

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2021**

**Tereza Novotná**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Sledování MSI a infekce EBV včetně exprese PD-L1 jako  
potenciálního markeru imunoterapie u karcinomu  
žaludku**

**Bakalářská práce**

**Tereza Novotná**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

**Vedoucí práce: RNDr. Ing. Libor Staněk, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza NOVOTNÁ**  
Osobní číslo: **R17794**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Sledování MSI a infekce EBV včetně exprese PDL-1 jako potenciálního markeru imunoterapie u karcinomu žaludku.**  
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

- 1) Zpracování dostupné literární rešerše na téma cílená terapie, imunoterapie u karcinomu žaludku. Molekulární diagnostika karcinomu žaludku, mikrosatelitní instabilita a exprese PDL-1 receptorů. Dále diagnostika a kvantifikace viru EBV u karcinomu žaludku a možný význam pro imunoterapii karcinomu žaludku.
- 2) Výběr vhodných pacientů s biotickým vzorkem karcinomu žaludku po histologické verifikaci.
- 3) U vybraných pacientů s metastatickým karcinomem žaludku zvládnutí analýzy pomocí imunohistochemie (IHC) expresi PDL-1 a molekulárně-biologicky MSI, cytogeneticky metodou FISH amplifikaci genu HER-2/*neu* a molekulárně-biologicky (real time PCR) EBV infekci včetně kvantifikace nálože.
- 4) Najít u pacientů s metastazujícím karcinomem žaludku vhodné biomarkery (EBV, MSI), které jsou potenciálně relevantní pro výběr pacientů, kteří mohou mít prospěch z inhibice PD-1 a současně potvrdit tuto expresi.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

### Seznam doporučené literatury:

- De Rosa S, Sahnane N, Tibiletti MG, Magnoli F, Vanoli A, et al. EBV and MSI Gastric Cancers Harbor High PD-L1/PD-1 Expression and High CD8 Intratumoral Lymphocytes. *Cancers (Basel)*. 2018 Apr 1;10(4).
- Sasaki S, Nishikawa J, Sakai K, Iizasa H, Yoshiyama H, et al. EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions. *Gastric Cancer*. 2018 Sep 28.
- Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nature Medicine*; Published online 16 July 2018.
- Tanaka H, Tamura T, Okita Y, Yoshii M, Tokumoto M, et al. [Significance of Immune-Cell Infiltration in Gastric]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2018 Feb;45(2):217-221.
- Fehlings M, Drobbe L, Moos V, Renner Viveros P, et al. Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. *Infect Immun*. 2012 Aug;80(8):2724-34.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Ing. Libor Staněk**  
3. LF, Chirurgická klinika, Praha

Datum zadání bakalářské práce: 21. března 2019  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 21. března 2019

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Tereza Novotná
Název práce:	Sledování MSI a infekce EBV včetně exprese PD-L1 jako potenciálního markeru imunoterapie u karcinomu žaludku
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	RNDr. Ing. Libor Staněk, Ph.D.
Rok obhajoby:	2021
Klíčová slova:	karcinogeneze, karcinom žaludku, EBV, MSI, imunoterapie
Počet stran:	38
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

## **SOUHRN**

Karcinom žaludku patří celosvětově mezi třetí nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění. Jedinou potencionálně kurativní léčbu představuje stále chirurgická resekce doplněná chemoterapií/chemoradioterapií. Cílená terapie pomocí monoklonálních terapeutických protilátek bohužel dosud nepřinesla větší posun s výjimkou trastuzumabu. Velkou nadějí v léčbě tohoto onemocnění se v poslední době jeví imunoterapie, která by mohla být velmi přínosná pro pacienty. Ukazuje se, že imunoterapie pomocí anti-PD-1 monoklonální protilátky pembrolizumabem je spojena s dobrou odpovědí na léčbu u pacientů s nádory s vysokou mikrosatelitovou instabilitou a pozitivitou na virus Epstein-Barrové (EBV). Na vybrané skupině 10 pacientů jsme pomocí molekulárně-biologických, cytogenetických a imunohistochemických metod stanovovali přítomnost infekce virem EBV, mikrosatelitovou instabilitu a expresi PD-L1. Naše výsledky ukázaly na přítomnost infekce u 20 % pacientů, což ukazují i velké studie, dále na souvislost mezi infekcí, mikrosatelitovou instabilitou a expresí PD-L1, což by mohlo naznačovat možnou predikci pro imunoterapii.

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Tereza Novotná

Title: Monitoring of MSI and EBV infection including PD-L1 expression as a potential marker of immunotherapy in gastric cancer

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc

Supervisor: RNDr. Ing. Libor Staněk, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: carcinogenesis, gastric cancer, EBV, MSI, immunotherapy

Number of pages: 38

Number of appendices: 0

Language: czech

**SUMMARY**

Gastric cancer is the third leading cause of cancer death worldwide. The only potential curative treatment is still surgical resection supplemented with chemotherapy or chemoradiotherapy. Unfortunately, targeted therapy with monoclonal therapeutic antibodies has not yet a major shift, with the exception of trastuzumab. Immunotherapy has recently become a great hope in the treatment of this disease which could be a great hope for patients. Immunotherapy with the anti-PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab has been shown to be associated with a good response to treatment in patients with tumors with high microsatellite instability and Epstein-Barr virus (EBV) positivity. In a selected group of 10 patients, we determined the presence of EBV infection, microsatellite instability and PD-L1 expression using molecular biological, cytogenetic and immunohistochemical methods. Our results showed the presence of infection in 20 % of patients, as shown by large studies, as well as the association between infection, microsatellite instability and PD-L1 expression which could suggest a possible prediction for immunotherapy.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Ing. Libora Staňka\*, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

\*Chirurgická klinika, 3. lékařská fakulta – Univerzita Karlova v Praze, synlab czech s.r.o., Laboratoř Praha, CUBE, sekce genetiky

V Olomouci dne: .....

Podpis: .....

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Ing. Liboru Staňkovi, Ph.D. za jeho čas, trpělivost, přátelský přístup, pomoc a vstřícnost po celou dobu trvání naší spolupráce. Ráda bych také poděkovala své rodině a blízkým za podporu při studiu.



## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CÍLE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	Molekulární podstata nádorů .....	3
3.2	Nádorová imunologie .....	4
3.3	Histopatologická diagnostika nádorů a základní vyšetřovací postupy .....	5
3.4	Molekulární diagnostika .....	6
3.5	Karcinom žaludku .....	7
3.5.1	EBV infekce u karcinomu žaludku .....	8
3.5.1.1	Epstein-Barr virus .....	10
3.5.2	MSI u karcinomu žaludku .....	12
3.5.3	HER-2 u karcinomu žaludku .....	12
3.6	Imunoterapie a PD-L1 inhibitory .....	13
3.6.1	PD-1 receptor .....	15
3.6.2	PD-L1 ligand .....	15
3.6.3	Mechanismus PD-1/PD-L1 signalizace .....	17
3.6.4	Imunoterapie a PD-1/PD-L1 .....	19
4	MATERIÁL a METODY .....	20
4.1	Biologický materiál .....	20
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	20
4.3	Laboratorní pomůcky .....	21
4.4	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	21
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	21
4.5.1	Deparafinace a izolace DNA .....	21
4.5.2	Cytogenetický průkaz numerických změn genu <i>Her-2/neu</i> metodou FISH	

4.5.3	Detekce a kvantifikace EBV .....	22
4.5.4	Imunohistochemický průkaz (IHC) exprese PD-L1, MLH-1 .....	23
5	VÝSLEDKY .....	25
5.1	Výběr pacientů .....	25
5.2	Výsledná izolace DNA .....	25
5.3	Cytogenetický průkaz numerických změn genu <i>Her-2/neu</i> metodou FISH... ..	25
5.4	Detekce a kvantifikace EBV .....	27
5.5	Imunohistochemický průkaz (IHC) exprese PD-L1, MLH-1 .....	27
5.6	Celkový nález.....	28
6	DISKUSE.....	29
7	ZÁVĚR .....	31
8	LITERATURA .....	32

## SEZNAM SYMBOLŮ a ZKRATEK

APC	antigen prezentující buňky
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Cdc25A	M-phase inducer phosphatase
CTLA-4	cytotoxický T lymfocytární antigen 4
ICAM	intra cellular adhesion molecule-1
IHC	imunohistochemie
ITIM	immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif
ITSM	immunoreceptor tyrosin-based switch motif
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MMR	mismatch repair
MSI-H	microsatellite high instability
NGS	next-generation sequencing
NSCLC	non-small-cell lung carcinoma
PD-L1	programmed cell death-Ligand 1
SHP-2	Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2
Smad3	SMAD family member 3

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1:** Incidence a mortalita u rakoviny žaludku v naší cílové věkové skupině 50–59 a jejich vývoj v čase (převzato z: <https://www.svod.cz>)
- Obrázek 2:** Životní cyklus Epstein-Barr viru (převzato z Zavala-Vega *et al.*, 2019)
- Obrázek 3:** PD-1/PD-L1 dráha. Vazba TCR a MHC aktivuje adaptivní imunitní odpověď. Vazba PD-1 a PD-L1 může zabránit signální transdukci T-lymfocytů k imunitní odpovědi, zatímco anti-PD-1/PD-L1 protilátka může inhibici zvrátit. TCR je receptorem T-lymfocytů. (převzato a upraveno z Zhang *et al.*, 2020)
- Obrázek 4:** Signalizace PD-1/PD-L1 (převzato z Zatloukalová *et al.*, 2016)
- Obrázek 5:** Cytogenetický průkaz genu *Her-2/neu* ukazuje na normální stav, kdy jsou detekovány 2 lokus specifické signály (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra
- Obrázek 6:** Cytogenetický průkaz genu *Her-2/neu* ukazuje na normální stav, kdy jsou detekovány 2 lokus specifické signály (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – přehledové zvětšení
- Obrázek 7:** Výstup z real-time analýzy detekce EBV
- Obrázek 8:** Imunohistochemický průkaz exprese PD-L1

## **SEZNAM TABULEK**

**Tabulka 1:** Teplotní a časový profil PCR reakce

**Tabulka 2:** Obsah kitu QIAamp Viral RNA Mini Kit

**Tabulka 3:** Informace o pacientech

**Tabulka 4:** Souhrn výsledků

# 1 ÚVOD

Moderní diagnostický pohled se za poslední dobu značně změnil. Klasické pojetí laboratorní diagnostiky, zahrnující biochemii, hematologii, imunologii, patologii, mikrobiologii atd., vycházelo z konceptu analýzy a detekce změn, které jsou až důsledkem diskrepance na molekulární úrovni. Současná molekulární diagnostika ovšem hledá příčiny těchto následných změn, což znamená odlišný pohled na tuto diagnostiku, odrážející se i v samotné interpretaci nálezu. Molekulární diagnostika tak hraje a bude hrát jednu z klíčových rolí v terapii většiny onemocnění, nádorových pak nevyjímaje. Tento aspekt pak nabývá na významu i v souvislosti s rozvojem personalizované medicíny. Úkolem molekulární diagnostiky nádorů je určení základních molekulárních charakteristik tohoto procesu, subtypizace nádoru, predikce terapie a prognóza onemocnění. Tato znalost na molekulární úrovni má zcela zásadní význam pro další osud pacienta.

## 2 CÍLE PRÁCE

Hypotéza:

Předpokládá se, že určité procento diagnostikovaných karcinomů žaludku bude asociováno s virovou infekcí. Pravděpodobně se jedná o infekci virem EBV. Tito pacienti by patřili do jiné biologické skupiny, než stanovuje současná klasifikace a je předpoklad, že bude jiná odezva na terapii a průběh onemocnění. Dále se podle zatím dostupných studií ukazuje, že imunoterapie pomocí anti-PD-1 monoklonální protilátky pembrolizumabem by mohla být spojena s dobrou odpovědí na léčbu u pacientů s metastatickým karcinomem žaludku.

