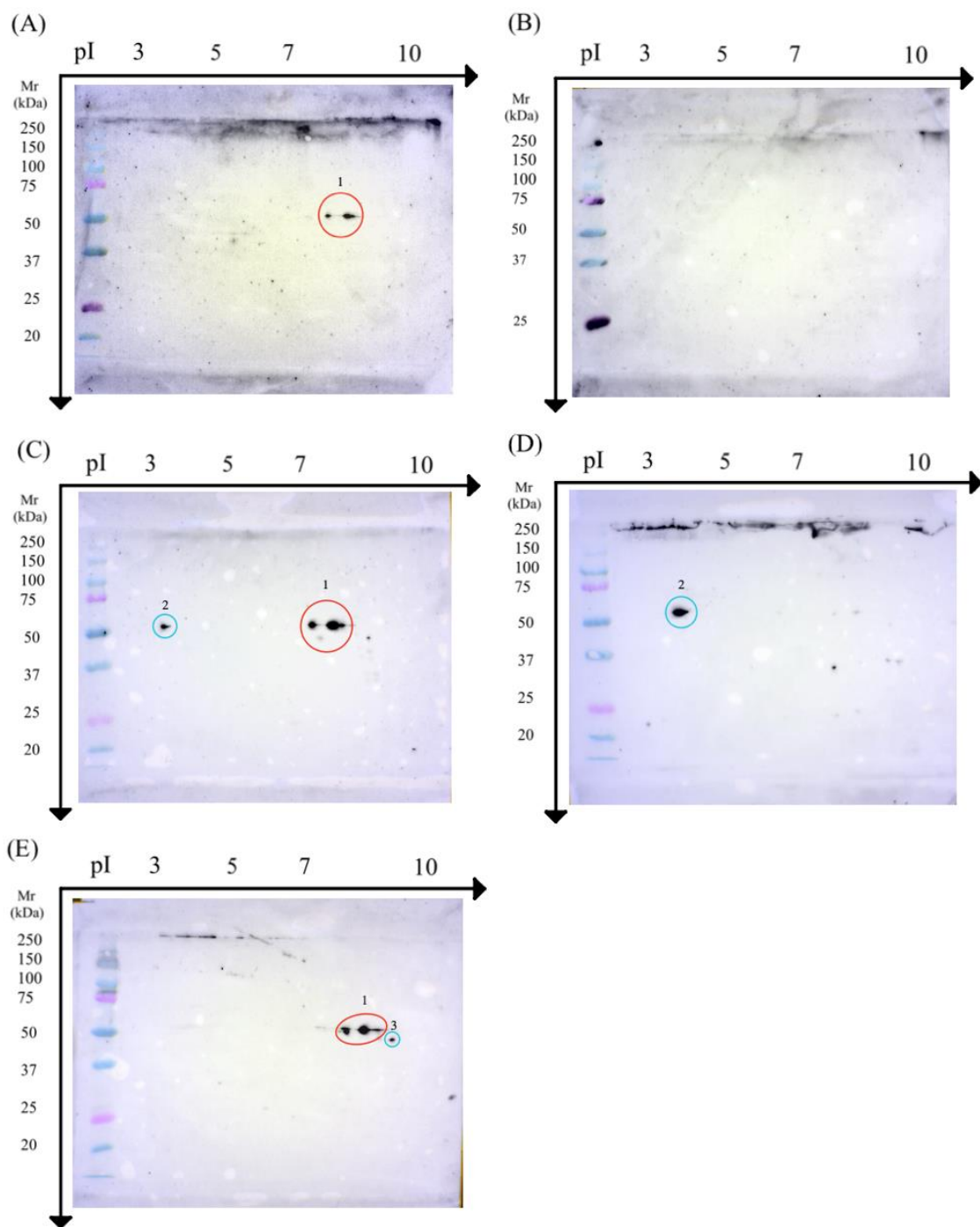
Tabulka 20: Přehled vzorků sér pacienta č. 1.

| Pohlaví | Kód vzorku | Datum odběru | Přibližný interval odběru |
|---------|--------------|--------------|--------------------------------------|
| Muž | M-20-001 (A) | 2. 1. 2020 | v době stanovení diagnózy MM |
| | M-20-091 (B) | 30. 6. 2020 | + 5 M, před transplantací |
| | M-20-132 (C) | 6. 10. 2020 | + 9 M, před tandemovou transplantací |
| | M-21-004 (D) | 14. 1. 2021 | +12 M, po tandemové transplantaci |
| | M-22-006 (E) | 12. 1. 2022 | + 24 M, kontrola po 1 roce |

Jak lze na Obrázku 28 vidět, po imunochemické detekci a vizualizaci došlo ke zviditelnění imunoreaktivních skvrn u membrán (A), (C), (D) a (E). Imunoreaktivní skvrny 1 mají molekulovou hmotnost i izoelektrický bod odpovídající proteinu ENO1 (viz Tabulka 21).

Tabulka 21: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 28.

| Část (A) | | | Část (C) | | |
|----------|---------------------------|-----|----------|---------------------------|-----|
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 53,1 | 8–9 | 1 | 52,0 | 7–8 |
| | | | 2 | 51,7 | 3–4 |
| | | | | | |
| Část (D) | | | Část (E) | | |
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 2 | 53,4 | 4 | 1 | 51,9 | 8–9 |
| | | | 3 | 46,8 | 9 |

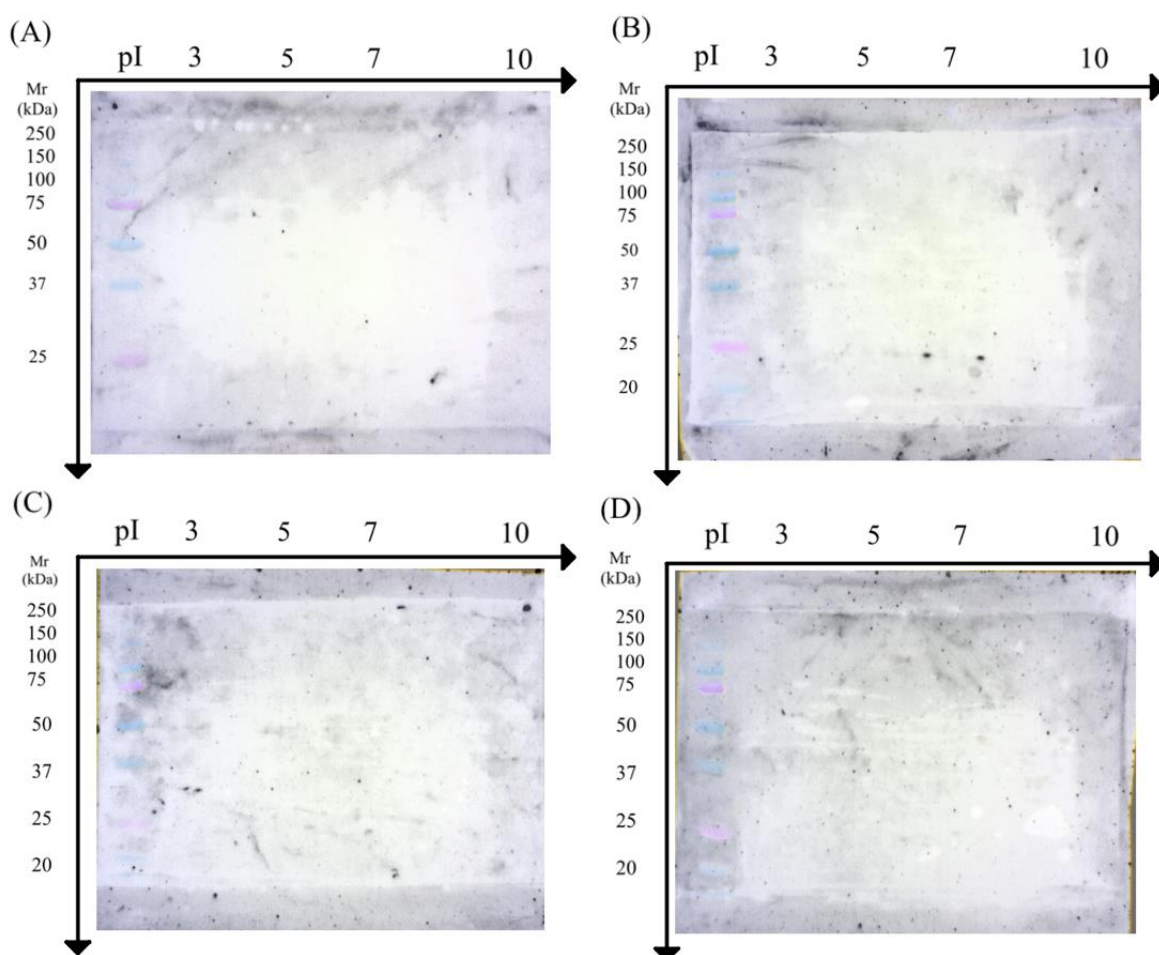


Obrázek 28: Snímky nitrocelulózových membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 1).

Tabulka 22: Přehled vzorků sér pacienta č. 3.

| Pohlaví | Kód vzorku | Datum odběru | Přibližný interval odběru |
|---------|--------------|--------------|--------------------------------------|
| Žena | M-20-034 (A) | 11. 3. 2020 | v době stanovení diagnózy MM |
| | M-20-106 (B) | 17. 8. 2020 | + 5 M, před transplantací |
| | M-20-156 (C) | 18. 11. 2020 | + 9 M, před tandemovou transplantací |
| | M-21-077 (D) | 25. 5. 2021 | +15 M, po tandemové transplantaci |

Jak lze na Obrázku 29 vidět, všechny membrány jsou po imunochemické detekci a vizualizaci v předpokládané části membrány bez imunoreaktivních skvrn.



Obrázek 29: Snímky nitrocelulóзовých membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 3).

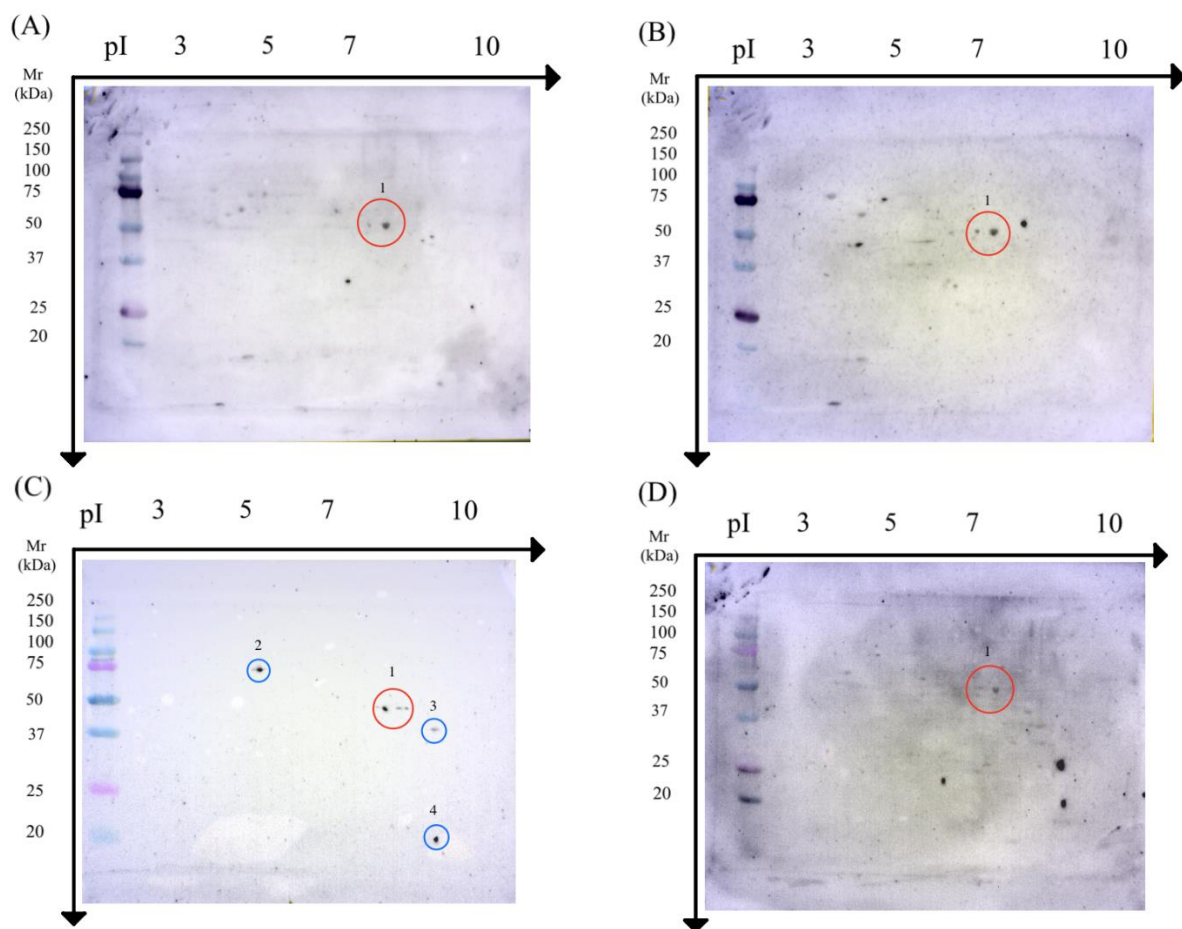
Tabulka 23: Přehled vzorků sér pacienta č. 4.

| Pohlaví | Kód vzorku | Datum odběru | Přibližný interval odběru |
|---------|--------------|--------------|------------------------------------|
| Muž | M-20-099 (A) | 22. 7. 2020 | v době stanovení diagnózy MM |
| | M-21-025 (B) | 15. 2. 2021 | + 7 M, před transplantací |
| | M-21-109 (C) | 10. 8. 2021 | + 13 M, po tandemové transplantaci |
| | M-22-028 (D) | 8. 2. 2022 | +15 M, po tandemové transplantaci |

Jak lze na Obrázku 30 vidět, po imunochemické detekci a vizualizaci došlo ke zviditelnění imunoreaktivních skvrn u membrán (A), (B), (C) i (D). Imunoreaktivní skvrny 1 mají molekulovou hmotnost i izoelektrický bod odpovídající proteinu ENO1 (viz Tabulka 24).

Tabulka 24: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 30.

| Část (A) | | | Část (B) | | |
|----------|---------------------------|------|----------|---------------------------|-----|
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 52,2 | 7–8 | 1 | 52,6 | 7–8 |
| | | | | | |
| Část (C) | | | Část (D) | | |
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 46,9 | 8–9 | 1 | 52,4 | 7–8 |
| 2 | 74,1 | 5–6 | | | |
| 3 | 38,5 | 9–10 | | | |
| 4 | 18,8 | 9–10 | | | |



Obrázek 30: Snímky nitrocelulóзовých membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 4, membrány (A), (B) a (D) převzaty z [153]).