Cílem práce je u vybraných pacientů s metastatickým karcinomem žaludku ověřit výše zmíněnou hypotézu na kohortě 10 pacientů s diagnostikovaným a potvrzeným karcinomem žaludku pomocí molekulárně-biologických, cytogenetických a imunohistochemických metod.

1. Zpracování literární rešerše
2. Ověření diagnózy karcinomu žaludku (histologie – HaE) a výběr pacientů
3. Cytogenetická analýza genu *Her2/neu*
4. PCR analýza a kvantifikace virové nálože EBV
5. Stanovení exprese PD-L1, MLH-1
6. Stanovení možných prognostických a terapeutických cílů

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Molekulární podstata nádorů

Vznik nádoru je zapříčiněn neletální změnou genomu, která je způsobena somatickou mutací (Brychtová *et al.*, 2018). Mutace jsou nejčastěji spontánního charakteru, ale mohou být způsobeny dalšími faktory, jako jsou vnější prostředí, vnitřní vlivy nebo jsou podmíněny dědičně. Nádor vzniká opakujícím se procesem klonální expanze a v dnešní době je nádor charakterizován právě jako klonální expanze jedné progenitorové buňky (Brychtová *et al.*, 2018). V organismu jsou přítomny specifické geny, které se částečně vypořádávají se změnami genomu vzniklými klonální expanzí a reparují je (Nowak *et al.*, 2006). Mezi tyto geny patří protoonkogeny, které podporují proliferaci buněk nebo naopak tumorsupresorové geny, které růst buněk inhibují (Lee a Muller, 2010). Dále se na reparaci podílejí geny řídící apoptózu a reparační geny, které řídí reparaci DNA molekul (Ronen a Glickman, 2001). Všechny výše zmíněné geny jsou řazeny mezi tzv. regulatorní geny.

Maligní nádorová klonální expanze je charakteristická vysokou proliferací buněk s četnými mitózami a nízkou diferenciací buněk (Jang *et al.*, 2011). Nádorové maligní buňky mají schopnost autonomního růstu a před programovanou buněčnou smrtí jsou chráněny narušením p53 a p21 kaskády. Vlivem těchto procesů dochází k invazivnímu růstu nádoru, který je umožněn dysregulací regulatorních genů (McKenzie *et al.*, 1999).

Protoonkogeny jsou součástí genomu normální zdravé buňky a jsou důležité pro vývoj organismu. Jsou to strukturální geny, které kódují proteiny stimulující buněčné dělení, inhibující buněčnou diferenciaci a také se podílejí na regulaci programované buněčné smrti (Torry a Cooper, 1991). Jejich produkty jsou především růstové faktory, receptory pro růstové faktory, signální transduktory, transkripční faktory a regulátory apoptózy. Protoonkogeny mohou být exprimovány v průběhu embryogeneze, kontinuálně během života a některé nemusí být exprimovány vůbec za normálních podmínek. Pokud dojde k narušení struktury protoonkogenu a k jeho mutaci, vzniká onkogen, který má negativní vliv na organismus a vyvolává maligní transformaci. Nejčastěji protoonkogeny podléhají bodovým mutacím, přestavbě chromozómů nebo amplifikaci sekvence genu, která má za následek zvýšení exprese tohoto genu (Torry a Cooper, 1991). Podíl na mutacích v genomu mohou mít i onkogenní viry, nejčastěji retroviry. Mezi nejvýznamnější



onkogeny z diagnostického hlediska patří např. ras, fos, src, erb, myc a další (Lee a Muller, 2010).

Na vývoji nádoru se tedy podílí aktivace buněčných onkogenů. Druhou genetickou změnou podílející se na vzniku nádoru je inaktivace tumorsupresorových genů. Tyto geny mají za normálních podmínek opačnou funkci oproti protoonkogenům. Jejich úkolem je kontrola buněčného cyklu a inhibice buněčného dělení v případě abnormální proliferace nebo pokud dojde k poškození genetické informace. Tumorsupresorové geny také podporují apoptózu a účastní se buněčné diferenciace a oprav DNA. Pokud tyto geny postihne mutace, dochází k jejich inaktivaci a tím odstranění negativních regulátorů buněčné proliferace. Následkem je abnormální nekontrolovatelné buněčné dělení a vznik nádoru (Hinds a Weinberg, 1994). Mezi nejvíce sledované tumorsupresorové geny při diagnostickém vyšetření patří např. BRCA1, BRCA2, pRb, p53 a p16 (Lee a Muller, 2010).

Další skupinou regulatorních genů jsou geny regulující apoptózu, do které patří nejvýznamnější bcl-2 gen. Jedná se o protoonkogen působící proti apoptóze. Antagonistou působícím proapopticky je gen bax (Tsujimoto, 1998). Tyto geny nemají vliv na buněčnou proliferaci.

Na vývoji nádoru se mohou podílet také reparační geny (někdy zvané také „mutátorové geny“), které udržují stabilitu genomu. Pokud jsou geny poškozeny v obou kopiích, dochází ke ztrátě jejich funkce a k četnějšímu poškození DNA molekul. Tím se zvyšuje riziko vzniku rakoviny (Lahtz a Pfeifer, 2011).

### **3.2 Nádorová imunologie**

Genetickou přeměnou zdravých buněk organismu vznikají buňky rakovinné. Tyto buňky jsou často vnímány jako antigenně podobné nebo tělu vlastní. Je i prokázáno, že v počátečním stádiu vzniku nádoru nebo během jeho metastáze do jiných tkání některé leukocyty dokonce pomáhají buňkám nádoru svými růstovými faktory. U větších nádorů dochází k jejich rozpadu a ani tyto rozpadové produkty nemusí vyvolat imunitní odpověď proti nádoru. Imunitní odpověď organismu proti nádoru vznikne jen v případě, kdy nádorové buňky produkují neobvyklé nebo nové molekuly (Sukari *et al.*, 2016). Tyto molekuly pak imunitní buňky rozeznávají jako cizí a nádory, které vyvolávají imunitní odpověď označujeme jako imunogenní. Takových nádorů je ale jen nepatrné množství.

U některých nádorů vyvolaných experimentálně chemickými látkami na zvířatech je pozorována dobrá imunitní reakce organismu, zatímco u nádorů vyvolaných samovolně ať už u člověka nebo u zvířat nikoliv. Z maligních nádorů u člověka patří mezi imunogenní například maligní melanom, který vzniká na sliznici nebo na kůži (Passarelli *et al.*, 2017). Maligní melanom vzniká z maligně transformovaných melanocytů, což jsou buňky produkující pigment. Tyto buňky se vyvíjí u embrya a migrují z nervové tkáně do kůže nebo do sliznice, kde jsou do určité míry považovány za „cizorodé“ (Zabierowski a Herlyn, 2010).

### **3.3 Histopatologická diagnostika nádorů a základní vyšetřovací postupy**

V patomorfologické diagnostice nádorových onemocnění se mezi základní vyšetření řadí biopsie. Biopsie je odběr buněk tkáně z živého organismu za účelem jejich dalšího zkoumání. Tato metoda je zásadní ke zjištění morfologie tkáně a určení, zda se jedná o nádor benigní nebo maligní (Ziv *et al.*, 2016). K analýze zkoumaného vzorku se využívá specializovaných metod jako např. speciální barvení, enzymová histochemie nebo afinitní histochemie. Pro další typizaci se mohou použít sofistikované metody jako imunofluorescence či další metody molekulární biologie a cytogenetiky. Hitem poslední doby se stává použití sekvenace nové generace tzv. NGS (Singer a Anderson, 2019).

Afinitní histochemie patří k novějším metodám a je čím dál více využívána v nádorové diagnostice, protože díky ní lze detekovat i velmi malé množství látek ve vyšetřované tkáni. Jedním z postupů afinitní histochemie je imunohistochemie, která k detekci antigenu v tkáni využívá specifické vazby imunoglobulinů na antigenní determinanty. K vizualizaci antigenů lze použít značené monoklonální či polyklonální protilátky (Duraiyan *et al.*, 2012). Monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu aktivovaných B-lymfocytů a mají specifitu proti jedné antigenní determinantě.

Tkáň určená pro biopsie vyšetření může být pacientovi odebrána různými způsoby. V praxi se nejčastěji provádí probatorní excize nádorů, tenkojehelná biopsie, kyretáž endometria a endobiopsie. K biopsickému vyšetření mohou být odebrány také lymfatické uzliny, případně i celé orgány za účelem diagnostiky či terapie. V některých případech nelze tkáň odebrat a je nutné vyšetřit cytologický odběr, tzn. odběr jednotlivých buněk. Příkladem je plicní, cervikální, močová cytologie či cytologie štítné žlázy. Toto vyšetření

má svá specifika, diagnostickou výtěžnost a značné limity. Je třeba si uvědomit, že se jedná o vyšetření samotných buněk, kdy nelze hodnotit stroma tkáně, které má pro karcinogenézi a diagnostiku enormní význam (He *et al.*, 2012).

Příprava histologického preparátu má několik fází. Odebraný vzorek tkáně je nejprve fixován 10% formolem. Následně se tkáň zalévá do parafínu za vzniku tkáňového bločku, což umožňuje nakrájení tkáně na tenké řezy. Pomocí mikrotomu se nařezou 4–8 µm silné tkáňové řezy, které se dále barví. Posledním krokem zhotovení histologického preparátu je zalití tkáňového řezu montovacím médiem a přikrytí krycím sklíčkem (Slaoui *et al.*, 2017).

Nezákladnější metoda stanovení histologické typizace je mikroskopické vyšetření histologických řezů obarvených hematoxylinem a eozinem (Fischer *et al.*, 2008). Nádory jsou klasifikovány podle klasifikace WHO. Dle doporučení WHO je některé nádory nutné klasifikovat přesněji tzv. subtypizovat, proto se při vyšetření využívají další metody, především imunohistochemické, molekulárně biologické a cytogenetické. Protilátky proti různým antigenům jsou pro jednotlivé typy karcinomů více či méně specifické. Při diagnostice je také zásadní přesně určit biologickou povahu nádorového procesu (Kushlinskiĭ a Nemtsova, 2014).

Nezbytné je sledovat i to, jak nádor působí na okolní struktury, zejména na vazivové pouzdro nádoru. U epitelových nádorů se sledují i známky invaze přes bazální membránu. Dále se může posoudit výskyt nekróz, jaderných atypií a četnost mitóz při velkém zvětšení s použitím objektivu 40x na 10 zorných polí. Zásadní význam pro určení prognózy má stanovení stádia a rozsahu nádorového onemocnění (Gal *et al.*, 2005). Pro účely hodnocení nádorů se využívají pravidla TNM klasifikace (tumor – nodes – metastasis). Základem TNM klasifikace je hodnocení nádoru, regionálních lymfatických uzlin a vzdálených metastáz (Rosen a Sapra, 2021).

### **3.4 Molekulární diagnostika**

V molekulární diagnostice nádorových onemocnění se biomarkery využívají k prokázání kvantifikace či genetického statutu cílových molekul reagujících s podanými léky. S pomocí biomarkerů lze také hodnotit změny v příslušné signální dráze a podle zjištěných hodnot lze odhadovat prognózu onemocnění, v takovém případě se jedná o marker prognostický. Prediktivní markery hodnotí, jaká je pravděpodobnost účinku

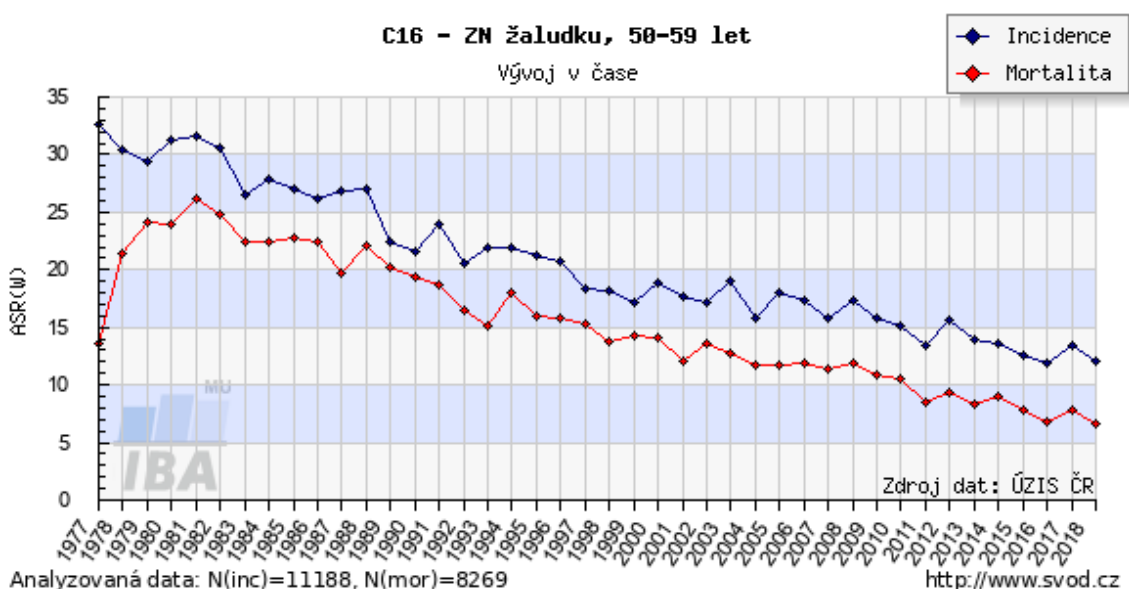
konkrétního léku (Oldenhuis *et al.*, 2008). Léky používané k takovým účelům jsou většinou inhibitory malých molekul, nejčastěji tyrozinkináz (erlotinib, gefitinib, imatinib atd.) (Baker a Reddy, 2010). Mohou mít také charakter protilátek proti příslušným receptorům (cetuximab, panitumumab, trastuzumab atd.) (Voigt *at al.*, 2012). Důležité je, aby byla v cíleně zvolených místech prokázána aktivita a aby byl profit pacienta z terapie s minimálním množstvím toxických účinků. Existuje mnoho dalších molekulárních prognostických a prediktivních faktorů, které nejsou prozatím běžně vyhodnocovány ve větší míře. Příkladem je určování genového profilu nádoru, chromozomální instabilita, denzita imunitních buněk v okolí nádoru, tumor supresorický gen T53 a jiné. Důvodem je, že názory na význam těchto prognostických a prediktivních faktorů nejsou jednotné, protože zatím nebyla dostatečně ověřena jejich výpovědní hodnota. Onkologie se zabývá prevencí, diagnostikou a léčbou nádorových onemocnění. Molekulární diagnostika se zabývá obecně studiem poruch řízení procesů, které souvisí se vznikem a následným rozvojem nádorových onemocnění. Zaměřuje se na mutační změny, jež se podílí na vzniku nádorové transformace. Využívá metody molekulární biologie a získané výsledky dává do souvislosti s nálezem z biotického vyšetření. Molekulární diagnostika je tedy velmi důležitou součástí diagnostiky a klinické medicíny navazující na onkologickou terapii a onkochirurgickou oblast (Sokolenko a Imyanitov, 2018).

### **3.5 Karcinom žaludku**

Karcinom žaludku patří celosvětově mezi třetí nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění. Jedinou potencionálně kurativní léčbu představuje stále chirurgická resekce doplněná chemoterapií/chemoradioterapií. Cílená terapie pomocí monoklonálních terapeutických protilátek bohužel dosud nepřinesla větší posun s výjimkou trastuzumabu. Zhruba u 20 % adenokarcinomů žaludku je prokázána exprese receptoru Her2 korelující s horší prognózou. U těchto karcinomů bylo současně prokázáno signifikantní prodloužení celkové doby přežití při terapii trastuzumabem. Indikace léčby je podmíněna stanovením Her2 positivity tumoru. Stanovení Her2 positivity se stanovuje IHC průkazem overexprese proteinu dle skórovacího systému pro karcinomy žaludku (Abrahamo-Machado a Scapulatempo-Neto, 2016). Za pozitivitu lze považovat pouze membránovou imunopozitivitu. Zbarvení cytoplazmy hodnotíme jako artefakt. Skórovací systém pro karcinomy žaludku je poněkud odlišný od skórovacího systému pro karcinomy prsu. Jako pozitivní 3+ hodnotíme i tumory s inkompletní bazolaterální nebo

laterální silnou expresí. Dále je nutné odlišit hodnocení endobiopsií a resekátů. U endobiopsií hodnotíme jako pozitivní výsledek při zastoupení 5 % imunopozitivních buněk, zatímco u resekátu od 10 % imunopozitivních buněk. U difúzních adenokarcinomů expresi IHC nestanovujeme u endobiopsií a i u resekátů může být interpretace sporná a je vhodnější využít průkazu amplifikace pomocí ISH. Pacientům je kvůli nedostatku časných příznaků obvykle diagnostikována lokálně pokročilá či metastazující rakovina. V takovém stavu jsou konvenční způsoby léčby méně účinné. Velkou nadějí v terapii tohoto onemocnění se v poslední době jeví imunoterapie, která by mohla být velkou nadějí pro pacienty. Dostupné studie např. z Medical Center v Soulu publikované v Nature Medicine či ESMO ukazují, že imunoterapie pomocí anti-PD-1 monoklonální protilátky pembrolizumabem je spojena s dobrou odpovědí na léčbu u pacientů s metastatickým karcinomem žaludku. Pozorovali vynikající terapeutickou reakci na pembrolizumab u pacientů s nádory s vysokou MSI a pozitivitou na virus Epstein-Barrové (EBV) (Kang a Chau, 2020).

**Obrázek 1:** Incidence a mortalita u rakoviny žaludku v naší cílové věkové skupině 50–59 a jejich vývoj v čase (převzato z: <https://www.svod.cz>)



### 3.5.1 EBV infekce u karcinomu žaludku

Diskontinivní charakteristikou u nádorů žaludku s pozitivitou na EBV je nadměrná exprese ligandů programované buněčné smrti PD-L1/PD-L2 a Janus kinázy (JAK2),

hypermethlyce DNA a častá mutace PIK3CA (Miliotis a Slack, 2020). Nádorové buňky vykazují ubikvitární a monoklonální infekci viru Epstein-Barrové. Přítomnost monoklonální EBV infekce značí klonální výběr virem infikovaných buněk v počátečních fázích vývoje nádoru. Genom EBV je uchován v jádře jako jaderný epizóm nezávislý na chromozómech. Role EBV v karcinogenezi žaludku je stále předmětem výzkumu, ale předpokladem je, že infekce EBV přispívá k progresi a udržení rakoviny. Může se tak dít přímo prostřednictvím aktivity virových proteinů a RNA. Druhou možností, jak EBV ovlivňuje karcinogenezi, je nepřímo indukcí somatických změn v genomu a epigenomu hostitelského organismu (Miliotis a Slack, 2020).

Virus Epstein-Barrové může tedy sloužit jako potenciální biomarker při léčbě rakoviny žaludku. EBV-pozitivní typ adenokarcinomu žaludku je možné identifikovat metodou real-time PCR pomocí specifických primerů. Jednou z možností je také *in situ* hybridizace (ISH) na virové nukleové kyseliny (Rodriquenz *et al.*, 2020). Potenciální alternativou je sekvenování nové generace, kdy by detekce EBV byla součástí většího diagnostického panelu (zatím pouze snad blížká budoucnost).

Několik studií prokázalo, že karcinom žaludku spojený s EBV je obvykle vyznačován vysokou lymfocytární infiltrací v mikroprostředí nádoru (Angell *et al.*, 2019). Výskyt lymfocytů v nádoru je známkou imunitní odpovědi organismu proti nádorovým buňkám a může tak znamenat lepší prognózu. Další charakteristikou je nadměrná exprese genů spojených s imunitou, včetně CD274 (gen kódující PD-L1) (Derks *et al.*, 2016).

PD-L1 je exprimován jak nádorovými buňkami, tak i imunitními buňkami v nádoru stromatu. PD-L1 je ligandem receptoru programované buněčné smrti (PD-1), který je exprimován na povrchu infiltrujících cytotoxických T-lymfocytů (Salmaninejad *et al.*, 2019). Interakcí PD-L1 s PD-1 receptorem dochází k inhibici cytotoxických T-lymfocytů infiltrujících do nádoru, které pak nejsou schopny napadení a eliminace nádorových buněk. PD-L1 je jen jeden z mnoha kontrolního bodů imunitního systému, u kterých je prokázáno, že jsou upregulovány EBV infekcí (Miliotis a Slack, 2020). Tento aspekt je pozorován u EBV pozitivních nádorů ve srovnání s EBV negativními nádory. Interakci PD-1/PD-L1 je věnována zvláštní pozornost, protože se stala cílem nedávných průlomových výzkumů v léčbě rakoviny. Monoklonální protilátky jsou schopné blokovat interakce mezi PD-L1 ligandem a PD-1 receptorem, a tím imunitní systém opět získává schopnost sledovat a atakovat nádorové buňky (Salmaninejad *et al.*, 2019).

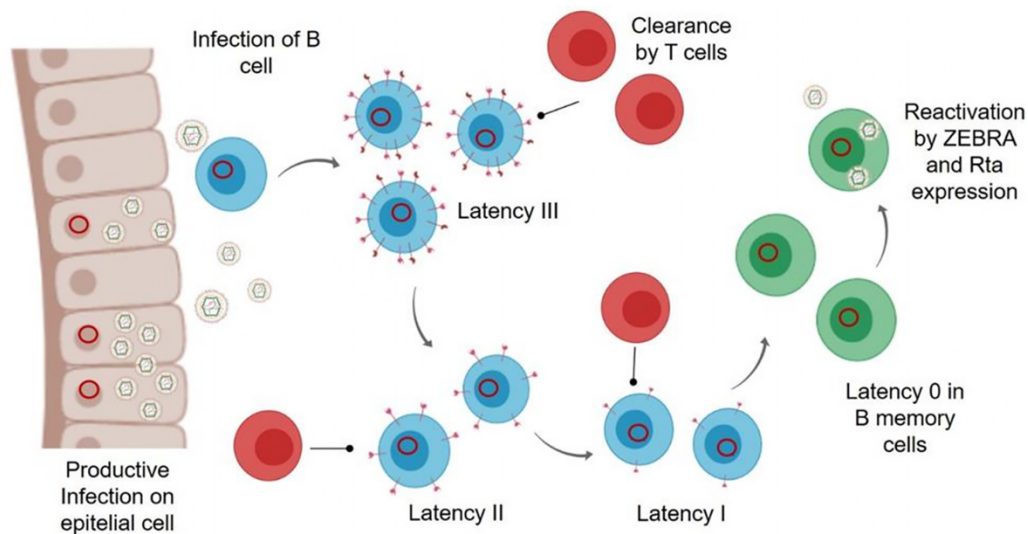
### 3.5.1.1 Epstein-Barr virus

Virus Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus - EBV), známý též jako lidský herpesvirus 4 (Human herpesvirus 4 – HHV 4), je obalený, dvouvláknový DNA gamma-1herpesvirus z čeledi *Herpesviridae* (Zanella *et al.*, 2020). Je rozšířený v celé lidské populaci s více než 90% prevalencí. Je spojován s Burkittovým lymfomem, nasopharyngeálním karcinomem, Hodgkinovým lymfomem a karcinomem žaludku (Kempkes a Robertson, 2015). Přenos viru je převážně orálně/slinami, ale přenos viru je také skrz mateřské mléko, genitální sekrece či krevní transfuzi a transplantace (Amon a Farrell, 2004). K primární infekci dochází hlavně v dětství, kdy je infekce bezpříznaková. U adolescentů a v dospělosti může až v 50 % infekce vyústit v infekční mononukleózu. Přibližně 90 % lidí je celosvětově infikováno EBV ve formě latentní infekce (Dunmire *et al.*, 2015).