Tabulka 25: Přehled vzorků sér pacienta č. 7.

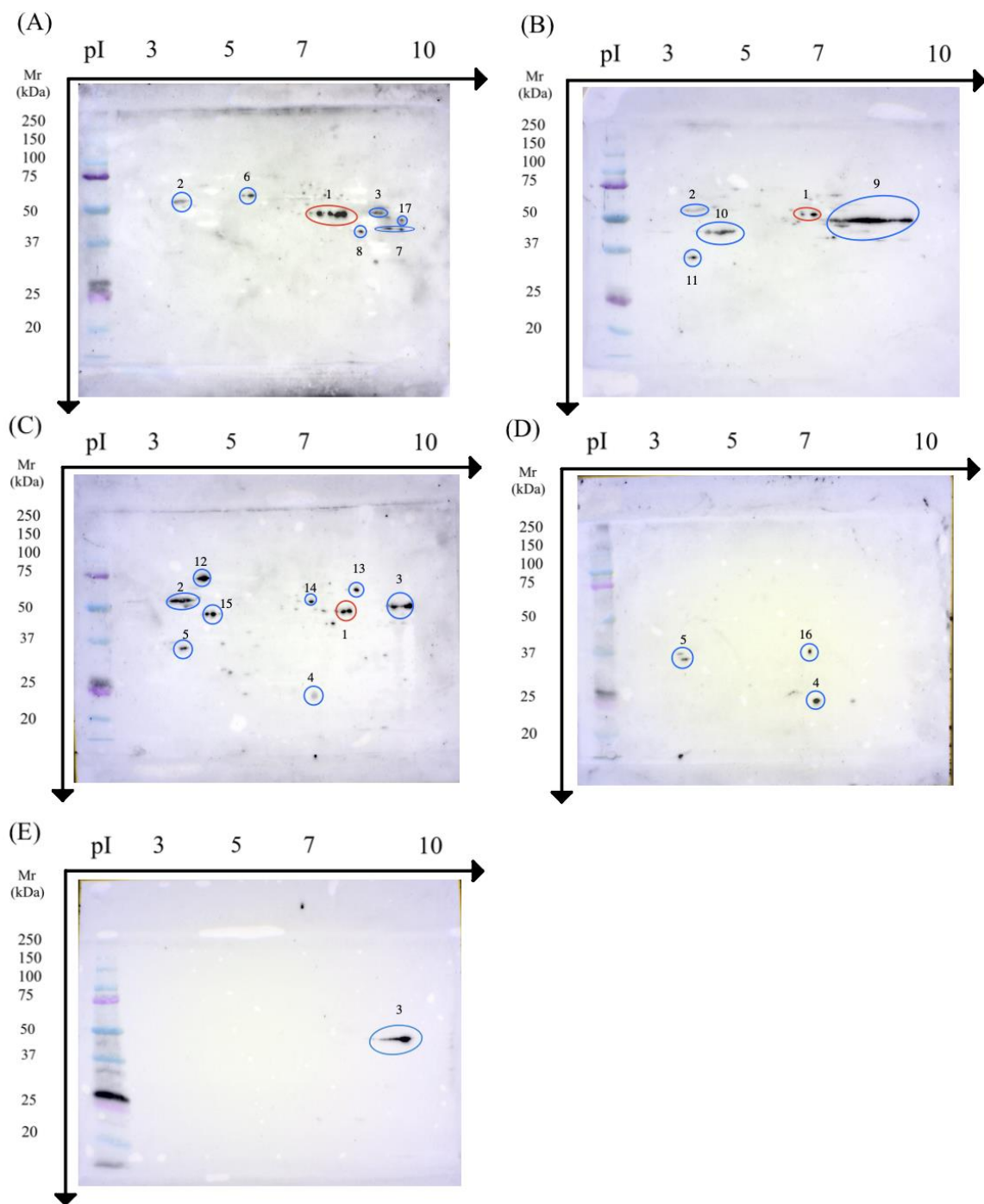
| Pohlaví | Kód vzorku | Datum odběru | Přibližný interval odběru |
|---------|--------------|--------------|---------------------------------------|
| Žena | M-20-019 (A) | 30. 1. 2020 | v době stanovení diagnózy MM |
| | M-20-103 (B) | 28. 7. 2020 | + 6 M, před transplantací |
| | M-20-140 (C) | 2. 11. 2020 | + 10 M, před tandemovou transplantací |
| | M-21-068 (D) | 10. 5. 2021 | +16 M, po tandemové transplantaci |
| | M-21-140 (E) | 13. 10. 2021 | + 21 M, kontrola po půl roce |

Jak lze na Obrázku 31 vidět, po imunochemické detekci a vizualizaci došlo ke zviditelnění imunoreaktivních skvrn u membrán (A), (B), (C), (D) i (E). Imunoreaktivní skvrny 1 mají molekulovou hmotnost i izoelektrický bod odpovídající proteinu ENO1 (viz Tabulka 26).

Tabulka 26: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 31.

| Část (A) | | | Část (B) | | |
|----------|---------------------------|------|----------|---------------------------|-----|
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 48,3 | 7–8 | 1 | 50,0; 49,8 | 6–7 |
| 2 | 54,4 | 4 | 2 | 56,7 | 4 |
| 3 | 51,8 | 9–10 | 9 | 48,3 | 7–9 |
| 6 | 60,3 | 5–6 | 10 | 41,1 | 4–5 |
| 7 | 42,2; 41,9 | 9 | 11 | 34,9 | 3–4 |
| 8 | 40,2 | 8–9 | | | |
| 17 | 45,8 | | | | |

| Část (C) | | | Část (D) | | |
|-----------------|----------------------------------|-----------|-----------------|----------------------------------|-----------|
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 49,1 | 7–8 | 4 | 24,4 | 7 |
| 2 | 55,5 | 3–4 | 5 | 34,9 | 3–4 |
| 3 | 51,9 | 9–10 | 16 | 37,6 | 7 |
| 4 | 24,6 | 7–8 | | | |
| 5 | 34,8 | 3–4 | | | |
| 12 | 74,2 | 4–5 | | | |
| 13 | 63,8 | 8–9 | Část (E) | | |
| 14 | 55,3 | 7 | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 15 | 47,7 | 4–5 | 3 | 46,5 | 9–10 |



Obrázek 31: Snímky nitrocelulóзовých membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 7).

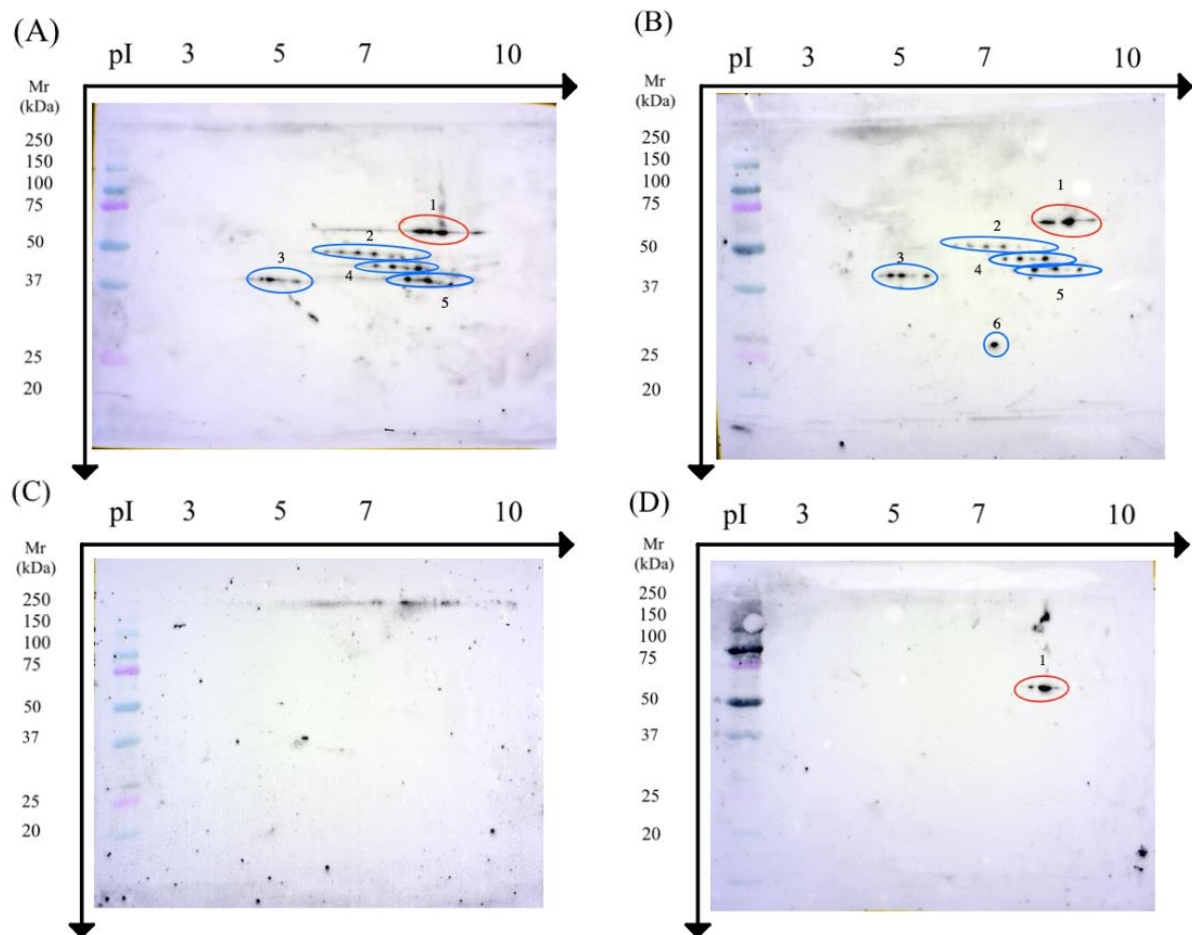
Tabulka 27: Přehled vzorků sér pacienta č. 8.

| Pohlaví | Kód vzorku | Datum odběru | Přibližný interval odběru |
|---------|--------------|--------------|--------------------------------------|
| Žena | M-17-075 (A) | 6. 9. 2017 | v době stanovení diagnózy MM |
| | M-18-034 (B) | 20. 3. 2018 | + 6 M, před transplantací |
| | M-18-070 (C) | 21. 6. 2018 | + 9 M, před tandemovou transplantací |
| | M-18-143 (D) | 6. 11. 2018 | +14 M, po tandemové transplantaci |

Jak lze na Obrázku 32 vidět, po imunochemické detekci a vizualizaci došlo ke zviditelnění imunoreaktivních skvrn u membrán (A), (B) a (D). Imunoreaktivní skvrny 1 mají molekulovou hmotnost i izoelektrický bod odpovídající proteinu ENO1 (viz Tabulka 28).

Tabulka 28: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 32.

| Část (A) | | | Část (B) | | |
|----------|---------------------------|-----|----------|---------------------------|-----|
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 56,8 | 8–9 | 1 | 66,1 | 8–9 |
| 2 | 48,5 | 6–8 | 2 | 52,1 | 6–8 |
| 3 | 37,8 | 4–6 | 3 | 41,4 | 4–6 |
| 4 | 41,8 | 7–9 | 4 | 46,9 | 7–9 |
| 5 | 37,0 | 8–9 | 5 | 43,4 | 8–9 |
| | | | 6 | 27,4 | 7–8 |
| Část (D) | | | | | |
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | | | |
| 1 | 59,0 | 8–9 | | | |



Obrázek 32: Snímky nitrocelulózových membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 8).

Tabulka 29: Přehled vzorků sér pacienta č. 9.

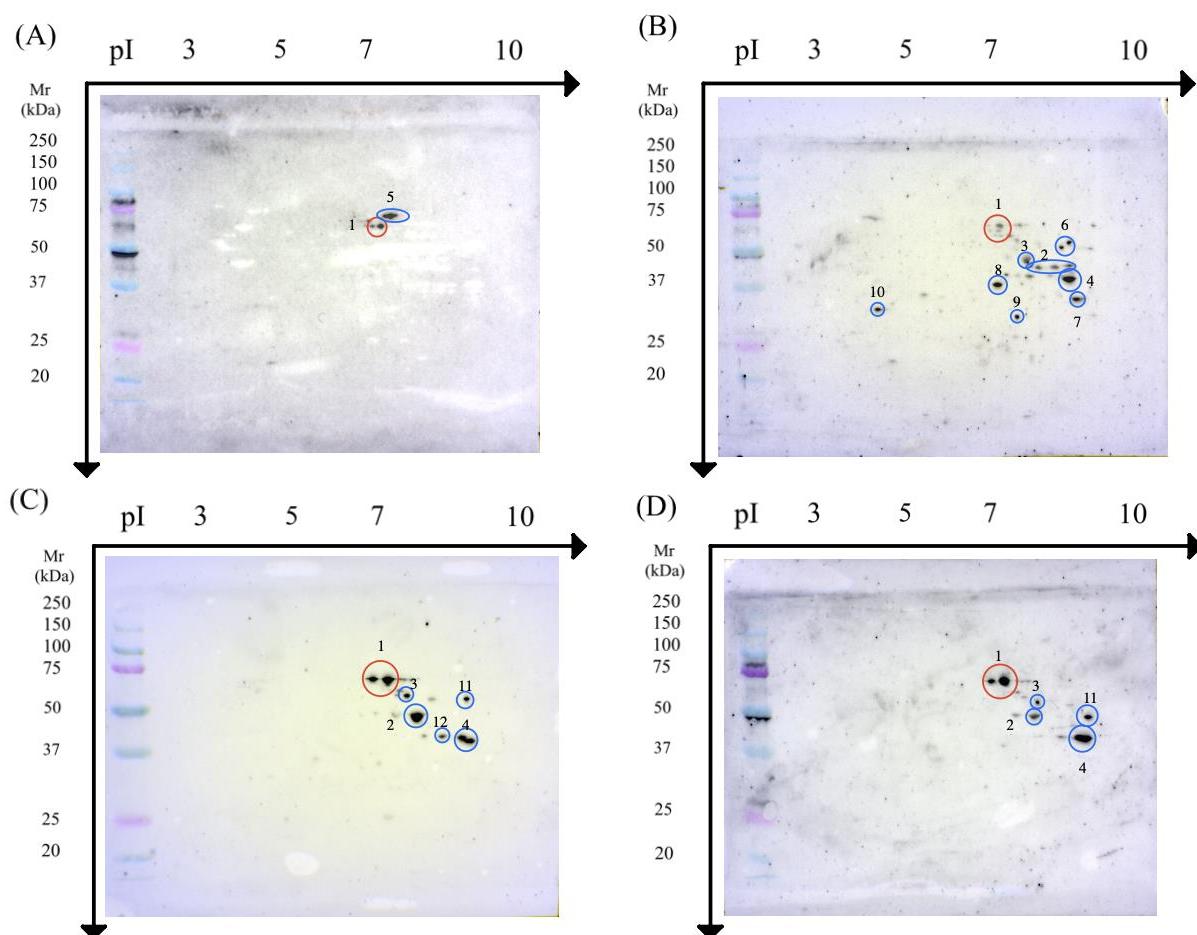
| Pohlaví | Kód vzorku | Datum odběru | Přibližný interval odběru |
|---------|--------------|--------------|---------------------------------------|
| Muž | M-17-082 (A) | 21. 9. 2017 | v době stanovení diagnózy MM |
| | M-18-045 (B) | 10. 4. 2018 | + 7 M, před transplantací |
| | M-18-136 (C) | 17. 10. 2018 | + 13 M, před tandemovou transplantací |
| | M-19-029 (D) | 20. 2. 2019 | +17 M, po tandemové transplantaci |

Jak lze na Obrázku 33 vidět, po imunochemické detekci a vizualizaci došlo ke zviditelnění imunoreaktivních skvrn u membrán (A), (B), (C) i (D). Imunoreaktivní skvrny 1 mají molekulovou hmotnost i izoelektrický bod odpovídající proteinu ENO1 (viz Tabulka 30).

Tabulka 30: Molekulová hmotnost a izoelektrický bod skvrn vyznačených na Obrázku 33.

| Část (A) | | | Část (B) | | |
|----------|---------------------------|-----|----------|---------------------------|------|
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 63,3 | 7 | 1 | 67,7; 61,4 | 7 |
| 5 | 69,2 | 7–8 | 2 | 45,5 | 7–8 |
| | | | 3 | 48,8 | 7–8 |
| | | | 4 | 41,7 | 9 |
| | | | 6 | 57,3 | 8–9 |
| | | | 7 | 34,4 | 9–10 |
| | | | 8 | 38,39 | 7 |
| | | | 9 | 30,4 | 7–8 |
| | | | 10 | 32,4 | 4–5 |

| Část (C) | | | Část (D) | | |
|----------|---------------------------|-----|----------|---------------------------|-----|
| Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI | Skvrna | Molekulová hmotnost (kDa) | pI |
| 1 | 64,9 | 7 | 1 | 69,8 | 7 |
| 2 | 47,8 | 7-8 | 2 | 49,6 | 7-8 |
| 3 | 54,9 | 7-8 | 3 | 57,1 | 7-8 |
| 4 | 38,9 | 9 | 4 | 41,6 | 9 |
| 11 | 54,9 | 9 | 11 | 49,7 | 9 |
| 12 | 40,6 | 8-9 | | | |



Obrázek 33: Snímky nitrocelulóзовých membrán po imunochemické detekci (SERPA s 2D-elektroforézou, pacient č. 9).

4.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno z Tabulky 31. Pro výpočet byl využit vzorec viz Rovnice 1. Pro zjištění p-hodnoty byla nejprve vypočítána pravděpodobnost z Tabulky 31, následně byly provedeny výpočty pravděpodobnosti ostatních tabulek při zachování marginálních četností (stejný součet hodnot řádků i sloupců v jednotlivých tabulkách). Hodnoty pravděpodobností nižší nebo rovné výsledku z Tabulky 31 byly sečteny, výsledná p-hodnota = 0,07559 > 0,05, zamítáme tedy nulovou hypotézu, která tvrdí, že není rozdíl ve výskytu anti-ENO1 protilátek u vzorků sér ZD a u pacientů s MM. Na Obrázku 34 lze vidět výsledný „Mosaic Plot“.

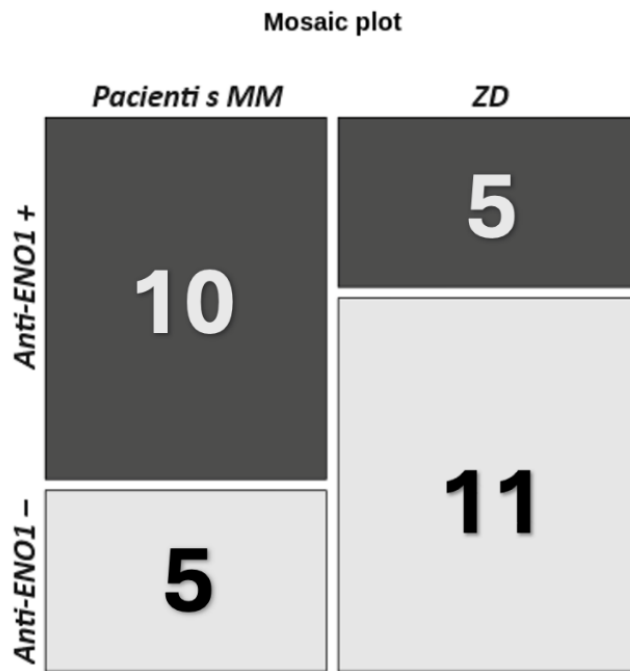
Tabulka 31: Výchozí hodnoty pro statistické vyhodnocení významnosti anti-ENO1 autoprotilátek.

Anti-ENO1 – protilátky proti enoláze 1, MM – pacienti s mnohočetným myelomem, ZD – zdraví dárči

| | Vzorky sér | | Celkem |
|----------------------|------------|--------|--------|
| Anti-ENO1 protilátky | MM | ZD | |
| + (přítomny) | 10 (A) | 5 (B) | 15 |
| - (nepřítomny) | 5 (C) | 11 (D) | 16 |
| Celkem | 15 | 16 | 31 (N) |

Rovnice 1: Vzorec pro výpočet pravděpodobnosti.

$$p = \frac{((A) + (B))! ((A) + (C))! ((C) + (D))! ((B) + (D))!}{(N)! (A)! (B)! (C)! (D)!}$$



Obrázek 34: „*Mosaic plot*“ zachycující výskyt anti-ENO1 protilátek u pacientů s mnohočetným myelomem a u zdravých dárců.

Anti-ENO1 – protilátky proti enoláze 1, MM – mnohočetný myelom, ZD – zdraví dárči

5 DISKUZE

Experimentální část této diplomové práce byla rozdělena na 5 částí – optimalizace podmínek WB metody, použití optimalizovaného postupu pro průkaz a monitoring výskytu specifických anti-ENO1 autoprotilátek v lidském séru, ověření postupu normalizace metody pomocí vnitřního standardu, proměření vzorků sér pacientů s MM a ZD s cílem prokázat výskyt anti-ENO1 autoprotilátek u obou skupin a použití bioinformatických nástrojů k vyhodnocení výsledků.

Pro optimalizaci podmínek WB metody s využitím Trans-Blot Turbo bylo provedeno několik pokusů. Nejprve bylo postupováno dle návodu, který byl součástí soupravy pro přístroj (program MIXED MW, 2,5 A; 25 V, 7 minut). Tento pokus nebyl úspěšný, proto došlo při následném pokusu ke změně podmínek, konkrétně byl prodloužen čas potřebný pro přenos proteinů z gelu na membránu (program HIGH MW, 2,5 A, 25 V, 10 minut). Ani za těchto podmínek k přenosu proteinů nedošlo. Při dalším pokusu byla využita vyšší vrstva filtračního papíru pro zlepšení kontaktu gelu s NC. Zde byly provedeny dva samostatné přenosy za různých podmínek, první při programu HIGH MW (1,3 A; 25 V, 10 minut), druhý při programu HIGH MW (1,3 A; 25 V, 20 minut). Při vyšší vrstvě filtračních papírů byla již účinnost přenosu výrazně lepší. Z Obrázků 17 a 18 také vyplývá, že není nutné prodlužovat dobu analýzy, optimálního výsledku je dosaženo již po 10 minutách. Na obou obrázcích lze vidět nižší účinnost přenosu v oblasti vysokomolekulárních proteinů (mezi 100 kDa a 50 kDa). Protein ENO1, který se stanovuje v dalších analýzách experimentální části, má molekulovou hmotnost 47,169 kDa [149]. Účinnost přenosu proteinů je v oblasti o dané molekulové hmotnosti dostatečná.

S cílem nahradit komerční roztoky dodávané firmou jako součást soupravy roztoky vlastními, levnějšími, byla porovnáována účinnost přenosu proteinů na membrány v roztocích o různém složení. Jak lze na Obrázku 19 vidět, účinnost přenosu je při použití komerčního i vlastního transferového pufru srovnatelná. Při použití komerčního pufru došlo k přenosu mírně účinnějšímu, avšak v oblasti očekávané polohy ENO1 srovnatelnému. Detailní složení komerčního pufru bohužel není známo, rozdílem by mohlo být použití ethanolu při přípravě komerčního pufru a methanolu při přípravě vlastního transferového pufru. V následujících experimentech byl použit vlastní transferový pufr.




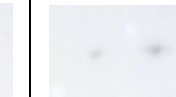



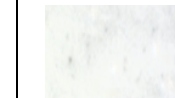
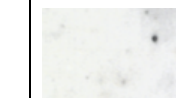
Dalším úkolem bylo nastavit podmínky umožňující normalizaci výsledků získaných metodou SERPA, a to za použití vnitřního standardu, konkrétně β -aktinu. Nejprve byla provedena SDS-PAGE elektroforéza β -aktinu. Na Obrázku 20 lze vidět intenzivní proužek mezi 50 kDa a 37 kDa a vyšší množství méně výrazných proužků o vyšší molekulové hmotnosti, což mohou být oligomerní struktury až agregáty BA. Dostatečně viditelná koncentrace BA je 0,5 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$, vzhledem k dalším analýzám (a možným ztrátám během nich) byly zvoleny také koncentrace 1 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ a 2,5 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$. Pro ověření vazby specifických anti- β -aktinových protilátek na BA byla provedena SDS-PAGE elektroforéza, WB a imunochemická detekce. Jak lze na Obrázku 22 vidět, ani u jedné ze čtyř membrán nebyla po detekci prokázána imunoreaktivita, dle Obrázku 21 proběhl přenos proteinů z gelu na NC v pořádku. Příčinou může být pravděpodobně nefunkční anti-BA protilátka, případně nefunkční konjugát. Vzhledem k vysokým nákladům na pořízení a otestování funkčnosti dalších protilátek a dle pokynů školitele se v dalších krocích optimalizace v rámci této diplomové práce nepokračovalo.


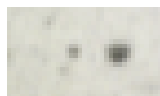
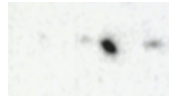
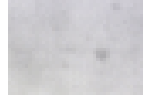
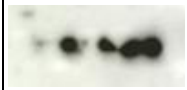



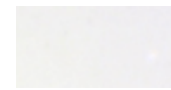


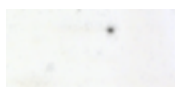

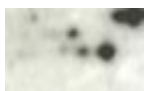

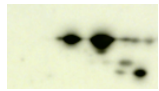

Za účelem zjištění četnosti výskytu anti-ENO1 autoproti látek bylo provedeno u čtyř ZD tzv. imunoproteomické profilování. Otázkou bylo, zda je nutné proteiny lyzátu separovat jak IEF, tak i pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Náklady na sérii analýz se při použití IEF výrazně zvyšují, nejdražší položkou jsou gelové proužky s gradientem pH, vlastní technika IEF navíc čas analýzy výrazně prodlužuje. Toto byly důvody, proč byla nejprve provedena série testů se separací proteinů pouze dle molekulové hmotnosti (1D-SDS-PAGE). Pomocí této metody byla testována reaktivita separovaných proteinů se séry ZD. Oproti očekávání byla téměř u všech vzorků zřejmá výrazná reaktivita, a to hlavně v oblasti nízkých molekulových hmotností (25 kDa, viz Obrázek 24). Více reaktivních proužků lze vidět v případě ředění buněčného lyzátu a roztoku G v poměru 1:1 u membrány (A) a také u membrány (C). Molekulové hmotnosti jednotlivých imunoreaktivních proužků lze najít v Tabulce 14. Imunoreaktivní proužek 1 u membrány (A) má molekulovou hmotnost 49,7 kDa, pravděpodobně se může jednat o reakci anti-ENO1 IgG protilátek s proteinem ENO1. Další imunoreaktivní proužky jsou v rozdílných molekulových hmotnostech, jde pravděpodobně pouze o nespecifické interakce a nedostatečné rozdělení proteinů buněčného lyzátu. Tyto experimenty jasně ukázaly, že chceme-li studovat reaktivní molekuly v séru pacientů s MM či u ZD, je nutné provést důslednou separaci všech proteinů lyzátu, a to jak dle molekulové hmotnosti, tak i dle pI. Jedině tak lze zajistit, že imunoreaktivní skvrna bude s vysokou pravděpodobností reakcí specifické protilátky pouze

s jedním konkrétním specifickým proteinem. Následující analýzy vzorků sér pacientů s MM a ZD probíhaly v klasickém uspořádání metody SERPA, kde byla komplexní směs proteinů buněčného lyzátu separována dle dvou na sobě nezávislých parametrů.

Pro porovnání sér ZD a pacientů s MM byla tedy u sér ZD provedena také metoda SERPA s 2D-elektroforézou. Jak lze na Obrázku 25 vidět, po vizualizaci byly nalezeny imunoreaktivní skvrny u membrán (A) a (C). Membrána (A) obsahuje po imunochemické detekci vysoké množství reaktivních skvrn. Imunoreaktivní skvrna 1 má molekulovou hmotnost 48,19 kDa, vzhledem k její poloze se může jednat o reakci anti-ENO1 IgG protilátek s proteinem ENO1. Membrána (C) obsahuje po imunochemické detekci také imunoreaktivní skvrny, skvrna 1 má molekulovou hmotnost 52,19 kDa, opět by se mohlo jednat o reakci anti-ENO1 s proteinem ENO1. U membrány (B) a (D) nebyly prokázány žádné imunoreaktivní skvrny. Metoda SERPA s 2D-elektroforézou byla následně provedena i u šesti pacientů s MM (viz Tabulka 32).