Cílovými buňkami viru jsou B-lymfocyty. Do buňky virus vstupuje prostřednictvím receptoru pro C3d složku komplementu CD21 (Jabs *et al.*, 1999). Infikované B-lymfocyty aktivují imunitní odpověď (infekcí mimikují proces antigenem řízené diferenciaci), která je zprostředkovaná cytotoxickými T-lymfocyty a NK buňkami (Roberts *et al.*, 1996). EBV, stejně jako všechny herpetické viry, navozuje celoživotní persistentní infekci, která souvisí s bifázickým virovým cyklem, který zahrnuje latenci a následnou reaktivaci, tedy lytickou replikaci. EBV asociované malignity jsou spojeny s latentní formou infekce, kdy virus perzistuje v klidových paměťových B-lymfocytech.

Lytický cyklus nebo také produktivní infekce dává vzniku novým infekčním virionům. Replikace probíhá v B-lymfocytech nebo epiteliálních buňkách. V B buňkách následuje replikace většinou po reaktivaci, v epiteliálních buňkách nastává replikace většinou přímo po vstupu do buňky. Pro lytickou replikaci musí být genom lineární (v latentní je cirkularizován). Během lytické replikace je za replikaci virového genomu zodpovědná virová DNA polymeráza. Genové produkty lytické fáze jsou rozděleny na okamžitě časné, časné a pozdní. Okamžitě časné genové produkty působí jako transaktivátory, což zvyšuje expresi pozdějších lytických genů (Hammerschmidt a Sugden, 2013). Produkty časných genů mají roli v replikaci a metabolismu. Produkty pozdních genů mají strukturální roli a formují kapsidu, nebo pomáhají úniku před imunitním systémem.

**Obrázek 2:** Životní cyklus Epstein-Barr viru (převzato z Zavala-Vega *et al.*, 2019)



Na rozdíl od lytického cyklu latentní cyklus nevede k produkci nových virionů (Odumade *et al.*, 2011). Cirkularizovaný genom EBV se v latenci vyskytuje ve formě nukleárních epizomů. Replikuje se pouze jednou s každým buněčným cyklem a využívá hostitelskou DNA polymerázu (na rozdíl od lytického cyklu) (Odumade *et al.*, 2011). Zároveň EBV snižuje v latenci expresi svých genů a projevuje se jeden ze tří programů latence (I-III). Každý program latence vede k tvorbě omezené a odlišné sady virových proteinů a virových RNA (Calderwood *et al.*, 2007) (Hutzinger *et al.*, 2009). Tato strategie brání účinnému rozpoznání infikovaných buněk imunitním systémem, což je nezbytná vlastnost viru při persistentní infekci. V B buňkách jsou možné všechny tři programy. Prvním programem je latence III, kdy je exprimováno nejvíce genů. Proteiny a RNA produkované v latenci III transformují buňku na proliferující blast (aktivace B buněk) (Odumade *et al.*, 2011). Následně virus omezí expresi genů a virus vstupuje do latence II, kdy EBV indukuje diferenciaci do paměťových B buněk. V latenci I virus exprimuje jeden gen pro protein EBNA-1, který umožňuje replikaci pouze, když se replikuje paměťová B buňka (Odumade *et al.*, 2011). K reaktivaci může docházet po různých podnětech, ale co reaktivaci spouští není přesně známo. Jednou z možností reaktivace je, že latentně infikované B-lymfocyty reagují na nesouvisející infekce a dochází k stimulaci receptoru B buněk (Odumade *et al.*, 2011).



### 3.5.2 MSI u karcinomu žaludku

Nedávno bylo zjištěno, že u pacientů s nádory s vysokou mikrosatelitovou nestabilitou (MSI-H) může mít imunoterapie pozitivní výsledek (Li *et al.*, 2020). Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice, které se skládají z opakujících se sekvencí 1-6 nukleotidů a vyskytují se hlavně v blízkosti konců chromozómů. Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní a vyskytují se v celém genomu (Fan a Chu, 2007).

Pokud dojde v procesu replikace DNA k chybám, jsou rozpoznány postreplikačním kontrolním a opravným mechanismem mismatch repair (MMR). Dojde-li k poruchám v MMR genech a mismatch repair mechanismus selhává, znamená to, že organismus není schopný opravit chyby, které se vyskytly během replikace DNA nebo rekombinace DNA a následně dochází ke kumulaci mutací v mikrosatelitových oblastech genomu. Takové shromažďování chyb způsobuje tvorbu nových mikrosatelitních fragmentů, které jsou měřitelné. Výskyt MSI je důkazem nesprávné funkce MMR mechanismu a může tak znamenat predispozici k rozvoji rakoviny (Li *et al.*, 2020).

MSI může sloužit jako biomarker, proto je jeho detekce velmi důležitá. Nádory nesoucí změnu MSI budou s větší pravděpodobností reagovat na léčbu specifickými léky, včetně inhibitorů imunitního kontrolního bodu PD-1.

MSI lze rozdělit dle frekvence na 3 typy: vysoká nestabilita mikrosatelitů (MSI-H), nízká nestabilita mikrosatelitů (MSI-L) a mikrosatelity stabilní (MSS). S nedávným vývojem technologie detekce MSI a imunosupresiv v léčbě nádorů vědci zjistili, že nádory s MSI-H pozitivně reagují na imunoterapii (Li *et al.*, 2020). V současnosti jsou pro detekci MSI-H prověřeny dvě metody. První z nich je imunohistochemický průkaz, kterým lze hodnotit úroveň exprese MLH-1, ze které lze odvodit míru poškození MMR. Další metodou je polymerázová řetězová reakce hodnotící změny na molekule DNA za použití specifických primerů. PCR také testuje délku mikrosatelitů v normálním stavu a v nádorové tkáni (Samowitz *et al.*, 2008).

### 3.5.3 HER-2 u karcinomu žaludku

Pokroky v molekulární biologii vedly k identifikaci potenciálních markerů prognostického a terapeutického významu u některých nádorů. HER-2 testování v případě cílené terapie v současné době představuje základní algoritmus v léčbě nádorového onemocnění prsu, ale také se jedná o potenciální možnost užití biologické

léčby u karcinomu žaludku. Receptory velké rodiny HER hrají v případě karcinomu žaludku významnou roli. HER-2 pozitivita u karcinomu žaludku původně sama o sobě představovala nepříznivý prognostický faktor. To se změnilo díky moderní léčbě pomocí terapeutických monoklonálních protilátek (Gravalos a Jimeno, 2008). Z molekulárního hlediska je terapeutickým cílem heterodimerizace HER-2 a HER-3 receptorů. Dimerizace HER-2 s dalšími členy skupiny HER je totiž největším hnacím mechanismem růstu a přežívání nádorových buněk. Rodina receptorů lidského epidermálního růstového faktoru (HER) zahrnuje čtyři homologické členy (Sergina a Moasser, 2007). Aktivace těchto receptorů ovlivňuje esenciální tumorogenní procesy a hraje zásadní roli v patogenezi rakoviny žaludku.

### **3.6 Imunoterapie a PD-L1 inhibitory**

Při léčbě nádorových onemocnění se v moderní medicíně využívá především chirurgická léčba, radioterapie nebo chemoterapie. Dalším možným způsobem léčby rakoviny je imunoterapie, která je na rozdíl od výše zmíněných způsobů léčby typem biologické léčby a využívá v boji proti rakovině schopnost imunitního systému organismu. Funkcí imunitního systému je rozpoznat tělu nebezpečné látky, které mohou pocházet jak z vnějšího prostředí, tak z prostředí vnitřního. Buňky imunitního systému rozpoznávají cizorodé částice na základě specifických antigenů – v případě nádorů se jedná o endoantigeny, které jsou původem tělu vlastní. Jedná se o produkty buněk, které byly nádorově pozměněny. Pokud je antigen imunogenní, spustí organismus imunitní reakci, čehož se využívá právě při léčbě imunoterapií. Imunitní systém je založen na vzájemné kooperaci stimulačních a inhibičních mechanismů. Nádorové buňky dokáží využít inhibiční mechanismus k úniku a vyhnutí se imunitní reakci. Hlavní cíle protinádorové imunoterapie jsou tzv. kontrolní body (checkpoints) imunitní reakce. V poslední době je pozornost zaměřena na PD-1/PD-L1 inhibiční dráhu, neboli dráhu programované buněčné smrti. Její blokaci dochází k potlačení inhibičního signálu a tím k obnově účinků mechanismů imunitního systému a zesílení protinádorové aktivity. K blokaci receptoru PD-1 a ligandu PD-L1 se využívá protilátek, které jsou již klinicky celkem úspěšně užívány (Zatloukalová *et al.*, 2016).

Funkcí imunitního systému je rozpoznání a likvidace patogenů. Může se jednat o škodlivé látky, parazity, viry nebo také poškozené či nádorové buňky organismu. Všechny procesy, které v organismu probíhají, jsou pod nepřetržitým imunitním dozorem, včetně karcinogeneze. Největší imunitní reakce probíhá v počátcích nádorové transformace, kdy imunitní systém potlačuje proliferaci nádorových buněk. V průběhu vývoje nádoru se působení imunitního systému snižuje, protože jsou vyčerpány jeho možnosti. V tuto chvíli nádorové buňky začnou využívat kontrolní body imunitního systému k úniku před reakcí (Zatloukalová *et al.*, 2016).

Nádorové buňky jsou navíc ve výhodě, protože jsou značně podobné buňkám normálním a pro imunitní systém je obtížné je rozeznat. Taktikou nádorových buněk je skrytí jejich specifického antigenu, aby nemohly být rozpoznány imunitním systémem. Mutací genů, které kódují nádorové antigeny, vzniká několik variant antigenů, které jsou pro imunitní systém nerozpoznatelnými (Zatloukalová *et al.*, 2016).

Další strategií nádorových buněk je snížení exprese MHC molekul nebo její úplné potlačení. Funkcí MHC molekul je prezentování nádorových antigenů buňkám imunitního systému, především T-lymfocytům, které bez toho neumí spustit imunitní odpověď. Některé nádory mohou také zvýšit produkci molekul glykokalyxu, které skryjí antigen (Šťastný *et al.*, 2015). Nádorové buňky umí ve vlastní prospěch využít i samotné buňky imunitního systému. Aktivita T-lymfocytů je přísně regulovaná kostimulačními a inhibičními signály. T-lymfocyty jsou aktivovány přes receptor TCR, který interaguje s nádorovým antigenem, jenž je navázán na MHC molekulu APC (antigen prezentující buňky). Díky tomuto signálu je imunitní odpověď specifická, ale není dostatečně silný k aktivaci T-lymfocytů. Druhým kostimulačním signálem je vazba CD28 molekuly nacházející se na povrchu T-lymfocytů a receptoru B7, který je součástí buňky APC. Tento kostimulační signál je nezávislý na přítomnosti antigenu, ale k vyvolání aktivace T-lymfocytů je bezpodmínečně nutný (Zatloukalová *et al.*, 2016). Pokud není kostimulační signál dostatečně silný, dojde po interakci T-lymfocytu s antigenem nádorové buňky k „uspání“ a funkční neaktivitě, tzv. anergii. Z tohoto důvodu nádorové buňky exprimují kostimulační molekuly (CD80, CD86) jen v minimální množství nebo vůbec. Anergní T-lymfocyty nejsou schopné produkce aktivačních cytokinů, a tím nemůžou dozrát v efektorové buňky (Zatloukalová *et al.*, 2016).

Aktivace T-lymfocytů a rozsah imunitní odpovědi závisí na řadě dalších interakcí mezi receptory a ligandy, které ovlivňují zesílení či utlumení procesů aktivace T buněk.

Důležitá inhibiční dráha, která navozuje anergii T-lymfocytů, je PD-1/PD-L1. Tato dráha je jedním z kontrolních bodů imunitního systému a její funkcí je ochrana organismu před autoimunitním onemocněním. Současně může mít tato dráha podíl na vzniku nádorové tolerance. Nádorová tolerance je provázena nerovnováhou mezi kostimulačními a inhibičními signály (Zatloukalová *et al.*, 2016). Jedná se o velmi složitý proces. Pokud je aktivita inhibiční dráhy PD-1/PD-L1 zvýšená, může dojít k funkčnímu poškození efektorových T-lymfocytů, což způsobí jejich „vyčerpání“. Lymfocyty jsou v tomto stavu neschopné cytotoxické specifické odpovědi a zničení nádorových buněk (Zatloukalová *et al.*, 2016).

### **3.6.1 PD-1 receptor**

PD-1 receptor je jedním ze zásadních ko-inhibičních receptorů, který je exprimován na T-lymfocytech po jejich aktivaci. Jedná se o transmembránové glykoproteiny typu I patřící do rodiny imunoglobulinů CD28/B7 (Zatloukalová *et al.*, 2016).

PD-1 se skládá z extracelulární domény Ig-V, která je přes 20 aminokyselin dlouhý linker napojena na transmembránovou hydrofobní doménu. Intracelulární doména na vnitřní straně membrány obsahuje dva tyrosinové signální motivy – imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (ITIM) a imunoreceptorový tyrosinový „přepínatelný“ motiv (ITSM). Receptor PD-1 kóduje gen PDCD1, který obsahuje 5 exonů a je lokalizovaný na chromozomu 2 (Keir *et al.*, 2008). PD-1 nejvíce exprimují aktivované T-lymfocyty a B-lymfocyty, NK buňky („natural killer“), dendritické buňky, monocyty (Keir *et al.*, 2008). Nejdůležitější je však přítomnost inhibičního PD-1 receptoru na T-lymfocytech. U imunitních buněk v neaktivovaném klidovém stavu je exprese PD-1 velmi nízká. Stimulací T-lymfocytů byla už po 2 hodinách zjištěna vysoká míra exprese PD-1, která se následných 24 hodin plynule zvyšovala (Chemnitz *et al.*, 2004).

Silná exprese PD-1 probíhá na „vyčerpaných“ inaktivních T-lymfocytech během chronické virové infekce.

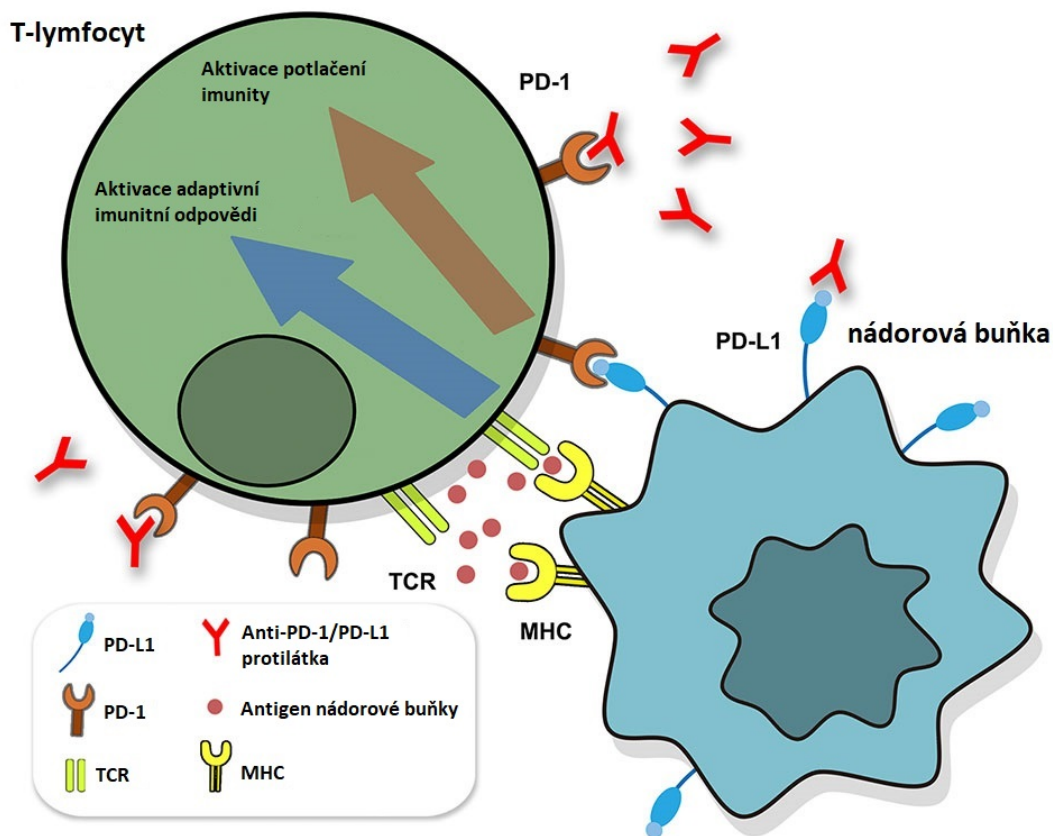
### **3.6.2 PD-L1 ligand**

PD-L1 (také B7-H1, CD274) a PD-L2 (také B7-DC, CD273) jsou ligandy, které se specificky vážou na PD-1 receptor. Jde o transmembránové glykoproteiny

imunoglobulinového charakteru složené ze dvou extracelulárních domén – IgC a IgV. Díky obsahu čtyř cysteinových zbytků vytvářejí disulfidické můstky, které stabilizují molekulu (Zatloukalová *et al.*, 2016). Intracelulární doména postrádá signální motivy, a tak není schopna signál dále přenášet. S PD-L1 ligandem interaguje kostimulační molekula CD80, kterou exprimují aktivované T-lymfocyty (Butte *et al.*, 2007). Pokud dojde k jejich vzájemné interakci, omezí se funkce T-lymfocytů a sníží se produkce cytokinů (Butte *et al.*, 2007).

Předpokládá se, že PD-L1 a PD-L2 jsou zapojeny do odlišných procesů v regulaci imunitní odpovědi, protože se značně liší svými expresními profily. PD-L2 exprese probíhá u makrofágů a dendritických buněk a bývá většinou detekován ve velice malém množství. Předpokladem je, že PD-L2 aktivuje a polarizuje T-lymfocyty (He *et al.*, 2015).

**Obrázek 3:** PD-1/PD-L1 dráha. Vazba TCR a MHC aktivuje adaptivní imunitní odpověď. Vazba PD-1 a PD-L1 může zabránit signální transdukci T-lymfocytů k imunitní odpovědi, zatímco anti-PD-1/PD-L1 protilátka může inhibici zvrátit. TCR je receptorem T-lymfocytů. (převzato a upraveno z Zhang *et al.*, 2020)



PD-L1 exprese probíhá hlavně na T-lymfocytech, B-lymfocytech, makrofázích a dendritických buňkách. Vyšší hladina PD-L1 je často detekována u nádorové tkáně, kde se ligand nachází na povrchu buněk v lokálně ohraničených zónách. PD-L1 má pravděpodobně vliv na vznik nádorové tolerance. Zvýšená hladina je spjatá se špatnou prognózou nádorového onemocnění a vyšší exprese PD-L1 stupňuje invazivitu a agresivitu nádoru (He *et al.*, 2015).

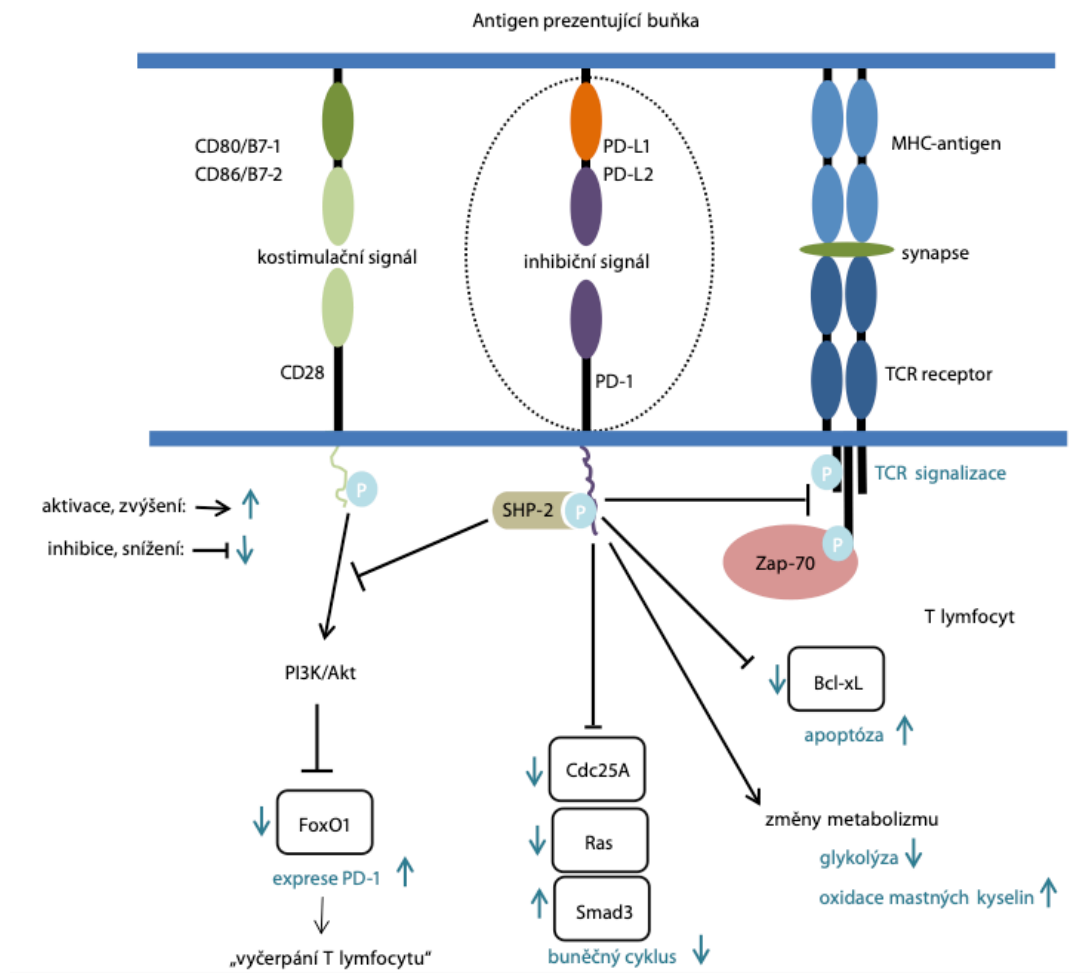
### 3.6.3 Mechanismus PD-1/PD-L1 signalizace

Aby byly T-lymfocyty aktivovány, musí dojít k interakci specifického TCR receptoru na lymfocytu s antigenem, který je navázán na MHC molekulu antigen prezentující buňky (APC). APC pomocí MHC molekul rozezná nádorovou buňku, fagocytuje ji a poté její antigeny prezentuje na svůj povrch do molekulární kapsy MHC. Pokud dojde k této interakci, vzniká imunologická synapse, která obsahuje další kostimulační molekuly – např. CD40, CD80/CD86, CD28. Stabilitu komplexu zajišťují adhezivní molekuly ICAM nebo LFA-1 (Zatloukalová *et al.*, 2016).

Jestliže dojde k interakci s inhibiční dráhou PD-1/PD-L1, tak se nejdříve naváže ligand PD-L1 na receptor PD-1. Po připojení k TCR synapsi probíhá defosforylace ZAP-70 a CD3 molekuly, které jsou součástí TCR receptoru a účastní se TCR signalizace. Při navázání PD-L1 na PD-1 dochází také k fosforylaci tyrozinu na motivu ITSM, následně dojde k aktivaci tyrozinové fosfatázy SHP-2, která inhibuje PI3K/Akt signální dráhu. Oba tyto děje aktivují další procesy způsobující omezení proliferace a ztrátu funkce T-lymfocytů. Dráha PD-1/PD-L1 indukuje apoptózu T-lymfocytů. Kostimulační synapse za normálních podmínek podporuje expresi anti-apoptického Bcl-xL, avšak exprese Bcl-xL je v prostředí nádoru potlačena aktivitou PD-1/PD-L1 (Zatloukalová *et al.*, 2016). Proliferaci T-lymfocytů může dále omezit zvýšená aktivita transkripčního faktoru Smad3, která má za následek blokaci buněčného cyklu, či degradace Cdc25A – aktivátoru buněčného cyklu. Oba tyto děje způsobují inhibici proliferace T-lymfocytů a jsou indukované dráhou PD-1/PD-L1. Faktorem stimulujícím buněčný cyklus je ras (p21ras), jeho exprese je inhibována vlivem signalizace PD-1/PD-L1 dráhy. PD-1/PD-L1 dráha inhibuje také signální dráhu PI3K/Akt. Tato dráha snižuje degradaci FoxO1

transkripčního faktoru přispívajícího zpětně k expresi PD-1, čím napomáhá ke vzniku „vyčerpaných“ T-lymfocytů (Zatloukalová *et al.*, 2016).