Tabulka 32: Přehled imunoreaktivních skvrn a zhodnocení jejich intenzity u pacientů s mnohočetným myelomem.

| | M-20-001 (A) | M-20-091 (B) | M-20-132 (C) | M-21-004 (D) | M-22-006 (E) |
|--|---|---|--|---|---|
| Pacient č. 1 | vstup | + 5 M, před Tx | + 9 M, před Tx | + 12 M, po Tx | + 24 M |
| muž |  |  |  |  |  |
| U pacienta č. 1 byla v době stanovení diagnózy MM (A) zachycena středně intenzivní imunoreaktivní skvrna 1 (pravděpodobně reakce anti-ENO1 IgG s proteinem ENO1), při dalším odběru (B) nebyla reaktivita prokázána. Při dalším odběru před transplantací (C) se opět skvrna 1 objevila, tentokrát silně intenzivní. Po transplantaci (D) nebyla opět reaktivita prokázána. Při poslední odběru (E) se opět silně intenzivní skvrna 1 objevuje. Na membráně se vyskytují i další imunoreaktivní skvrny (viz Obrázek 28). | | | | | |
| | M-20-034 (A) | M-20-106 (B) | M-20-156 (C) | M-21-077 (D) | |
| Pacient č. 3 | vstup | + 5 M, před Tx | + 9 M, před Tx | + 15 M, po Tx | |
| žena |  |  |  |  | |
| U pacienta č. 3 nebyly v předpokládané části membrány zachyceny žádné imunoreaktivní skvrny. | | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|--|---|---|
| Pacient č. 4 muž | M-20-099 (A) vstup | M-21-035 (B) + 7 M, před Tx | M-21-109 (C) + 13 M po Tx | M-22-028 (D) + 19 M po Tx | |
| |  |  |  |  | |
| <p>U pacienta č. 4 byla v době stanovení diagnózy MM (A) zachycena slabě intenzivní imunoreaktivní skvrna 1 (pravděpodobně reakce anti-ENO1 IgG s proteinem ENO1), při dalším odběru (B) byla skvrna stejné intenzity. Při dalších odběrech po transplantaci (C) a (D) byla stále skvrna 1 přítomna, při odběru (C) středně intenzivní, při odběru (D) již opět slabě intenzivní (viz Obrázek 30).</p> | | | | | |
| Pacient č. 7 žena | M-20-019 (A) vstup | M-20-103 (B) + 6 M, před Tx | M-20-140 (C) + 10 M, před T | M-21-068 (D) + 16 M, po Tx | M-21-140 (E) + 21 M |
| |  |  |  |  |  |
| <p>U pacienta č. 7 byla v době stanovení diagnózy MM (A) zachycena silně intenzivní imunoreaktivní skvrna 1 (pravděpodobně reakce anti-ENO1 IgG s proteinem ENO1), při dalším odběru (B) byla již skvrna 1 pouze středně intenzivní. Při dalším odběru před transplantací (C) byla opět skvrna 1 přítomna, tentokrát opět střední intenzity. Po transplantaci (D) a (E) nebyla reaktivita prokázána. Na membráně se vyskytují i další imunoreaktivní skvrny (viz Obrázek 31).</p> | | | | | |
| Pacient č. 8 žena | M-17-075 (A) vstup | M-18-134 (B) + 6 M, před Tx | M-18-070 (C) + 9 M, před Tx | M-18-143 (D) + 14 M, po Tx | |
| |  |  |  |  | |
| <p>U pacienta č. 8 byla v době diagnózy MM (A) zachycena silně intenzivní imunoreaktivní skvrna 1 (pravděpodobně reakce anti-ENO1 IgG s proteinem ENO1), při dalším odběru (B) byla již skvrna 1 pouze středně intenzivní. Při dalším odběru před transplantací (C) nebyla reaktivita prokázána, po transplantaci (D) se opět objevuje silně intenzivní skvrna 1. Na membráně se vyskytují i další imunoreaktivní skvrny (viz Obrázek 32).</p> | | | | | |
| Pacient č. 9 muž | M-17-082 (A) vstup | M-18-045 (B) + 7 M, před Tx | M-18-136 (C) + 13 M, po Tx | M-19-029 (D) + 17 M | |
| |  |  |  |  | |
| <p>U pacienta č. 9 byla v době stanovení diagnózy MM (A) zachycena středně intenzivní imunoreaktivní skvrna 1 (pravděpodobně reakce anti-ENO1 IgG s proteinem ENO1), při dalším odběru (B) byla již skvrna 1 pouze slabě intenzivní. Při dalších odběrech po transplantaci (C) a (D) intenzita imunoreaktivní skvrny 1 zesílila. Na membráně se vyskytují i další imunoreaktivní skvrny (viz Obrázek 33).</p> | | | | | |

Pro statistické vyhodnocení výsledků bylo nutné započíst i výsledky analýz, které byly provedeny v rámci předcházejících diplomových prací realizovaných v letech 2020–2023 (viz Příloha 3).

Pro vyhodnocení klinické významnosti anti-ENO1 autoprotilátek v čase u pacientů s MM byly využity výsledky vyšetření vzorků sér 10 pacientů (viz Obrázek 36 a 37), vzorky poskytla Fakultní nemocnice v Ostravě. Vždy byla porovnávána přítomnost anti-ENO1 protilátek v době diagnózy a následně po transplantaci. U sedmi pacientů s MM byly anti-ENO1 autoprotilátky přítomny v době diagnózy, pouze u jednoho pacienta (č. 8) nebyla po transplantaci imunoreaktivita prokázána. U tří pacientů nebyly anti-ENO1 autoprotilátky v době diagnózy přítomny, u jednoho pacienta (č. 5) byla imunoreaktivita prokázána až po transplantaci. Z celkového počtu 10 pacientů byly anti-ENO1 protilátky nalezeny u 7 pacientů v době diagnózy a u 6 pacientů po transplantaci.

Pro statistické vyhodnocení výskytu specifických anti-ENO1 autoprotilátek u pacientů s MM byly využity výsledky vyšetření vzorků sér 10 pacientů z Fakultní nemocnice v Ostravě (viz Obrázek 36 a 37), ale i dalších vzorků sér 5 pacientů z Fakultní nemocnice v Brně (viz Obrázek 35). Vzorků sér ZD bylo celkem 16, vzorky poskytla Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice. U deseti pacientů s MM byly anti-ENO1 autoprotilátky přítomny v době diagnózy, u pěti pacientů se v době diagnózy nevyskytovaly. Ve vzorcích sér ZD byly nalezeny anti-ENO1 u pěti jedinců. Pro výpočet významnosti byl proveden Fisherův exaktní test. Nulovou hypotézou bylo, že mezi vzorky sér ZD a pacientů s MM ve výskytu anti-ENO1 protilátek není rozdíl, hladina významnosti α byla 0,05. Výsledná p-hodnota vyšla 0,07559. Jelikož je výsledek vyšší než hladina významnosti, zamítáme nulovou hypotézu. P-hodnota je však velmi blízká hodnotě 0,05 a je tedy na hraně statistické významnosti. K ověření zamítnutí nulové hypotézy by bylo vhodné navýšit počet vzorků, ideálně na 40–50 vzorků sér pacientů s MM a stejný počet vzorků sér ZD.

Vyšší výskyt anti-ENO1 autoprotilátek u pacientů s MM může souviset právě již s dříve zmíněnou vyšší expresí ENO1 na povrchu nádorových (a tedy i myelomových) buněk [17]. Jak dokládají výsledky a pozorování v jiných studiích, lze vztáhnout výskyt těchto protilátek k reakci imunitního systému právě na vyšší expresi a aktivitu ENO1 u jedinců s nádorovým onemocněním [115, 120, 137, 140, 144]. Bude-li tento předpoklad u pacientů s MM experimentálně potvrzen, mohlo by být stanovení anti-ENO1 autoprotilátek do budoucna

doplňkovým diagnostickým markerem. Bude-li analýzou většího množství sér pacientů s MM zhodnocen také průběh onemocnění, účinnost léčby, délka období remise, četnost a závažnost relapsů onemocnění, mohly by být anti-ENO1 protilátky také prognostickým markerem, ENO1 by bylo možné zařadit mezi nové terapeutické cíle při boji s MM a podání anti-ENO1 protilátek by mohlo být součástí budoucí léčby.

6 ZÁVĚR

Nádorová onemocnění se řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí v populaci. Diagnostiku usnadňují především biomarkery specifické pro dané onemocnění či orgán, ne vždy lze však specifický biomarker přiřadit pouze ke konkrétní nemoci. Právě proto jsou onkologická onemocnění i v dnešní době poměrně špatně diagnostikovatelná, zvláště v prvních fázích rozvoje onemocnění. Příznaky se zpravidla objevují až v pokročilých fázích, kdy už je počet nádorových buněk značně zvýšený. Při navrhování léčby je těžké predikovat, jak bude daný pacient na léčbu reagovat. Proto by bylo vhodné nalézt k rozlišení závažnosti onemocnění biomarker, který informuje o schopnosti imunitního systému zapojit se do protinádorové imunity, odráží změny v nádorové zátěži a poskytuje informace také o odpovědi organismu na probíhající léčbu. Právě touto molekulou by mohly být autoprotilátky proti enoláze 1, které se tvoří v reakci na vyšší expresi a aktivitu enolázy 1 u nádorových buněk. Imunitní systém pomocí nich pravděpodobně kontroluje množství nádorových buněk, na které mohou mít cytotoxický efekt.

K léčbě mnohočetného myelomu se stále využívá kombinace chemoterapie a autologní transplantace, do popředí se pomalu dostávají bispecifické protilátky a léčba CAR-T-lymfocyty. Použití obou novějších metod terapie je však v dnešní době stále omezeno, hlavně z důvodu výrobní kapacity a také vysoké ceny. Pokud by byly v dalších experimentech potvrzeny autoprotilátky proti enoláze 1 jako možný diagnostický a také prognostický marker, mohla by být enoláza 1 novým potenciálním terapeutickým cílem. Snaha inhibovat enolázu 1 je již v několika studiích popsána ([127, 129, 130]), samotné podání anti-enolázových protilátek by mohlo být do budoucna novou možností terapie, která organismu zcela jistě nepřinese takovou zátěž, jako chemoterapie.

V rámci této diplomové práce byla porovnávána četnost výskytu autoprotilátek proti enoláze 1 u pacientů s mnohočetným myelomem a také u zdravých dárců. Bylo zjištěno, že se autoprotilátky vyskytovaly u obou skupin, ve vyšší míře u pacientů s mnohočetným myelomem. Výsledkem statistického vyhodnocení bylo, že rozdíl mezi přítomností autoprotilátek proti enoláze 1 u pacientů s mnohočetným myelomem a u zdravých dárců existuje, výsledná p-hodnota byla však velmi blízko hladině významnosti. K ověření tohoto výsledku je nutné získat více vzorků sér jedinců z obou skupin.

Dále byl porovnáván výskyt anti-enolázových protilátek u pacientů s mnohočetným myelomem v době diagnózy a následně po transplantaci. Z celkového počtu 10 pacientů byly autoprottilátky proti enoláze 1 nalezeny u 7 pacientů v době diagnózy a u 6 pacientů po transplantaci. Momentálně tedy nelze potvrdit rozdíl ve výskytu protilátek v průběhu léčby onemocnění.

Pro zařazení anti-enolázových protilátek mezi diagnostické a prognostické markery a potenciální terapeutickou možnost (stejně jako zařazení ENO1 jako terapeutického cíle) je nutné dále pokračovat ve výzkumu, rozšířit počet vzorků sér pacientů s mnohočetným myelomem, a především tyto pacienty sledovat dlouhodobě.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ELDRIDGE, Lynne. Cancer cells. *Very well health* [online]. 2023 [cit. 2023-12-29]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/what-are-cancer-cells-2248795>
- [2] PATEL, Aisha. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology* [online]. 2020, 6(9), 1488 [cit. 2024-01-13]. ISSN 2374-2437. Dostupné z: doi:10.1001/jamaoncol.2020.2592
- [3] ELDRIDGE, Lynne. Cancer Cells vs. Normal Cells: How Are They Different? *Very well health* [online]. 2023 [cit. 2023-12-29]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/cancer-cells-vs-normal-cells-2248794>
- [4] HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, 144(5), 646-674 [cit. 2023-12-29]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- [5] HANAHAN, Douglas a Robert A WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. 2000, 100(1), 57-70 [cit. 2023-12-29]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- [6] WITSCH, Esther, Michael SELA a Yosef YARDEN. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology* [online]. 2010, 25(2), 85-101 [cit. 2023-12-29]. ISSN 1548-9213. Dostupné z: doi:10.1152/physiol.00045.2009
- [7] BURKHART, Deborah L. a Julien SAGE. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2008, 8(9), 671-682 [cit. 2023-12-29]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2399
- [8] AMIN, A.R.M. Ruhul, Phillip A. KARPOWICZ, Thomas E. CAREY, et al. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2015, 35(1), 55-77 [cit. 2023-12-29]. ISSN 1044-579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2015.02.005
- [9] HOPPE-SEYLER, Karin, Felicitas BOSSLER, Julia A. BRAUN, Anja L. HERRMANN a Felix HOPPE-SEYLER. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology* [online].