**Obrázek 4:** Signalizace PD-1/PD-L1 (převzato z Zatloukalová *et al.*, 2016)



Dráha PD-1/PD-L1 působí také na metabolismus T-lymfocytů a to tak, že inhibuje glykolýzu a metabolismus aminokyselin a zároveň aktivuje děje, které vedou k oxidaci mastných kyselin. Dále signalizace PD-1/PD-L1 indukuje vývoj Treg (regulační T-lymfocyty), které se účastní potlačení imunity tak, že snižují aktivitu u efektorových T-lymfocytů.

### 3.6.4 Imunoterapie a PD-1/PD-L1

V současnosti jsou využívány monoklonální protilátky, které blokují jak PD-1 receptor, tak PD-L1 ligand. Pro klinické účely byl jako první schválený lék pembrolizumab. Jedná se o humanizovanou protilátku IgG4- $\kappa$  proti PD-1 receptoru. Pembrolizumab se využíval k léčbě pokročilého melanomu, avšak léčba byla účinná pouze u nízkého počtu pacientů a nežádoucí autoimunitní účinky mohou být velmi závažné. Dalším schváleným lékem byl nivolumab, což je také také monoklonální protilátka proti receptoru PD-1. Nivolumab byl schválen k léčbě renálního karcinomu, pokročilého metastazujícího melanomu a NSCLC, kde byl pozorován významný účinek monoterapie a nízké vedlejší účinky. Proti PD-L1 ligandu jsou využívány např. protilátky avelumab, atezolizumab a durvalumab (Zatloukalová *et al.*, 2016).

Další možnou léčbou je kombinovaná léčba, kdy dochází současně k blokaci dvou kontrolních bodů – CTLA-4 a PD-1. Inhibice receptoru PD-1 působí na T-lymfocyty převážně ve fázi efektorové a inhibice CTLA-4 má vliv hlavně na časnou aktivaci T-lymfocytů. Kombinovaná léčba měla lepší výsledky a vyšší účinnost než monoterapie, ale byla vyšší také toxicita, která je nežádoucí (Zatloukalová *et al.*, 2016).



## **4 MATERIÁL a METODY**

### **4.1 Biologický materiál**

Vzorky biopsií (fixované ve formolu a zalité do parafinu) pro veškerá vyšetření pocházejí z archivů Ústavu patologie, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV). Jedná se o kohortu pacientů z Chirurgické kliniky FNKV. Celková kohorta zahrnovala 10 pacientů s metastazujícím karcinomem žaludku. Všechny vzorky byly histologicky verifikovány.

Veškerá molekulární vyšetření a výzkum byl schválený etickou komisí.

### **4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky**

#### **Použité chemikálie:**

- 96% ethanol (Penta, kat. č. 70390-11001)
- DAPI (Thermo Fisher Scientific™, kat. č. D1306)
- destilovaná voda UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific™, kat. č. 10977015)
- dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific™, kat. č. R1121)
- Formaldehyde solution (Sigma-Aldrich, kat. č. 50-00-0)
- MgCl<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific™, kat. č. R0971)
- ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific™, kat. č. P36930)
- Taq polymeráza (Thermo Fisher Scientific™, kat. č. 18038018)
- xylen (Penta, kat. č. 28430-11000)

#### **Použité soupravy:**

- kit EBV Real-Time PCR (96) KitGen
- králičí monoklonální protilátka – Anti-MLH-1 (M1) Primary Antibody (Roche, kat. č. 06472966001)
- králičí monoklonální protilátka – Anti-PD-L1 antibody (Abcam, kat. č. ab205921)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, kat. č. 52904)
- ZymoLight® SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (Zytovision Pragostem, kat. č. Z-2015-200)

### **4.3 Laboratorní pomůcky**

- automatické pipety v rozsahu 1–200 µl (Eppendorf)
- plastové špičky (Eppendorf)
- podložní sklo SuperFrost Plus (Thermo Fisher Scientific™)

### **4.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

- barvicí přístroj BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Roche)
- box Aura PCR (BioAir)
- centrifuga MIKRO 120 (Schoeller)
- centrifuga Universal 320 R (Hettich)
- fluorescenční mikroskop (Olympus)
- hybridizační pec (Cleaver Scientific Ltd)
- inkubátor ThermoBrite (Abbott Molecular)
- laminární box Clean Air (Schoeller)
- mikrotomu Leica SM 2010R (Baria)
- minicentrifuga Spectrafuge™ mini – centrifuge (Labnet)
- rotor Gene Q (Dynex)
- světelný mikroskop (Olympus)
- vodní lázeň Julabo TW8 (Schoeller)
- vortex IKA MS2 mini shaker (Gemini BV)

### **4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

#### **4.5.1 Deparafinace a izolace DNA**

Deparafinace parafinových řezů je prováděna v laminárním boxu v místnosti sloužící pro izolaci DNA. Ke vzorkům je přidáno 500 µl xylenu a vzorek je vortexován po dobu 10 sekund s následnou inkubací 2–5 minut při pokojové teplotě. Následně jsou vzorky centrifugovány při 12 500 rpm po dobu 2 minut. Po odstranění supernatantu je přidáno 600 µl EtOH (96% EtOH). Dále je provedena centrifugace při 12 500 rpm po dobu 2 minut. Supernatant je odstraněn a otevřené zkumavky jsou sušeny při 37 °C po dobu 10 minut. Pelet je resuspendován se 180 µl ATL pufru a 20 µl proteinázy K a inkubován přes noc v termobloku při 56 °C.

Po natrávení je přidáno 200 µl AL pufru, který je před použitím důkladně protřepán a 200 µl EtOH. Vzorky jsou 10 sekund vortexovány a následně centrifugovány při 12 500 rpm. Lyzát je přenesen na kolonku s membránou. Následně je lyzát centrifugován při 8 000 rpm po dobu 60 sekund. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a bylo přidáno 500 µl pufru AW1 a centrifugováno při 8 000 rpm 1 minutu. Dále je přidáno 500 µl pufru AW2 a centrifugováno při 8 000 rpm po dobu 60 sekund. Následuje sušení v nové sběrné zkumavce centrifugací při 12 500 rpm po dobu 3 minut. Pro eluci je přidáno 50 µl AE pufru a inkubováno 1 minutu s následnou centrifugací při 12 500 rpm, 1 minutu. Finální eluční objem je cca 50 µl izolované DNA, která je zamrazena v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalšího zpracování.

#### **4.5.2 Cytogenetický průkaz numerických změn genu *Her-2/neu* metodou FISH**

Cytogeneticky jsou analyzovány ultratenké řezy tkání příslušných nádorů v interfázi za použití lokus specifických sond ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (Zytovision Pragostem). Interpretace je provedena na Fluorescenčním mikroskopu Olympus.

Principem metody FISH je denaturace DNA nádorových buněk s následnou hybridizací příslušných sond. Vzorek deparafinujeme pomocí xylenu a následně dehydratujeme alkoholovou řadou. Následně tkáň fixujeme (formol) a trávíme buněčné membrány trávicím enzymem (pepsin) při pH 2,0 po dobu 30 minut. Po natrávení aplikujeme 10 µl sondy a cílovou DNA denaturujeme na ohřívací destičce při  $75\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut. Hybridizace sondy poté probíhá v termostatu při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  přes noc. K odstranění nespecifických signálů je použit horký pufrovaný solný roztok po dobu 2 minut při teplotě  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Podbarvení je provedeno pomocí DAPI. Preparát je překryt krycím sklem a uchováván v lednici při teplotě  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.5.3 Detekce a kvantifikace EBV**

Amplifikační analýza byla provedena metodou kvantitativní multiplex polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase (quantitative multiplex real-time polymerase chain reaction – multiplex qPCR), kitem EBV Real-Time PCR (96) KitGen. Tato je založena na systému patogen-specifických primerů a sond, které v průběhu reakce rozeznávají svůj specifický cíl. Interní kontrola (IC) detekuje autentický lidský gen. Z důvodu zachování

maximální senzitivity diagnostické soupravy je interní kontrola amplifikována v oddělené zkumavce. V případě nepřítomnosti amplifikačního signálu IC při vyhodnocování křivek je potřeba provést znovu přípravu PCR templátu.

Reagencie Unipremix EBV a Interní kontrola jsou před použitím rozmrazeny, zvortexovány a stočeny ve stolní centrifuze. Taq DNA polymeráza je uchována v mraženém bloku a před přidáním pouze stočena. Směs reagensů je rozpipetována na 0,1 ml stripy, dle pipetovacího protokolu. Analýza probíhá na přístroji RotorGene (Dynex) s předdefinovaným programem dle příbalového postupu.

**Tabulka 1:** Teplotní a časový profil PCR reakce

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Úvodní fáze	94 °C	5 min	1
Denaturace	94 °C	20 s	
Hybridizace	58 °C	30 s (snímání fluorescence)	55
Elongace	72 °C	30 s	

**Tabulka 2:** Obsah kitu QIAamp Viral RNA Mini Kit

Popis	Objem/množství
AL pufr	2x33ml
AW1 pufr (koncentrát)*	98 ml
AW2 pufr (koncentrát)**	66 ml
AE pufr	128 ml
ATL pufr	50 ml
Proteináza K	6 ml
Sběrné zkumavky	750 ks
Kolonky s membránou	250 ks

\* Před prvním použitím se přidalo 130 ml ethanolu (96% EtOH)

\*\* Před prvním použitím se přidalo 160 ml ethanolu (96% EtOH)

#### 4.5.4 Imunohistochemický průkaz (IHC) exprese PD-L1, MLH-1

Tkáň je nakrájena na řezy o tloušťce cca 4–8 µm na mikrotomu Leica SM 2010R, řezy jsou na vodní hladině napnuty a nanášeny na podložní sklo SuperFrost, kde se nechají zaschnout. Následně je z řezů xylenem odstraněn parafin a řezy jsou zavodněny

v alkoholové řadě. Samotná IHC analýza exprese PD-L1 a MLH-1 je provedena pomocí myších monoklonálních protilátek Anti-PD-L1 antibody (Abcam) a anti-MLH-1 (M1) Primary Antibody (Roche). Jednalo se o robotický přístup na přístroji BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems) Roche. Vyhodnocení je provedeno na světelném mikroskopu Olympus.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Výběr pacientů

Celkem byly odebrány vzorky 10 pacientům, u kterých byl diagnostikován a potvrzen metastatický adenokarcinom žaludku intestinálního typu. Pacienti byli ve věkovém rozmezí 50–60 let, z toho 6 mužů a 4 ženy.

3 z 6 mužů a 2 ze 4 žen byli kuřáci.

Informace o pacientech jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Informace o pacientech

Pacient	Věk 50 - 60	Pohlaví	Lokace	Patologie	Kuřák
1	ano	muž	intestinální typ	adenokarcinom	ne
2	ano	muž	intestinální typ	adenokarcinom	ne
3	ano	muž	intestinální typ	adenokarcinom	ano
4	ano	žena	intestinální typ	adenokarcinom	ne
5	ano	žena	intestinální typ	adenokarcinom	ano
6	ano	žena	intestinální typ	adenokarcinom	ne
7	ano	muž	intestinální typ	adenokarcinom	ne
8	ano	muž	intestinální typ	adenokarcinom	ano
9	ano	muž	intestinální typ	adenokarcinom	ano
10	ano	žena	intestinální typ	adenokarcinom	ano

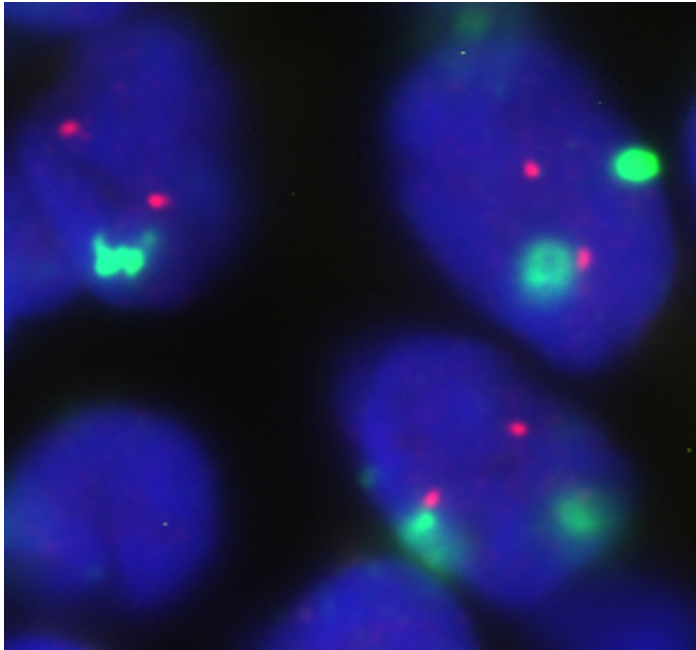
### 5.2 Výsledná izolace DNA

Pro amplifikační analýzu bylo vyizolováno cca 50 µl DNA o požadované čistotě ze všech 10 vzorků.

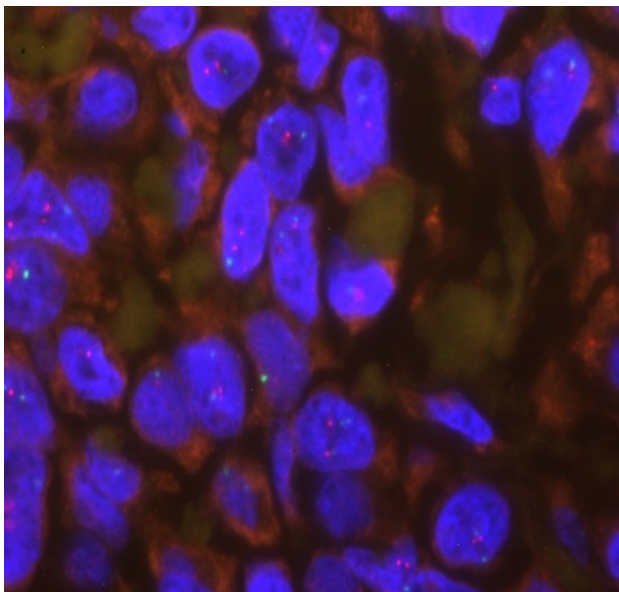
### 5.3 Cytogenetický průkaz numerických změn genu *Her-2/neu* metodou FISH

Byla provedena cytogenetická analýza genu *Her-2/neu*, aby byla vyloučena případná amplifikace tohoto genu. Všichni pacienti byli negativní na amplifikaci genu *Her-2/neu* viz Obrázek 5 a Obrázek 6.

**Obrázek 5:** Cytogenetický průkaz genu *Her-2/neu* ukazuje na normální stav, kdy jsou detekovány 2 lokus specifické signály (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – detail jádra



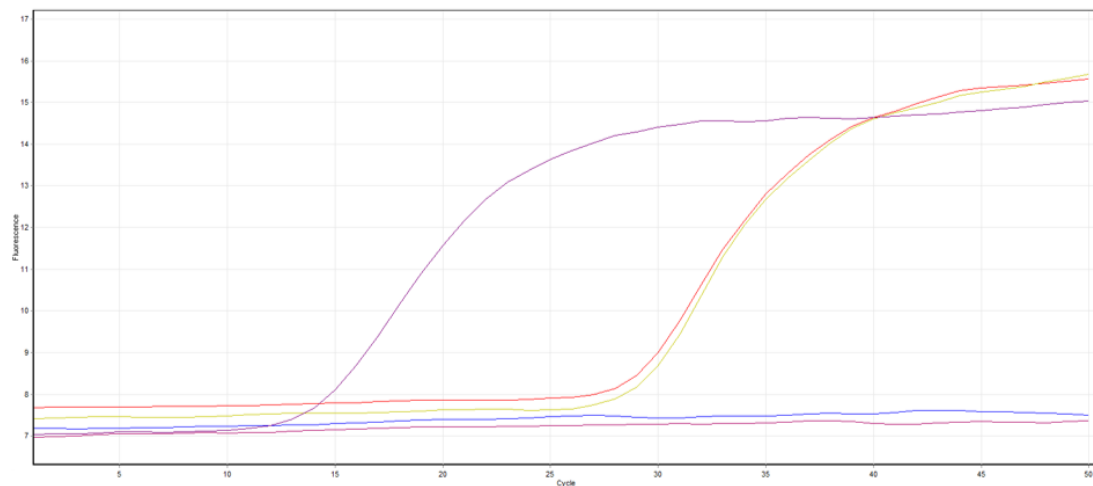
**Obrázek 6:** Cytogenetický průkaz genu *Her-2/neu* ukazuje na normální stav, kdy jsou detekovány 2 lokus specifické signály (červený signál) a 2 centromerické signály (zelený signál) – přehledové zvětšení



## 5.4 Detekce a kvantifikace EBV

Pacienti byli dále testováni na přítomnost potenciální EBV infekce. Z 10 pacientů byly identifikovány 2 případy EBV pozitivivity (20 %) viz Obrázek 7.

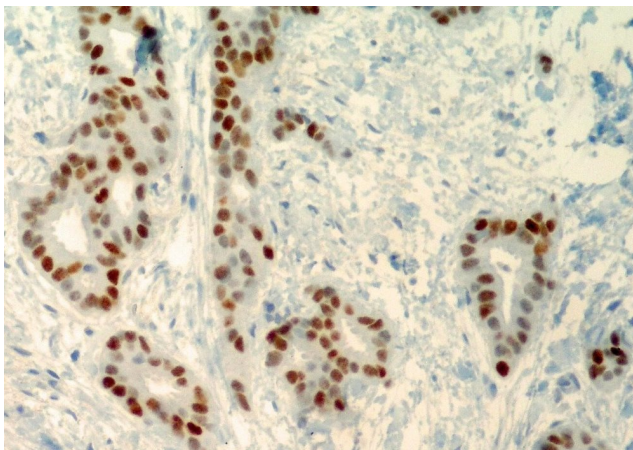
**Obrázek 7:** Výstup z real-time analýzy detekce EBV



## 5.5 Imunohistochemický průkaz (IHC) exprese PD-L1, MLH-1

U 2 pacientů pozitivních na EBV infekci byla potvrzena také exprese PD-L1 a MLH-1. Současně byla u jednoho případu potvrzena mírná exprese PD-L1 a MLH-1 bez přítomnosti infekce EBV (viz Obrázek 8).

**Obrázek 8:** Imunohistochemický průkaz exprese PD-L1





## 5.6 Celkový nále

Výsledek provedených analýz ukázal na incidenci EBV infekce u 20 %, u kterých byla současně potvrzena exprese MLH-1 a PD-L1. Dále byl u jednoho pacienta záchyt pouze mírné exprese PD-L1 a MLH-1 bez přítomné infekce EBV. U tohoto pacienta předpokládáme spornou odezvu na léčbu. Kumulativní výsledky shrnuty v Tabulce 4.

**Tabulka 4:** Souhrn výsledků

Vzorek	EBV	HER-2	PD-L1	MSI	Poznámka
1	neg	neg	neg	neg	
2	neg	neg	neg	neg	
3	neg	neg	neg	neg	
4	neg	neg	neg	neg	
5	<b>POZ</b>	neg	<b>POZ</b>	<b>POZ</b>	
6	neg	neg	neg	neg	
7	<b>POZ</b>	neg	<b>POZ</b>	<b>POZ</b>	
8	neg	neg	<b>POZ</b>	<b>POZ</b>	slabá pozitivita
9	neg	neg	neg	neg	
10	neg	neg	neg	neg	

## 6 DISKUSE

Jedinou potencionálně kurativní léčbu představuje stále chirurgická resekce doplněná chemoterapií/chemoradioterapií. Cílená terapie pomocí monoklonální terapeutické protilátky trastuzumabu bohužel dosud nepřinesla většího posunu, tak jako je tomu například u karcinomu prsu. HER2 testování v případě cílené terapie v současné době představuje základní algoritmus v léčbě nádorového onemocnění prsu, ale také se jedná o potenciální možnost užití biologické léčby u karcinomu žaludku, které má ovšem svá specifika a diagnostická kritéria (Staněk *et al.*, 2014). Receptory velké rodiny HER hrají v případě karcinomu žaludku významnou roli. Z molekulárního hlediska je terapeutickým cílem heterodimerizace HER2 a HER3 receptorů. Dimerizace HER2 s dalšími členy skupiny HER je totiž největším hnacím mechanismem růstu a přežívání nádorových buněk (Staněk *et al.*, 2014). Cílená terapie proti tomuto receptoru je ovšem podmíněna amplifikací genu pro tento receptor *Her-2/neu*, která je ošem v případě metastatického karcinomu velice sporadická a pohybuje se okolo 5–8 % (Uprak TK *et al.*, 2015), což dokazují i naše výsledky, kdy byla amplifikace vyloučena u všech pacientů (0/10).

Velkou nadějí se ovšem jeví imunoterapie pomocí anti-PD-1 monoklonální protilátky pembrolizumabu v případě, že se jedná o nádory s vysokou mikrosatelitovou instabilitou a pozitivitou na virus Epstein-Barrové (EBV). Velké studie ukázaly, že incidence EBV infekce je poměrně vysoká a je detekována cca u 10–20 % karcinomů žaludku (Fukayama M., 2012; Naseem M. *et al.*, 2018). Naše výsledky (2/10 (20%)) ukazují na podobnou incidenci EBV jako tyto studie, nicméně je nutné brát v potaz, že se jednalo o malou kohortu pacientů, kdy se může jednat spíše o náhodu než statistický průkaz. Důležitým aspektem je, že u nádorů žaludku s pozitivitou EBV je popisována nadměrná exprese ligandů programované buněčné smrti PD-L1 (Miliotis *et al.*, 2020). Virus Epstein-Barrové by mohl tedy sloužit jako potenciální biomarker při léčbě rakoviny žaludku pomocí anti PD-L1 terapie.

Pozitivní exprese PD-L1 byla pozorována ve studii Xie *et al.*, 2020 u 7 z 9 pacientů (77,7 %) s diagnostikovaným karcinomem žaludku a pozitivitou na infekci EBV. U námi provedené analýzy byla prokázána pozitivní exprese PD-L1 u 2 z 10 pacientů, což činí 20 %. Příčinou značně rozdílných výsledků mezi studiemi může být velmi malý počet testovaných pacientů. Ve velkých studiích je jasně popisována přítomnost PD-L1 maximálně u 25 % z celkového počtu pacientů s karcinomem žaludku a pozitivitou na EBV (Fukayama M., 2012; Naseem M. *et al.*, 2018). Dalším možným vysvětlením

odlišného pozorování je nejednotná věková kategorie pacientů a zásadní roli hraje i rozdílnosti v testovaných populacích, kdy u asijské populace je karcinom žaludku ve vyšší frekvenci oproti evropské populaci.