- [10] PFEFFER, Claire a Amareshwar SINGH. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(2), 1-10 [cit. 2023-12-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19020448
- [11] HAIDER, Mobeen a Faiz ANWER. Genetics, Philadelphia Chromosome. *National Library of Medicine* [online]. 2023 [cit. 2023-12-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560689>
- [12] KUNLIN, Jin. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease* [online]. 2010, 1(2), 72-74 [cit. 2023-12-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995895/>
- [13] LUGANO, Roberta, Mohanraj RAMACHANDRAN a Anna DIMBERG. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2020, 77(9), 1745-1770 [cit. 2023-12-29]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-019-03351-7
- [14] CDH1 gene. *MedlinePlus* [online]. 2017 [cit. 2023-12-29]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/cdh1/>
- [15] BERX, G. a F. VAN ROY. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2009, 2009, 1(6), a003129-a003129 [cit. 2023-12-29]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a003129
- [16] GONZALEZ, Hugo, Catharina HAGERLING a Zena WERB. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & Development* [online]. 2018, 32(19-20), 1267-1284 [cit. 2023-12-29]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.314617.118
- [17] HUANG, Chen Kai, Ying SUN, Lei LV a Yong PING. ENO1 and Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics* [online]. 2022, 24, 288-298 [cit. 2023-11-15]. ISSN 2372-7705. Dostupné z: doi:10.1016/j.omto.2021.12.026

- [18] KIM, Seong Keun a Sun Wook CHO. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2022, 13(1), 1-16 [cit. 2023-12-29]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2022.868695
- [19] Tackling the Complex Challenges of Hard-to-Treat Blood Cancers. *Pfizer* [online]. 2023 [cit. 2024-01-13]. Dostupné z: https://www.pfizer.com/news/articles/tackling_the_complex_challenges_of_hard_to_treat_blood_cancers
- [20] CAZZOLA, Mario a Laurie H. SEHN. Developing a classification of hematologic neoplasms in the era of precision medicine. *Blood* [online]. 2022, 140(11), 1193-1199 [cit. 2024-01-13]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2022015849
- [21] The Revised European American Lymphoma Classification (REAL). *National Cancer Institute* [online]. 2024 [cit. 2024-01-13]. Dostupné z: <https://training.seer.cancer.gov/lymphoma/abstract-code-stage/morphology/real.html>
- [22] KHOURY, Joseph D., Eric SOLARY, Oussama ABLA, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* [online]. 2022, 36(7), 1703-1719 [cit. 2024-01-13]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-022-01613-1
- [23] WCT: Haematolymphoid Tumours. *IARC - International agency for research on cancer* [online]. 2024 [cit. 2024-01-13]. Dostupné z: <https://whobluebooks.iarc.fr/structures/haematolymphoid/>
- [24] HUIZEN, Jennifer. Carcinoma vs. Sarcoma: Location, Prevalence and Prognosis. *Healthline* [online]. 2018 [cit. 2024-01-13]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/carcinoma-vs-sarcoma>
- [25] ELDRIDGE, Lynne. Sarcoma vs. Carcinoma: Differences and Similarities. *Very well health* [online]. 2023 [cit. 2024-01-13]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/sarcoma-vs-carcinoma-4694486>

- [26] FAIRFIELD, Heather, Carolyne FALANK, Lindsey AVERY a Michaela R. REAGAN. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences; Special Issue: MARROW* [online]. 2016, 1364(1), 32-51 [cit. 2023-11-08]. ISSN 1749-6632. Dostupné z: doi:10.1111/nyas.13038
- [27] KYLE, Robert A. a David P. STEENSMA. History of Multiple Myeloma. *Multiple Myeloma* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, 183(1), 3-23 [cit. 2024-02-17]. *Recent Results in Cancer Research*. ISBN 978-3-540-85771-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-85772-3_1
- [28] ČECH, Pavel. Otto Kahler a jeho rod II: Léta zrání v Praze. *Vnitřní lékařství* [online]. 2019, 65(5), 279-289 [cit. 2024-02-24]. ISSN 1801-7592. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/en/journals/internal-medicine/2019-5/otto-kahler-and-his-family-ii-ripening-years-in-prague-112440?hl=cs>
- [29] ALLEN, Hunter C. a Poonam SHARMA. Histology, Plasma Cells. *National Library of Medicine* [online]. 2022 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556082/>
- [30] RAJKUMAR, S Vincent, Meletios A DIMOPOULOS, Antonio PALUMBO, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* [online]. 2014, 15(12), e538-e548 [cit. 2024-03-11]. ISSN 14702045. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(14)70442-5
- [31] BATKO, Krzysztof, Jolanta MALYSZKO, Artur JURCZYSZYN, et al. The clinical implication of monoclonal gammopathies: monoclonal gammopathy of undetermined significance and of renal significance. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. 2019, 34(9), 1440-1452 [cit. 2024-03-11]. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfy259
- [32] Mnohočetný myelom - statistika. *Česká myelomová skupina* [online]. 2024 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--zakladni-udaje--statistika>
- [33] FELSON, Sabrina. Who gets multiple myeloma? *WebMD* [online]. 2022 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/cancer/multiple-myeloma/who-gets-multiple-myeloma>

- [34] HEIDER, Michael, Katharina NICKEL, Marion HÖGNER a Florian BASSERMANN. Multiple Myeloma: Molecular Pathogenesis and Disease Evolution. *Oncology Research and Treatment* [online]. 2021, 44(12), 672-681 [cit. 2024-02-17]. ISSN 2296-5270. Dostupné z: doi:10.1159/000520312
- [35] IGL - immunoglobulin lambda locus [Homo sapiens (human)]. *National Library of Medicine* [online]. 2023 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3535>
- [36] IGK - immunoglobulin kappa locus [Homo sapiens (human)]. *National Library of Medicine* [online]. 2023 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=50802>
- [37] BARWICK, Benjamin G., Vikas A. GUPTA, Paula M. VERTINO a Lawrence H. BOISE. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, 10(1), 1-17 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.01121
- [38] CXCL12 - C-X-C motif chemokine ligand 12 [Homo sapiens (human)]. *National Library of Medicine* [online]. 2024 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6387>
- [39] IGF1 - insulin like growth factor 1 [Homo sapiens (human)]. *National Library of Medicine* [online]. 2024 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3479>
- [40] HAN, Yanyan, Dandan LIU a Lianhong LI. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research* [online]. 2020, 10(3), 727-742 [cit. 2024-02-24]. ISSN 2156-6976. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7136921/>
- [41] ŽÁRSKÁ, Magdaléna, Dávid VRÁBEL, Renata BEZDĚKOVÁ, et al. Plasma Cell Leukemia – the Forgotten Disease. *Klinická Onkologie* [online]. 2019, 32(1), 40-46 [cit. 2024-02-24]. ISSN 0862-495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko201940

- [42] FUJINO, Masahiko. The histopathology of myeloma in the bone marrow. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* [online]. 2018, 58(2), 61-67 [cit. 2024-02-24]. ISSN 1346-4280. Dostupné z: doi:10.3960/jslrt.18014
- [43] NAKAYA, Aya, Shinya FUJITA, Atsushi SATAKE, et al. Impact of CRAB Symptoms in Survival of Patients with Symptomatic Myeloma in Novel Agent Era. *Hematology Reports* [online]. 2017, 9(1), 16-18 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2038-8330. Dostupné z: doi:10.4081/hr.2017.6887
- [44] What is Multiple Myeloma? Symptoms, Causes & Prognosis. *The MMRF - Multiple Myeloma Research Foundation* [online]. 2023 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://themmrf.org/multiple-myeloma/>
- [45] MAISNAR, Vladimír, Tereza POPKOVÁ a Martin ŠTORK. Mnohočetný myelom: Jak s ním žít? *Informace pro nemocné a jejich blízké* [online]. Dvůr Králové nad Labem: ATD Miroslav Všetečka pro Klub pacientů mnohočetný myelom, 2022 [cit. 2024-03-03]. ISBN 978-80-86358-21-5. Dostupné z: <https://www.mnohocetnymyelom.cz/mm-jak-s-nim-zit/>
- [46] FAIRFIELD, Heather, Carolyne FALANK, Lindsey AVERY a Michaela R. REAGAN. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2016, 1364(1), 32-51 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/nyas.13038
- [47] Patient Care Spotlight: Current Management of Hypercalcemia Associated With Multiple Myeloma. NOOAN, Kimberly, Kathleen COLSON a Melissa COCHRAN. *Dana-Farber Cancer Institute* [online]. 2013 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://www.dana-farber.org/for-physicians/clinical-resources/hematologic-malignancies/advances-newsletter/2013-issue-2/patient-care-spotlight-hypercalcemia-multiple-myeloma>
- [48] BRESHEARS, Melanie A. a Anthony W. CONFER. The Urinary System. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease* [online]. 6. Elsevier, 2017, 617-681.e1 [cit. 2024-03-03]. ISBN 9780323357753. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-35775-3.00011-4
- [49] Antibody Basics. *Merck* [online]. 2024 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/western-blotting/antibody-basics>

- [50] *Transfuze a hematologie dnes: Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu* [online]. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2023 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1805-4587. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/res/file/guidelines/2023-transfuze-hematologie-dnes.pdf>
- [51] Blood tests for myeloma. *Cancer Research UK* [online]. 2020 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/myeloma/getting-diagnosed/tests/blood-tests>
- [52] GOGIA, Aarti, Meera SIKKA, Satender SHARMA a Usha RUSIA. Hemostatic Abnormalities in Multiple Myeloma Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [online]. 2018, 19(1), 127-130 [cit. 2024-02-24]. ISSN 2476-762X. Dostupné z: doi:10.22034/APJCP.2018.19.1.127
- [53] MOHAMMED, Noorjahan, KSS SAI BABA, Yadagiri B, Sadasivudu GUNDETI a Sree Bhushan RAJU. Biochemical Characterization of Multiple Myeloma Patients across ISS Stages – A Data Base Workup from a Tertiary Care Hospital in India. *Asian Pacific Journal of Cancer Care* [online]. 2019, 4(3), 77-82 [cit. 2024-02-17]. ISSN 2588-3682. Dostupné z: doi:10.31557/apjcc.2019.4.3.77-82
- [54] NT-proBNP v séru. *IKEM - Institut Klinické a Experimentální Medicíny* [online]. 2024 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_16353-L0000006.htm
- [55] TRIPATHY, Sunita. The Role of Serum Protein Electrophoresis in the Detection of Multiple Myeloma: An Experience of a Corporate Hospital. *JOURNAL of CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. 2012, 6(9), 1458–1461 [cit. 2024-02-17]. ISSN 2249-782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2012/4213.2532
- [56] HASHEMI, Zahra Sadat, Saeed KHALILI, Fatemeh MALAEI, et al. Serum DKK1 is correlated with γ peak of serum electrophoresis in multiple myeloma: a multicenter biomarker study. *Biomarkers in Medicine* [online]. 2019, 13(15), 1297-1306 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1752-0363. Dostupné z: doi:10.2217/bmm-2019-0060
- [57] *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* [online]. 4. Elsevier, 2020 [cit. 2024-02-24]. ISBN 9780128154991. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815499-1.00022-3

- [58] TICHÝ, M. a V. MAISNAR. Jak neprošvihnout mnohočetný myelom. *Vnitřní lékařství* [online]. 2006, 52(2), 41-46 [cit. 2024-03-11]. ISSN 0042-773X. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitri-lekarstvi/2006/dokumenty/supplementum-2-6>
- [59] Freelite. Binding Site [online]. 2024 [cit. 2024-03-11]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/bindingsite/gb/en/products/immunoassays/freelite.html>
- [60] RINDY, Lucas R. a Aaron R. CHAMBERS. Bone Marrow Aspiration and Biopsy. *National Library of Medicine* [online]. 2023 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559232/>
- [61] RAJKUMAR, S. Vincent. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology* [online]. 2022, 97(8), 1086-1107 [cit. 2024-02-24]. ISSN 0361-8609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.26590
- [62] BOLLI, N, Y LI, V SATHIASEELAN, et al. A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal* [online]. 2016, 6(9), e467-e467 [cit. 2024-02-24]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2016.72
- [63] SUDHA, Parvathi, Aarif AHSAN, Cody ASHBY, et al. Myeloma Genome Project Panel is a Comprehensive Targeted Genomics Panel for Molecular Profiling of Patients with Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* [online]. 2022, 28(13), 2854-2864 [cit. 2024-02-24]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-3695
- [64] NAVRKALOVA, Veronika, Karla PLEVOVA, Jakub HYNST, et al. LYmphoid NeXt-Generation Sequencing (LYNX) Panel. *The Journal of Molecular Diagnostics* [online]. 2021, 23(8), 959-974 [cit. 2024-02-24]. ISSN 1525-1578. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmoldx.2021.05.007
- [65] FLORES-MONTERO, J, L SANOJA-FLORES, B PAIVA, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* [online]. 2017, 31(10), 2094-2103 [cit. 2024-02-24]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2017.29

- [66] BAFFOUR, Francis I., Katrina N. GLAZEBROOK, Shaji K. KUMAR a Stephen M. BROSKI. Role of imaging in multiple myeloma. *American Journal of Hematology* [online]. 2020, 95(8), 966-977 [cit. 2024-02-24]. ISSN 0361-8609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.25846
- [67] What is minimal residual disease (MRD)? BOLDT, Clayton. *MD Anderson Cancer Center* [online]. 2020 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://www.mdanderson.org/cancerwise/what-is-minimal-residual-disease--mrd--multiple-myeloma-lymphoma-leukemia-patients.h00-159383523.html>
- [68] ITO, Shigeki. Proteasome Inhibitors for the Treatment of Multiple Myeloma. *Cancers* [online]. 2020, 12(2), 1-19 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12020265
- [69] REHMAN, Waqas, Lisa M. ARFONS a Hillard M. LAZARUS. The rise, fall and subsequent triumph of thalidomide: lessons learned in drug development. *Therapeutic Advances in Hematology* [online]. 2011, 2(5), 291-308 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2040-6207. Dostupné z: doi:10.1177/2040620711413165
- [70] MINAŘÍK, Jiří a Sabina ŠEVČÍKOVÁ. Immunomodulatory Agents for Multiple Myeloma. *Cancers* [online]. 2022, 14(23), 1-5 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14235759
- [71] FERNER, Robin E, Nicholas DEVITO a Jeffrey K ARONSON. Drug vignettes: Dexamethasone. *The Centre for Evidence-Based Medicine* [online]. 2020 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://www.cebm.net/covid-19/dexamethasone/>
- [72] XIE, Jingmei, Ning WAN, Zhuoru LIANG, Tiantian ZHANG a Jie JIANG. Ixazomib – the first oral proteasome inhibitor. *Leukemia & Lymphoma* [online]. 2019, 60(3), 610-618 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1042-8194. Dostupné z: doi:10.1080/10428194.2018.1523398
- [73] D'AGOSTINO, Mattia, Salvatore INNORCIA, Mario BOCCADORO a Sara BRINGHEN. Monoclonal Antibodies to Treat Multiple Myeloma: A Dream Come True. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, 21(21), 1-20 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21218192

- [74] M. FANCHER, Karen a Elizabeth J. BUNK. Elotuzumab: The First Monoclonal Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* [online]. 2016, 7(5), 1-6 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2150-0878. Dostupné z: doi:10.6004/jadpro.2016.7.5.6
- [75] DHILLON, Sohita. Isatuximab: First Approval. *Drugs* [online]. 2020, 80(9), 905-912 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-020-01311-1
- [76] BURWICK, Nicholas a Sanjai SHARMA. Glucocorticoids in multiple myeloma: past, present, and future. *Annals of Hematology* [online]. 2019, 98(1), 19-28 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0939-5555. Dostupné z: doi:10.1007/s00277-018-3465-8
- [77] SLAMF7 SLAM family member 7 [Homo sapiens (human)]. *National Library of Medicine* [online]. 2024 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57823>
- [78] WOGNUM, Albertus W, Allen C EAVES a Terry E THOMAS. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research* [online]. 2003, 34(6), 461-475 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0188-4409. Dostupné z: doi:10.1016/j.arcmed.2003.09.008
- [79] Multiple Myeloma Treatments. *The MMRF - Multiple Myeloma Research Foundation* [online]. 2023 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://themmrf.org/diagnosis-and-treatment/treatment-options/>
- [80] Bispecific Antibodies: An Area of Research and Clinical Applications. *U. S. Food and Drug Administration* [online]. 2024 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/bispecific-antibodies-area-research-and-clinical-applications>
- [81] MOREAU, Philippe, Alfred L. GARFALL, Niels W.C.J. VAN DE DONK, et al. Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* [online]. 2022, 387(6), 495-505 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2203478

- [82] RENDO, Matthew J, Jacinth J JOSEPH, Liem Minh PHAN a Christin B DESTEFANO. CAR T-Cell Therapy for Patients with Multiple Myeloma: Current Evidence and Challenges. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy* [online]. 2022, 12(1), 119-136 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1179-9889. Dostupné z: doi:10.2147/BLCTT.S327016
- [83] ZHANG, Xiaomin, Hui ZHANG, Huixuan LAN, Jinming WU a Yang XIAO. CAR-T cell therapy in multiple myeloma: Current limitations and potential strategies. *Frontiers in Immunology* [online]. 2023, 14(1), 1-13 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2023.1101495
- [84] [85] Steps Involved in CAR T-cell Therapy. *BMT Infonet* [online]. 2023 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://bmtinfonet.org/car-t-cell/Steps%20Involved%20in%20CAR%20T-cell%20Therapy>
- [85] CAR T-cell therapy for cancer. *Booking Health* [online]. 2022 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://bookinghealth.com/blog/diagnoses-and-treatment/diagnosis-and-treatment/603864-car-t-cell-therapy-for-cancer.html>
- [86] MAILANKODY, Sham, Sean M. DEVLIN, Jonathan LANDA, et al. GPRC5D-Targeted CAR T Cells for Myeloma. *New England Journal of Medicine* [online]. 2022, 2022-09-29, 387(13), 1196-1206 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2209900
- [87] RANK. *Velký lékařský slovník* [online]. 2024 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/rank-2>
- [88] MICELI, Teresa S., Wilson I. GONSALVES a Francis K. BUADI. Supportive care in multiple myeloma: Current practices and advances. *Cancer Treatment and Research Communications* [online]. 2021, 29(1), 1-17 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2468-2942. Dostupné z: doi:10.1016/j.ctarc.2021.100476
- [89] HENRY, N. Lynn a Daniel F. HAYES. Cancer biomarkers. *Molecular Oncology* [online]. 2012, 6(2), 140-146 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1574-7891. Dostupné z: doi:10.1016/j.molonc.2012.01.010

- [90] NAGPAL, Madhav, Shreya SINGH, Pranshu SINGH, Pallavi CHAUHAN a MeesamAbbas ZAIDI. Tumor markers: A diagnostic tool. *National Journal of Maxillofacial Surgery* [online]. 2016, 7(1), 17-20 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0975-5950. Dostupné z: doi:10.4103/0975-5950.196135
- [91] Tumor Marker Tests in Common Use. *National Cancer Institute* [online]. 2023 [cit. 2024-02-24]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-list>
- [92] BIGBEE, William a Ronald B. HERBERMAN. *Holland-Frei Cancer Medicine* [online]. 6. BC Decker, 2003 [cit. 2024-02-24]. ISBN 978-1550092219. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12917/>
- [93] LIBERTI, Maria V. a Jason W. LOCASALE. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2016, 41(3), 211-218 [cit. 2023-11-15]. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001
- [94] HSIAO, Kuan-Chung, Neng-Yao SHIH, Hsun-Lang FANG, et al. Surface α -Enolase Promotes Extracellular Matrix Degradation and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(7), 1-15 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0069354
- [95] BERGMANN, Simone, Hanne SCHOENEN a Sven HAMMERSCHMIDT. The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2013, 303(8), 452-462 [cit. 2023-11-15]. ISSN 1438-4221. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijmm.2013.06.002
- [96] ZHANG, Yun a Robert A. WEINBERG. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Frontiers of Medicine* [online]. 2018, 12(4), 361-373 [cit. 2023-11-15]. ISSN 2095-0217. Dostupné z: doi:10.1007/s11684-018-0656-6
- [97] LI, Hsin-Jung, Feng-Yi KE, Chia-Ching LIN, et al. ENO1 Promotes Lung Cancer Metastasis via HGFR and WNT Signaling–Driven Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Research* [online]. 2021, 81(15), 4094-4109 [cit. 2023-11-17]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-3543

- [98] CHEN, Jo-Mei, Shao-Chih CHIU, Kun-Chieh CHEN, Yun-Ru HUANG, Yu-Ting LIAO a Chang-Tze YU. Enolase 1 differentially contributes to cell transformation in lung cancer but not in esophageal cancer. *Oncology Letters* [online]. 2020, 19(4), 3189–3196 [cit. 2023-11-15]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2020.11427
- [99] QIAO, Hui, Yufeng WANG, Bingdong ZHU, Lei JIANG, Wenzhen YUAN, Yongning ZHOU a Quanlin GUAN. Enolase1 overexpression regulates the growth of gastric cancer cells and predicts poor survival. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2019, 120(11), 18714-18723 [cit. 2023-11-15]. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.29179
- [100] SUBRAMANIAN, Aruna a Donald M. MILLER. Structural Analysis of α -Enolase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2000, 275(8), 5958-5965 [cit. 2023-11-15]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.275.8.5958
- [101] MARANTO, Cristina, Giovanni PERCONTI, Flavia CONTINO, Patrizia RUBINO, Salvatore FEO a Agata GIALLONGO. Cellular stress induces cap-independent alpha-enolase/MBP-1 translation. *FEBS Letters* [online]. 2015, 589(16), 2110-2116 [cit. 2023-11-15]. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2015.06.030
- [102] SEDORIS, Kara C., Shelia D. THOMAS a Donald M. MILLER. Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer* [online]. 2010, 10(1), 157 [cit. 2023-11-15]. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-10-157
- [103] CANCEMI, Patrizia, Miriam BUTTACAVOLI, Elena ROZ a Salvatore FEO. Expression of Alpha-Enolase (ENO1), Myc Promoter-Binding Protein-1 (MBP-1) and Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) Reflect the Nature and Aggressiveness of Breast Tumors. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, 20(16), 3952 [cit. 2023-11-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20163952
- [104] ALMAGUEL, Frankis A., Tino W. SANCHEZ, Greisha L. ORTIZ-HERNANDEZ a Carlos A. CASIANO. Alpha-Enolase: Emerging Tumor-Associated Antigen, Cancer Biomarker, and Oncotherapeutic Target. *Frontiers in Genetics* [online]. 2021, 11, 1-9 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2020.614726

- [105] JI, Mingfei, Zhijun WANG, Jie CHEN, Liqiong GU, Ming CHEN, Yelei DING a Tao LIU. Up-regulated ENO1 promotes the bladder cancer cell growth and proliferation via regulating β -catenin. *Bioscience Reports* [online]. 2019, 39(9), 1-11 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20190503
- [106] TU, Shih-Hsin, Chih-Chiang CHANG, Ching-Shyang CHEN, et al. Increased expression of enolase α in human breast cancer confers tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2010, 121(3), 539-553 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0167-6806. Dostupné z: doi:10.1007/s10549-009-0492-0
- [107] CANCEMI, Patrizia, Miriam BUTTACAVOLI, Elena ROZ a Salvatore FEO. Expression of Alpha-Enolase (ENO1), Myc Promoter-Binding Protein-1 (MBP-1) and Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) Reflect the Nature and Aggressiveness of Breast Tumors. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, 20(16), 1-17 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20163952
- [108] ZHAN, Panpan, Shihu ZHAO, Hua YAN, et al. A-enolase promotes tumorigenesis and metastasis via regulating AMPK/mTOR pathway in colorectal cancer. *Molecular Carcinogenesis* [online]. 2017, 56(5), 1427-1437 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0899-1987. Dostupné z: doi:10.1002/mc.22603
- [109] QIAN, Xiaoling, Wenxia XU, Jinye XU, et al. Enolase 1 stimulates glycolysis to promote chemoresistance in gastric cancer. *Oncotarget* [online]. 2017, 8(29), 47691-47708 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.17868
- [110] QIAO, Hui, Yufeng WANG, Bingdong ZHU, Lei JIANG, Wenzhen YUAN, Yongning ZHOU a Quanlin GUAN. Enolase1 overexpression regulates the growth of gastric cancer cells and predicts poor survival. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2019, 120(11), 18714-18723 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.29179
- [111] SUN, Liang, Ting LU, Kangjun TIAN, et al. Alpha-enolase promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis via regulating AKT signaling pathway. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2019, 845(1), 8-15 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2018.12.035

- [112] XU, Xin, Bang CHEN, Shaopu ZHU, Jiawei ZHANG, Xiaobo HE, Guodong CAO a Bo CHEN. Hyperglycemia promotes Snail-induced epithelial–mesenchymal transition of gastric cancer via activating ENO1 expression. *Cancer Cell International* [online]. 2019, 19(1), 1-12 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:10.1186/s12935-019-1075-8
- [113] TSAI, Sen-Tien, I-Hsiu CHIEN, Wen-Hao SHEN, et al. ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *European Journal of Cancer* [online]. 2010, 46(9), 1712-1723 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0959-8049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2010.03.018
- [114] TAKASHIMA, Motonari, Yasuhiro KURAMITSU, Yuichiro YOKOYAMA, et al. Overexpression of alpha enolase in hepatitis? C virus-related hepatocellular carcinoma: Association with tumor progression as determined by proteomic analysis. *PROTEOMICS* [online]. 2005, 5(6), 1686-1692 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200401022
- [115] HAMAGUCHI, Takashi, Norio IIZUKA, Ryouichi TSUNEDOMI, et al. Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1 α is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology* [online]. 2008, 33(4), 725-731 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1019-6439. Dostupné z: doi:10.3892/ijoc_00000058
- [116] ZHANG, Lihong, Tao LU, Ye YANG a Liangfeng HU. A-enolase is highly expressed in liver cancer and promotes cancer cell invasion and metastasis. *Oncology Letters* [online]. 2020, 20(5), 1-9 [cit. 2023-12-29]. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2020.12003
- [117] CHANG, Gee-Chen, Ko-Jiunn LIU, Chia-Ling HSIEH, et al. Identification of α -Enolase as an Autoantigen in Lung Cancer: Its Overexpression Is Associated with Clinical Outcomes. *Clinical Cancer Research* [online]. 2006, 12(19), 5746-5754 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0324
- [118] HE, Ping, Tetsuji NAKA, Satoshi SERADA, et al. Proteomics-based identification of α -enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer. *Cancer Science* [online]. 2007, 98(8), 1234-1240 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1347-9032. Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00509.x

- [119] DAI, Liping, Yanhong QU, Jitian LI, Xiao WANG, Kaijuan WANG, Peng WANG, Bing-Hua JIANG a Jianying ZHANG. Serological proteome analysis approach-based identification of ENO1 as a tumor-associated antigen and its autoantibody could enhance the sensitivity of CEA and CYFRA 21-1 in the detection of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* [online]. 2017, 8(22), 36664-36673 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.17067
- [120] ZHANG, Lihong, Hongbin WANG a Xuejun DONG. Diagnostic value of α -enolase expression and serum α -enolase autoantibody levels in lung cancer. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* [online]. 2018, 44(1), 18-23 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1806-3756. Dostupné z: doi:10.1590/s1806-37562016000000241
- [121] TOMAINO, Barbara, Paola CAPPELLO, Michela CAPELLO, et al. Circulating Autoantibodies to Phosphorylated α -Enolase are a Hallmark of Pancreatic Cancer. *Journal of Proteome Research* [online]. 2011, 10(1), 105-112 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr100213b
- [122] SUN, Lichao, Chunguang GUO, Jianzhong CAO, Joseph BURNETT, Zhihua YANG, Yuliang RAN a Duxin SUN. Over-Expression of Alpha-Enolase as a Prognostic Biomarker in Patients with Pancreatic Cancer. *International Journal of Medical Sciences* [online]. 2017, 14(7), 655-661 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1449-1907. Dostupné z: doi:10.7150/ijms.18736
- [123] YIN, Hang, Lei WANG a Hai-Lin LIU. ENO1 Overexpression in Pancreatic Cancer Patients and Its Clinical and Diagnostic Significance. *Gastroenterology Research and Practice* [online]. 2018, 2018(1), 1-7 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1687-6121. Dostupné z: doi:10.1155/2018/3842198
- [124] WANG, Lei, Rongrong BI, Hang YIN, Hailin LIU a Lei LI. ENO1 silencing impaires hypoxia-induced gemcitabine chemoresistance associated with redox modulation in pancreatic cancer cells. *American Journal of Translatonal Research* [online]. 2019, 11(7), 4470-4480 [cit. 2024-02-24]. ISSN 1943-8141. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31396350/>

- [125] RAY, Arghya, Yan SONG, Ting DU, Dharminder CHAUHAN a Kenneth C. ANDERSON. Preclinical validation of Alpha-Enolase (ENO1) as a novel immunometabolic target in multiple myeloma. *Oncogene* [online]. 2020, 39(13), 2786-2796 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-020-1172-0
- [126] ZHU, Xinghua, Xiaobing MIAO, Yaxun WU, et al. ENO1 promotes tumor proliferation and cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in Non-Hodgkin's Lymphomas. *Experimental Cell Research* [online]. 2015, 335(2), 216-223 [cit. 2024-02-24]. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2015.05.020
- [127] JUNG, Da-Woon, Woong-Hee KIM, Si-Hwan PARK, et al. A Unique Small Molecule Inhibitor of Enolase Clarifies Its Role in Fundamental Biological Processes. *ACS Chemical Biology* [online]. 2013, 8(6), 1271-1282 [cit. 2023-11-15]. ISSN 1554-8929. Dostupné z: doi:10.1021/cb300687k
- [128] SATANI, Nikunj, Yu-Hsi LIN, Naima HAMMOUDI, Sudhir RAGHAVAN, Dimitra K. GEORGIOU, Florian L. MULLER a Pankaj K. SINGH. ENOblock Does Not Inhibit the Activity of the Glycolytic Enzyme Enolase. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(12), 1-10 [cit. 2023-11-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0168739
- [129] WANG, Luyao, Mengke QU, Shiqi HUANG, et al. A novel α -enolase-targeted drug delivery system for high efficacy prostate cancer therapy. *Nanoscale* [online]. 2018, 10(28), 13673-13683 [cit. 2023-11-15]. Dostupné z: doi:10.1039/C8NR03297A
- [130] CHEN, Mao-Lin, Ta-Tung YUAN, Chi-Fen CHUANG, Yung-Tsang HUANG, I-Che CHUNG a Wei-Ching HUANG. A Novel Enolase-1 Antibody Targets Multiple Interacting Players in the Tumor Microenvironment of Advanced Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2022, 21(8), 1337-1347 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-21-0285
- [131] HUANG, Wei-Ching, Chi-Fen CHUANG, Yung-Tsang HUANG, et al. Monoclonal enolase-1 blocking antibody ameliorates pulmonary inflammation and fibrosis. *Respiratory Research* [online]. 2023, 24(1), 1-15 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1465-993X. Dostupné z: doi:10.1186/s12931-023-02583-3

- [132] BAE, Seyeon, Hyemin KIM, Naeun LEE, et al. A-Enolase Expressed on the Surfaces of Monocytes and Macrophages Induces Robust Synovial Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology* [online]. 2012, 189(1), 365-372 [cit. 2023-11-17]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1102073
- [133] ANGELETTI, Andrea, Paola MIGLIORINI, Maurizio BRUSCHI, Federico PRATESI, Giovanni CANDIANO, Marco PRUNOTTO, Enrico VERRINA a Gian Marco GHIGGERI. Anti-alpha enolase multi-antibody specificity in human diseases. Clinical significance and molecular mechanisms. *Autoimmunity Reviews* [online]. 2021, 20(12), 1-7 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1568-9972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2021.102977
- [134] SARAPIK, Aili, Kadri HALLER-KIKKATALO, Meeme UTT, Kaupo TEESALU, Andres SALUMETS a Raivo UIBO. Serum Anti-endometrial Antibodies in Infertile Women – Potential Risk Factor for Implantation Failure: Serum Anti-endometrial Antibodies in Infertile Women – Potential Risk Factor for Implantation Failure. *American Journal of Reproductive Immunology* [online]. 2010, 63(5), 349-357 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1046-7408. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00808.x
- [135] PRANAY, Atul, Sanjeev SHUKLA, Sadhana KANNAN, et al. Prognostic utility of autoantibodies to α -enolase and Hsp70 for cancer of the gingivo-buccal complex using immunoproteomics. *Proteomics – Clinical Applications* [online]. 2013, 7(5-6), 392-402 [cit. 2024-02-17]. ISSN 1862-8346. Dostupné z: doi:10.1002/prca.201200081
- [136] SHIH, N.-Y., H.-L. LAI, G.-C. CHANG, H.-C. LIN, Y.-C. WU, J. M. LIU, K.-J. LIU a S.-W. TSENG. Anti- α -enolase Autoantibodies Are Down-regulated in Advanced Cancer Patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology* [online]. 2010, 40(7), 663-669 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0368-2811. Dostupné z: doi:10.1093/jjco/hyq028
- [137] HSIAO, Kuan-Chung, Neng-Yao SHIH, Pei-Yi CHU, et al. Anti- α -enolase is a prognostic marker in postoperative lung cancer patients. *Oncotarget* [online]. 2015, 6(33), 35073-35086 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.5316

- [138] ZANG, Ruochuan, Yuan LI, Runsen JIN, et al. Enhancement of diagnostic performance in lung cancers by combining CEA and CA125 with autoantibodies detection. *OncoImmunology* [online]. 2019, 8(10), 1-8 [cit. 2024-02-17]. ISSN 2162-402X. Dostupné z: doi:10.1080/2162402X.2019.1625689
- [139] ADAMUS, G, D AMUNDSON, G.M SEIGEL a M MACHNICKI. Anti-Enolase- α Autoantibodies in Cancer-Associated Retinopathy: Epitope Mapping and Cytotoxicity on Retinal Cells. *Journal of Autoimmunity* [online]. 1998, 11(6), 671-677 [cit. 2024-02-17]. ISSN 0896-8411. Dostupné z: doi:10.1006/jaut.1998.0239
- [140] GRIGGIO, Valentina, Giorgia MANDILI, Candida VITALE, et al. Humoral immune responses toward tumor-derived antigens in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* [online]. 2017, 8(2), 3274-3288 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.13712
- [141] MAGRYS, AGNIESZKA, THIMMAPPA ANEKONDA, GAOYING REN a GRAZYNA ADAMUS. The Role of Anti- α -Enolase Autoantibodies in Pathogenicity of Autoimmune-Mediated Retinopathy. *Journal of Clinical Immunology* [online]. 2007, 27(2), 181-192 [cit. 2023-11-17]. ISSN 0271-9142. Dostupné z: doi:10.1007/s10875-006-9065-8
- [142] CURCIO, Claudia, Tiziana ROSSO, Silvia BRUGIAPAGLIA, et al. Circulating autoantibodies to alpha-enolase (ENO1) and far upstream element-binding protein 1 (FUBP1) are negative prognostic factors for pancreatic cancer patient survival. *Clinical and Experimental Medicine* [online]. 2023, 23(7), 1-12 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1591-9528. Dostupné z: doi:10.1007/s10238-023-01236-5
- [143] ZHU, Weiwei, Hongqiang LI, Yan YU, Jianan CHEN, Xiaolong CHEN, Fang REN, Zhigang REN a Guangying CUI. Enolase-1 serves as a biomarker of diagnosis and prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Management and Research* [online]. 2018, 10, 5735-5745 [cit. 2023-11-17]. ISSN 1179-1322. Dostupné z: doi:10.2147/CMAR.S182183

- [144] LINCZ, Lisa F., Danielle Z. THERON, Daniel L. BARRY, Fiona E. SCORGIE, Jonathan SILLAR, Opelo SEFHORE, Anoop K. ENJETI a Kathryn A. SKELDING. High Expression of ENO1 and Low Levels of Circulating Anti-ENO1 Autoantibodies in Patients with Myelodysplastic Neoplasms and Acute Myeloid Leukaemia. *Cancers* [online]. 2024, 16(5), 1-12 [cit. 2024-04-14]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers16050884
- [145] B-actin Loading Control. *OriGene* [online]. 2023 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.origene.com/products/antibodies/primary-antibodies/loading-control-antibodies/beta-actin-loading-control>
- [146] Total Protein Normalization. *Bio-Rad* [online]. 2024 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/total-protein-normalization?ID=PODYJQRT8IG9>
- [147] Normalization in western blotting to obtain relative quantitation. *ThermoFisher Scientific* [online]. 2018 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Technical-Notes/ibright-normalization-western-blotting-relative-quantitation-technical-note.pdf>
- [148] B Actin Antibody. *Proteintech* [online]. 2024 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.ptglab.com/products/featured-products/beta-actin-antibody/>
- [149] ENO1 (human). *PhosphoSite Plus* [online]. 2019 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=2610&showAllSites=true>
- [150] ŠTĚPAŘOVÁ, Kateřina. *Průkaz autoprotištětek v séru pacientů s mnohočetným myelomem v remisi*. Pardubice, 2022, 116 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce prof. RNDr. Zuzana Bílková Ph.D.
- [151] DVOŘÁKOVÁ, Michaela. *Komparativní proteomová analýza nádorových buněčných linií*. Pardubice, 2023, 134 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce prof. RNDr. Zuzana Bílková Ph.D.
- [152] MIKEŠ, Tomáš. *A-Enoláza - význam v patogenezi nádorových buněk a v diagnostice*. Pardubice, 2023, 92 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce prof. RNDr. Zuzana Bílková Ph.D.

PŘÍLOHY

Příloha 1: Rozdělení hematolymfoidních nádorů

Myeloidní proliferace a novotvary

- Myeloidní prekurzorové léze
 - Klonální hematopoéza
 - Klonální hematopoéza nejasného významu
- Chronické myeloidní novotvary
 - Myeloproliferativní novotvary
 - Chronická myeloidní leukémie
 - Pravá polycytémie
 - Mastocytóza
 - Sarkom žírných buněk
 - Myelodysplastické novotvary (MDN)
 - Se zvýšenými blasty
 - MDN / akutní myeloidní leukémie (AML)
 - S mutací NPM1
 - MDN v dětství
 - Myelodysplastický syndrom v dětství
 - MDN s vývojem proliferace
 - Chronická myelomonocytární leukémie
- Akutní myeloidní novotvary
 - AML s definovanými genetickými abnormalitami
 - Akutní promyelocytární leukémie
 - AML s definovanou diferenciací
 - Akutní bazofilní leukémie
 - Myeloidní sarkom a další
 - Myeloidní sarkom
- Sekundární myeloidní novotvary
 - Myeloidní novotvary a proliferace asociované s předchozími či predisponujícími stavy

- Myeloidní novotvar po cytotoxické léčbě

Myeloidní / lymfoidní novotvary a další leukémie nejednoznačného původu

- Myeloidní / lymfoidní novotvary s eozinofilií a definovanou genovou přestavbou
 - S fúzí *PCMI-JAK2*
- Akutní leukémie nejednoznačného původu
 - Akutní leukémie s fúzí *BCR-ABL1* s různorodým fenotypem

Novotvary histiocytárních / dendritických buněk

- Novotvary plazmocytoidních dendritických buněk
 - Novotvary plazmocytoidních dendritických buněk
 - Novotvar blastických plazmocytoidních dendritických buněk
- Novotvary Langerhansových buněk
 - Novotvary Langerhansových buněk
 - Sarkom Langerhansových buněk
- Novotvary histiocytů / makrofágů
 - Novotvary histiocytů
 - Juvenilní xanthogranulom
- Spojení dendritických buněk
 - Novotvary vzniklé spojením dendritických buněk
 - Sarkom vzniklý spojením dendritických buněk

Novotvary a lymfoproliferativní onemocnění B-lymfocytů

- Léze podobné nádorům s převahou B-lymfocytů
 - Castlemanova nemoc
- Novotvary prekurzorů B-lymfocytů
 - Akutní B-lymfoblastická leukémie
 - S hyperdiploidií
- Novotvary zralých B-lymfocytů
 - Chronická lymfoidní leukémie
 - Monoklonální lymfocytóza B-lymfocytů
 - Novotvary B-lymfocytů ve slezině
 - Vlasatobuněčná leukémie
 - Lymfoplazmatický lymfom

- Lymfoplazmatický lymfom
 - Lymfom marginální zóny
 - Extranodální lymfom marginální zóny
 - Folikulární lymfom
 - *In situ* folikulární novotvar B-lymfocytů
 - Kožní novotvary folikulárního centra
 - Primární kožní lymfom folikulární centra
 - Lymfom pláštěvé zóny
 - Lymfom pláštěvé zóny
 - Transformace z neaktivních lymfomů B-lymfocytů
 - Transformace z neaktivních lymfomů B-lymfocytů
 - Velké lymfomy B-lymfocytů
 - ALK pozitivní velké lymfomy B-lymfocytů
 - Burkittův lymfom
 - Burkittův lymfom
 - Lymfom B-lymfocytů vysokého stupně dále nespecifikovaný
 - Lymfom B-lymfocytů vysokého stupně dále nespecifikovaný
 - Novotvary B-lymfocytů a lymfoproliferativní onemocněními spojené s HHV8
 - Primární efuzní lymfom
 - Lymfoproliferativní onemocnění spojené s imunodeficitem
 - Primární lymfoproliferativní onemocnění spojené s imunodeficitem
- Hodkingův lymfom
 - Klasický Hodkingův lymfom
- Novotvary plazmatických buněk a lymfoplazmatické
 - Monoklonální gamapatie
 - Monoklonální gamapatie nejasného významu
 - Nemoci charakterizované ukládáním monoklonálního imunoglobulinu
 - Amyloidóza spojená s imunoglobulinem
 - Nemoc těžkých řetězců
 - Nemoc těžkých řetězců gamma
 - Novotvary plazmatických buněk
 - Plazmocytom

Novotvary a lymfoproliferativní onemocnění T-lymfocytů

- Léze podobné nádorům s převahou T-lymfocytů
 - Kikuchiho nemoc
- Novotvary prekurzorů T-lymfocytů
 - Akutní T-lymfoblastická leukémie / lymfom
 - Akutní T-lymfoblastická leukémie / lymfom dále nespecifikovaný
- Novotvary zralých T-lymfocytů
 - Leukémie zralých T-lymfocytů
 - Sezaryho syndrom
 - Primární kožní novotvar T-lymfocytů
 - *Mycosis fungoides*
 - Novotvary a lymfoproliferativní onemocnění T-lymfocytů ve střevě
 - Lymfom T-lymfocytů asociovaný s enteropatií
 - Lymfom T-lymfocytů v oblasti jater / sleziny
 - Lymfom T-lymfocytů v oblasti jater / sleziny
 - Anaplastické velké lymfomy T-lymfocytů
 - Anaplastický velký lymfom T-lymfocytů, ALK pozitivní
 - Periferní lymfom T-lymfocytů s TFH fenotypem
 - Folikulární lymfom T-lymfocytů
 - Periferní lymfom T-lymfocytů
 - Periferní lymfom T-lymfocytů dále nespecifikovaný
 - EBV-pozitivní lymfoproliferativní onemocnění v dětství
 - Těžká alergie po bodnutí komárem

Novotvary NK-buněk

- Agresivní leukémie NK-buněk
- Chronické lymfoproliferativní onemocnění NK buněk

Novotvary pocházející ze stromatu lymfatické tkáně

- Novotvary mesenchymálních dendritických buněk
 - Folikulární novotvary dendritických buněk
 - Folikulární sarkom dendritických buněk
- Nádory stroma sleziny
 - Kapilární angiom sleziny

- Kapilární angiom sleziny

Genetické nádorové syndromy

- Fanconiho anémie
- Bloomův syndrom

Příloha 2: Informovaný souhlas

Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové
IČO: 00179906
IV. interní hematologická klinika

Souhlas pacienta/ky nebo zdravého dobrovolníka s odběrem a uchováváním biologického materiálu pro analýzu imunoproteomu pro výzkumné účely

Štítek pacienta (tky), zdravého jedince

razítko oddělení

Důvod výkonu (x): (srozumitelně, laicky):

- Odběr periferní krve pacienta za účelem analýzy složení séra pro sledování stavu imunitní odpovědi
- Odběr periferní krve zdravého dárce za účelem analýzy složení séra pro sledování fyziologického stavu imunitního systému
- Odběr krvetvorných buněk za účelem zisku tělu vlastních antigenů pro detailní analýzu imunoproteomu

Biologický materiál bude odeslán a uchováván v laboratoři imunochemie:

- Oddělení imunochemie a molekulární biologie Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice
- Hematologická laboratoř IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové
- Jinde

Poučení o výše uvedeném výkonu je uvedeno na straně 2, které má 1 stranu a je nedílnou součástí tohoto souhlasu.

Byly mi srozumitelně vysvětleny a zodpovězeny důvody a všechny dotazy s tímto odběrem spojené. Byl/a jsem informována, že odebrané vzorky krve budou vyšetřeny a následně uchovávány ve výše uvedené laboratoři.

Souhlasím s navrhovaným postupem:

- s jedním odběrem a uchováváním vzorku na analýzu imunoproteomu ve výše uvedené laboratoři
- s opakovanými odběry a uchováváním vzorků na analýzu imunoproteomu ve výše uvedené laboratoři

Hradec Králové dne:v.....hod.....
Podpis pacienta/ky, dobrovolníka

Hradec Králové dne:v.....hod.....
Jmenovka a podpis lékaře/ky

/x/ vyplní zdravotnický zaměstnanec, nehodící se škrtně

POUČENÍ O VÝKONU – odběr a uchování biologického materiálu ze vzorku krve nebo kostní dřeně (analýzu imunoproteomu) za vědeckým účelem

Důvody odběru a uchování biologického materiálu

Imunitní systém, jako obrana lidského těla, reaguje jak na přítomnost patogenů přicházejících z vnějšího prostředí, tak i na změny organismu samotného. Bojuje tedy i proti nádorovým bujením, často o úspěšnosti léčby rozhoduje právě kooperace podávaných léčiv spolu s imunitním systémem. Tyto mechanismy se vědci po několik let snaží popsat a využít pro cílenou, na míru připravenou léčbu. V krevním séru se nacházejí protilátky, základní složka specifické imunitní odpovědi, které rozpoznávají, označují molekuly (patogenní či tělu vlastní), a tím aktivují imunitní reakci proti nim. V rámci výzkumného projektu mají být sledovány změny přítomnosti a specifity protilátek u pacientů oproti protilátkám přítomným u zdravých dobrovolníků. Krvetvorné buňky pacienta jsou používány pro cílenou identifikaci jeho vlastních protilátek, tedy by mělo být omezen vliv molekulární diverzity jednotlivců. Případné podrobnější informace podá a Vaše dotazy zodpoví Váš ošetřující lékař.

Výzkum s využitím analýz imunoproteomu jednotlivých vzorků se provádí na pracovišti Oddělení imunochemie a molekulární biologie Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice. Laboratorní metody pro výzkumné účely jsou velmi komplikované, musejí se v laboratoři opakovat a zpravidla se srovnávají s předchozími testy. K tomu je nutné uschovávat zmrazených vzorků krve nebo kostní dřeně v laboratoři. Laboratoř nesmí bez souhlasu pacienta použít vzorky k jiným účelům.

Provedení odběru vzorku

Jedná se o odběr vzorku krve ze žíly cca 5 -10 ml nebo odběr 5-10 ml kostní dřeně.

Možné komplikace odběru krve ze žíly

Vytvoření krevní podlitiny při odběru krve ze žíly.

Opatření po odběru krve ze žíly

Kontrola místa vpichu, zda-li nekrvácí. Pokud je místo vpichu klidné (nesákne, nekrvácí) lze krytí za 10 minut odstranit.

Odběr kostní dřeně a jeho možné komplikace jsou popsány v informovaném souhlasu s provedením punkce kostní dřeně, který Vám bude v případě odběru kostní dřeně předložen.

Příloha 3: Výsledky předchozích analýz

Vzorky sér pacientů s mnohočetným myelomem (Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno)

V rámci diplomové práce Mgr. Kateřiny Štěpařové byly vyšetřeny vzorky sér 5 pacientů s MM. *Vzorky pacientů s MM poskytla biobanka Interní hematologické a onkologické klinika FN Brno (doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D., doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.). Pacienti s MM podepsali informovaný souhlas a byli poučeni o výkonu a účelu odběru. Odběr vzorků byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice v Brně. První odběr byl proveden v době stanovení diagnózy, další odběry následovaly vždy po třech měsících, až do doby, než pacient dosáhl remise. U některých pacientů nedošlo k dosažení remise, informace o jejich další léčbě nebo stavu nejsou nadále známy ([150], viz Obrázek 35).*

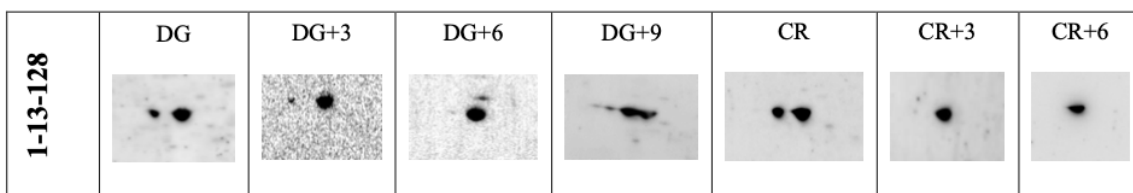
Vzorky sér pacientů s mnohočetným myelomem (Biobanka Kliniky hematoonkologie Fakultní nemocnice v Ostravě)

V rámci diplomových prací Mgr. Michaely Dvořákové a Mgr. Tomáše Mikeše byly vyšetřeny vzorky sér 10 pacientů s MM. *Vzorky pacientů s MM poskytla Biobanka Kliniky hematoonkologie Fakultní nemocnice v Ostravě (přednosta kliniky, pan prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., a vedoucí výzkumné laboratoře s biobankou, paní Mgr. Lucie Broskevičová). Pacienti podepsali informovaný souhlas a byli poučeni o účelu odběru. Vzorky jim byly odebírány v pravidelných intervalech. První odběr byl proveden v době stanovení diagnózy a další odběry byly plánovány u každého pacienta individuálně podle průběhu onemocnění a typu terapie. V případě, že pacientovi byly transplantovány kmenové krvetvorné buňky, byl odběr proveden před i po transplantaci. Vzorky pacientů byly označeny kódem a bylo u nich uvedeno pouze pohlaví pacienta a datum odběru, žádné další informace o vzorcích poskytnuty nebyly ([151; 152], viz Obrázek 36 a 37).*

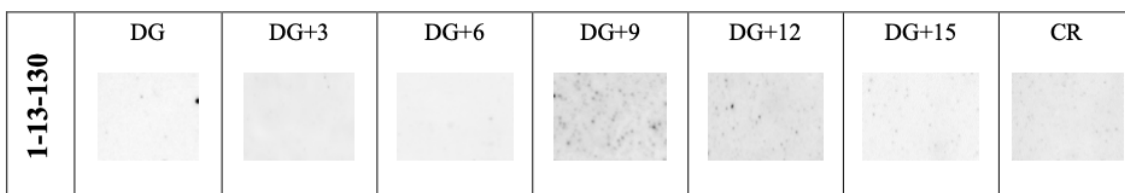
Vzorky sér zdravých dárců (Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice)

V rámci této diplomové práce a výše zmíněných diplomových prací byly vyšetřeny vzorky sér 16 zdravých dárců. Bližší informace o ZD jsou uvedeny v podkapitole 4.3 (viz Tabulka 33).

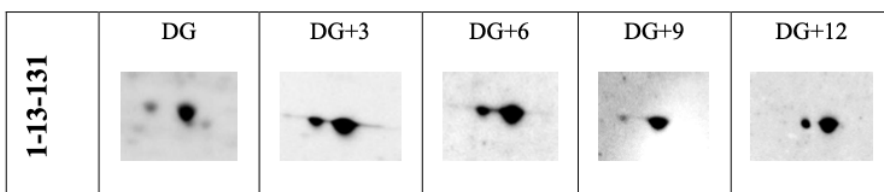
Přehled výskytu ENO1 reaktivních spotů v čase (výřezy membrán s výskytem imunokomplexu ENO1 proteinu a anti-ENO1 protilátek):



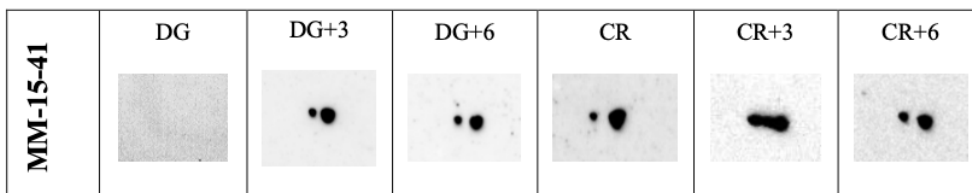
Obrázek č. 65 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-128 v místě výskytu ENO1 (přítomnost protilátek anti-ENO1 u všech sér)



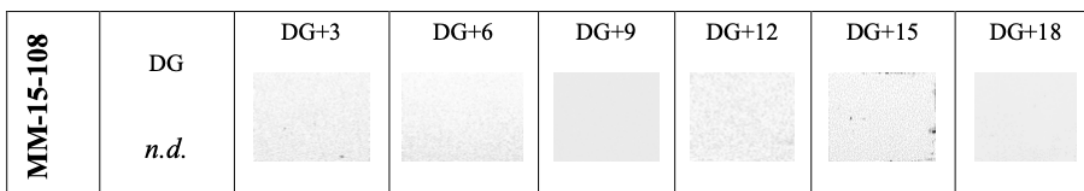
Obrázek č. 66 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-130 v místě výskytu ENO1 (negativní)



Obrázek č. 67 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra 1-13-131 v místě výskytu ENO1 (přítomnost protilátek anti-ENO1 u všech sér, chybí CR)

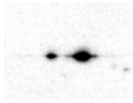

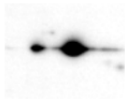
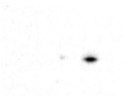
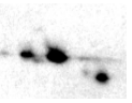


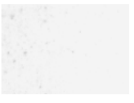







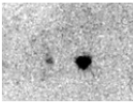
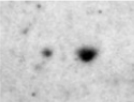
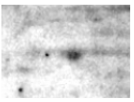
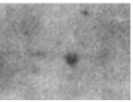



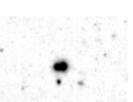



Obrázek č. 68 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra MM-15-41 v místě výskytu ENO1 (přítomnost protilátek anti-ENO1 i jiné neznámé imunoreaktivity)

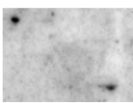
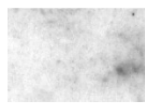


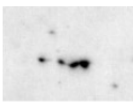
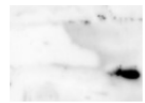
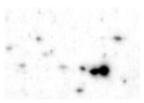

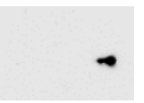
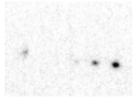

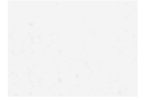
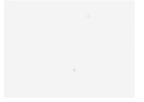

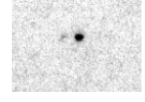
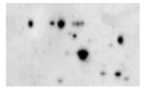
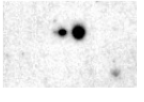
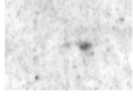

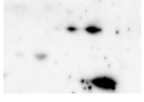

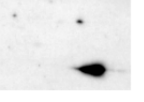


Obrázek č. 69 - Výřezy z NC membrán po detekci imunoreaktivity protilátek z pacientského séra MM-15-108 v místě výskytu ENO1 (negativní chybí CR)

Obrázek 35: Přehled imunoreaktivních skvrn v čase u pacientů s mnohočetným myelomem z Fakultní nemocnice Brno.


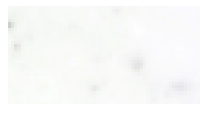

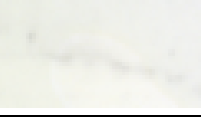

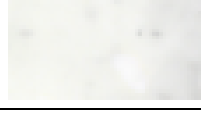
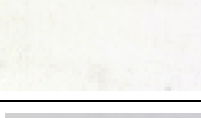
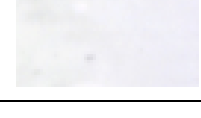
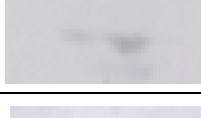

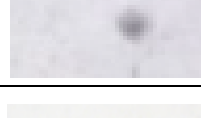

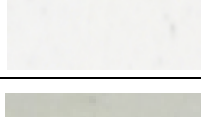

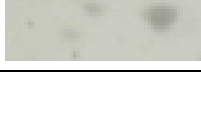

| | | | | | | |
|-------------------------------|---|---|---|--|---|---|
| Pacient č. 1, muž | M-20-001 DG | M-20-091 + 5 M, před Tx | M-20-132 + 9 M, před TTx | M-21-004 + 12 M, po TTx | M-22-006 + 24 M | |
| |  |  |  |  |  | |
| Pacient č. 2, žena | M-20-002 DG | M-20-087 + 5 M, před Tx | M-20-131 + 9 M, před TTx | M-21-047 + 15 M, po TTx | M-21-121 + 20 M | M-22-022 + 25 M |
| |  |  |  |  |  |  |
| Pacient č. 3, žena | M-20-034 DG | M-20-106 + 5 M, před Tx | M-20-156 + 9 M, před TTx | M-21-077 + 15 M, po TTx | | |
| |  |  |  |  | | |
| Pacient č. 4, muž | M-20-099 DG | M-21-025 + 7 M, před Tx | M-21-109 + 13 M, po Tx | M-22-028 + 19 M | | |
| |  |  |  |  | | |
| Pacient č. 5, muž | M-20-060 DG | M-20-138 + 5 M, před Tx | M-21-056 + 11 M, po Tx | M-21-130 + 16 M | M-22-054 + 22 M | |
| |  |  |  |  |  | |

Obrázek 36: Přehled imunoreaktivních skvrn v čase u pacientů s mnohočetným myelomem z Fakultní nemocnice Ostrava (první část).

| | | | | | | |
|-------------------------------|---|---|---|--|---|--|
| Pacient č. 6, žena | M-20-120 DG | M-21-037 + 6 M, před Tx | M-21-125 + 12 M, po Tx | M-22-047 + 18 M, | | |
| |  |  |  |  | | |
| Pacient č. 7, žena | M-20-019 DG | M-20-103 + 6 M, před Tx | M-20-140 + 10 M, před TTx | M-21-068 + 16 M, po TTx | M-21-140 + 21 M | |
| |  |  |  |  |  | |
| Pacient č. 8, žena | M-17-075 DG | M-18-034 + 6 M, před Tx | M-18-070 + 9 M, před TTx | M-18-143 + 14 M, po TTx | | |
| |  |  |  |  | | |
| Pacient č. 9, muž | M-17-082 DG | M-18-045 + 7 M, před Tx | M-18-136 + 13 M, po TTx | M-19-029 + 17 M, po TTx | | |
| |  |  |  |  | | |
| Pacient č. 10, muž | M-20-038 DG | M-20-117 + 6 M, před Tx | M-21-064 + 13 M, po TTx | M-21-132 + 18 M | M-22-049 + 24 M | |
| |  |  |  |  |  | |

Obrázek 37: Přehled imunoreaktivních skvrn v čase u pacientů s mnohočetným myelomem z Fakultní nemocnice Ostrava (druhá část).

Tabulka 33: Přehled imunoreaktivních skvrn u zdravých dárců.

| Zdravý dárcce | | Zdravý dárcce | |
|---------------|---|---------------|---|
| C201011002349 |  | C201009108777 |  |
| C201009107647 |  | C201009107810 |  |
| C201009108182 |  | C201009107638 |  |
| C201009108384 |  | C201009108955 |  |
| C201009109161 |  | C201009107368 |  |
| C201011010299 |  | C201011004570 |  |
| C201009108417 |  | C201011010304 |  |
| C201009108381 |  | C201011004430 |  |