Pacienti s onemocněním rakoviny žaludku byli také předmět studie Liu *et al.*, 2020. Z celkového počtu 300 testovaných pacientů byla u 27 pacientů (9 %) prokázána velmi vysoká exprese PD-L1, z toho u 10 pacientů byla zjištěna vysoká MSI a 6 pacientů bylo pozitivních na infekci EBV. Na základě EBV infekce byly u těchto 6 pacientů vysoká MSI a silná exprese PD-L1 a předpokládá se, že tito pacienti budou mít největší prospěch z imunoterapie.

Naše dosažené výsledky ukazují také na provázanost mezi infekcí EBV, mikrosatelitovou instabilitou a expresí PD-L1. Prokázána byla i mírná exprese PD-L1 a MLH-1 nezávisle na EBV infekci. Při naší studii jsme dosáhli podobných výsledků jako předchozí studie z hlediska nálezu mírné/vysoké exprese a exprese související s infekcí EBV, ale incidence jednotlivých markerů nelze srovnávat, protože jsme analýzu dělali na malé kohortě pacientů oproti ostatním výzkumům. Z tohoto důvodu nelze výsledek statisticky vyhodnotit.

## 7 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce jsem se zaměřila na metastazující karcinom žaludku, který patří celosvětově mezi třetí nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění. Jedinou potencionálně kurativní léčbu představuje stále chirurgická resekce doplněná chemoterapií/chemoradioterapií. Cílená terapie pomocí monoklonální terapeutické protilátky trastuzumabu bohužel dosud nepřinesla větší posun, tak jako je tomu například u karcinomu prsu. Důvodem je nízká incidence amplifikace genu Her-2/neu (prediktor pro nasazení cílené léčby) což jsem v naší práci potvrdila. Velkou nadějí se ovšem jeví imunoterapie, pomocí anti-PD-1 monoklonální protilátky pembrolizumabu v případě, že se jedná o nádory s vysokou mikrosatelitovou instabilitou a pozitivitou na virus Epstein-Barrové (EBV). Naše výsledky ukázaly, že incidence EBV infekce je poměrně vysoká a je detekována cca u 20 % karcinomů žaludku. U těchto případů byla současně detekována exprese PD-L1 a MLH-1. Závěrem tedy říci, že cca pětina pacientů by mohla profitovat z anti PDL-1 terapie, což by znamenalo značný posun v léčbě.

## 8 LITERATURA

Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J Gastroenterol*. 2016 May 21;22(19):4619-25.

Amon W, Farrell PJ. Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol*. 2005 May-Jun;15(3):149-56.

Angell HK, Lee J, Kim KM, Kim K, Kim ST, Park SH, Kang WK, Sharpe A, Ogden J, Davenport A, Hodgson DR, Barrett JC, Kilgour E. PD-L1 and immune infiltrates are differentially expressed in distinct subgroups of gastric cancer. *Oncoimmunology*. 2018 Dec 10;8(2):e1544442.

Baker SJ, Reddy EP. Targeted inhibition of kinases in cancer therapy. *Mt Sinai J Med*. 2010 Nov-Dec;77(6):573-86.

Brychtová V, Valík V, Vojtěšek B. Variability in the Solid Cancer Cell Population and Its Consequences for Cancer Diagnostics and Treatment. *Klin Onkol*. 2018 Winter;31(Suppl 2):5-13.

Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 co-stimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007; 27(1): 111–122.

Calderwood MA, Venkatesan K, Xing L, Chase MR, Vazquez A, Holthaus AM, Ewence AE, Li N, Hirozane-Kishikawa T, Hill DE, Vidal M, Kieff E, Johannsen E. Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7606-11.

De Rosa S, Sahnane N, Tibiletti MG, Magnoli F, Vanoli A, *et al*. EBV<sup>+</sup> and MSI Gastric Cancers Harbor High PD-L1/PD-1 Expression and High CD8<sup>+</sup> Intratumoral Lymphocytes. *Cancers (Basel)*. 2018 Apr 1;10(4).

Derks S, Liao X, Chiaravalli AM, Xu X, Camargo MC, Solcia E, Sessa F, Fleitas T, Freeman GJ, Rodig SJ, Rabkin CS, Bass AJ. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. *Oncotarget*. 2016 May 31;7(22):32925-32.

Dunmire SK, Hogquist KA, Balfour HH. Infectious Mononucleosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;390(Pt 1):211-40.

Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K, Palanisamy M. Applications of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012 Aug;4(Suppl 2):S307-9.

DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUDÍK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2021-5-06]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2007 Feb;5(1):7-14.

Fehlings M, Drobbe L, Moos V, Renner Viveros P, *et al.* Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. *Infect Immun.* 2012 Aug;80(8):2724-34.

Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.* 2008 May 1;2008:pdb.prot4986.

Fukayama M. [Epstein-Barr virus and gastric carcinoma]. *Nihon Rinsho.* 2012 Oct;70(10):1715-9.

Gal R, Rath-Wolfson L, Rosenblatt Y, Halpern M, Schwartz A, Koren R. An improved technique for mitosis counting. *Int J Surg Pathol.* 2005 Apr;13(2):161-5.

Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol.* 2008 Sep;19(9):1523-9.

Hammerschmidt W, Sugden B. Replication of Epstein-Barr viral DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jan 1;5(1):a013029.

He L, Long LR, Antani S, Thoma GR. Histology image analysis for carcinoma detection and grading. *Comput Methods Programs Biomed.* 2012 Sep;107(3):538-56.

Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Feb;4(1):135-41.

Hutzinger R, Feederle R, Mrazek J, Schiefermeier N, Balwierz PJ, Zavolan M, Polacek N, Delecluse HJ, Hüttenhofer A. Expression and processing of a small nucleolar RNA from the Epstein-Barr virus genome. *PLoS Pathog.* 2009 Aug;5(8):e1000547.

Chemnitz JM, Parry Rv, Nichols KE *et al.* ShP-1 and ShP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary

human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004; 173(2): 945–954.

Chinai JM, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 2015 Sep;36(9):587-95.

Jabs WJ, Paulsen M, Wagner HJ, Kirchner H, Klüter H. Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) receptor CD21 on peripheral B lymphocytes of long-term EBV- adults. *Clin Exp Immunol.* 1999 Jun;116(3):468-73.

Jang SJ, Gardner JM, Ro JY. Diagnostic approach and prognostic factors of cancers. *Adv Anat Pathol.* 2011 Mar;18(2):165-72.

Kang BW, Chau I. Current status and future potential of predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitors in gastric cancer. *ESMO Open.* 2020 Aug;5(4):e000791.

Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):309-14.

Kempkes B, Robertson ES. Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Curr Opin Virol.* 2015 Oct;14:138-44.

Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, *et al.* Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nature Medicine*; Published online 16 July 2018.

Kushlinskiĭ NE, Nemtsova MV. [Molecular biological characteristics of cancer]. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2014;(1-2):5-15.

Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol.* 2011 Feb;3(1):51-8.

Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Oct;2(10):a003236.

Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int.* 2020 Jan 13;20:16.

Liu X, Choi MG, Kim K, Kim KM, Kim ST, Park SH, Cristescu R, Peter S, Lee J. High PD-L1 expression in gastric cancer (GC) patients and correlation with molecular features. *Pathol Res Pract.* 2020 Apr;216(4):152881.

McKenzie PP, Guichard SM, Middlemas DS, Ashmun RA, Danks MK, Harris LC. Wild-type p53 can induce p21 and apoptosis in neuroblastoma cells but the DNA damage-induced G1 checkpoint function is attenuated. *Clin Cancer Res.* 1999 Dec;5(12):4199-207.

Melichar B, Nash MA, Lenzi R et al. Expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 119(1): 19–27.

Miliotis CN, Slack FJ. Multi-layered control of PD-L1 expression in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *J Cancer Metastasis Treat* 2020;6:13.

Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, et al. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018 May;66:15-22.

Nowak MA, Michor F, Iwasa Y. Genetic instability and clonal expansion. *J Theor Biol.* 2006 Jul 7;241(1):26-32.

Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jan;24(1):193-209.

Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer.* 2008 May;44(7):946-53.

Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget.* 2017 Oct 31;8(62):106132-106142.

Puliga E, Corso S, Pietrantonio F, Giordano S. Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows. *Cancer Treat Rev.* 2021 Apr;95:102175.

Roberts ML, Luxembourg AT, Cooper NR. Epstein-Barr virus binding to CD21, the virus receptor, activates resting B cells via an intracellular pathway that is linked to B cell infection. *J Gen Virol.* 1996 Dec;77 ( Pt 12):3077-85.

Rodriquenz MG, Roviello G, D'Angelo A, Lavacchi D, Roviello F, Polom K. MSI and EBV Positive Gastric Cancer's Subgroups and Their Link With Novel Immunotherapy. *J Clin Med.* 2020 May 11;9(5):1427.



- Ronen A, Glickman BW. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen.* 2001;37(3):241-83.
- Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. 2021 Feb 23. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 31985980.
- Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. 2021 Feb 23. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 31985980.
- Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, Sahebkar A. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol.* 2019 Aug;234(10):16824-16837.
- Samowitz WS, Broaddus R, Iacopetta B, Goldblatt J. PCR versus immunohistochemistry for microsatellite instability. *J Mol Diagn.* 2008 Mar;10(2):181-2; author reply 181.
- Sasaki S, Nishikawa J, Sakai K, Iizasa H, Yoshiyama H, *et al.* EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions. *Gastric Cancer.* 2018 Sep 28.
- Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 2007 Dec;13(12):527-34.
- Singer M, Anderson AC. Revolutionizing Cancer Immunology: The Power of Next-Generation Sequencing Technologies. *Cancer Immunol Res.* 2019 Feb;7(2):168-173.
- Slaoui M, Bauchet AL, Fiette L. Tissue Sampling and Processing for Histopathology Evaluation. *Methods Mol Biol.* 2017;1641:101-114.
- Sokolenko AP, Imyanitov EN. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Front Mol Biosci.* 2018 Aug 27;5:76.
- Staněk L, Rozkoš T, Laco J, *et al.* Comparison of immunohistochemistry, four in situ hybridization methods and quantitative polymerase chain reaction for the molecular diagnosis of HER2 status in gastric cancer: a study of 55 cases. *Mol Med Rep.* 2014 Nov;10(5)
- Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG. Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Res.* 2016 Nov;36(11):5593-5606.
- Šťastný M, Říhová B. Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 4S28–4S37.

- Tanaka H, Tamura T, Okita Y, Yoshii M, Tokumoto M, *et al.* [Significance of Immune-Cell Infiltration in Gastric]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2018 Feb;45(2):217-221.
- Torry DS, Cooper GM. Proto-oncogenes in development and cancer. *Am J Reprod Immunol*. 1991 Apr;25(3):129-32.
- Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*. 1998 Nov;3(11):697-707.
- Uprak TK, Attaallah W, Çelikel ÇA, *etal.* HER-2 incidence in gastric cancer, its association with prognosis and clinicopathological parameters. *Ulus Cerrahi Derg*. 2015 Aug 18;31(4):207-13.
- Voigt M, Braig F, Göthel M, Schulte A, Lamszus K, Bokemeyer C, Binder M. Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab. *Neoplasia*. 2012 Nov;14(11):1023-31.
- Xie T, Liu Y, Zhang Z, Zhang X, Gong J, Qi C, Li J, Shen L, Peng Z. Positive Status of Epstein-Barr Virus as a Biomarker for Gastric Cancer Immunotherapy: A Prospective Observational Study. *J Immunother*. 2020 May;43(4):139-144.
- Xu HY, Yang YL, Guan XL, Song G, Jiang AM, Shi LJ. Expression of regulating apoptosis gene and apoptosis index in primary liver cancer. *World J Gastroenterol*. 2000 Oct;6(5):721-724.
- Zabierowski SE, Herlyn M. Embryonic stem cells as a model for studying melanocyte development. *Methods Mol Biol*. 2010;584:301-16.
- Zanella MC, Cordey S, Kaiser L. Beyond Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus: a Review of Viruses Composing the Blood Virome of Solid Organ Transplant and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Microbiol Rev*. 2020 Aug 26;33(4):e00027-20.
- Zatloukalová P, Pjechová M, Babčanová S, Hupp TR, Vojtěšek B. Úloha PD-1/PD-L1 signalizace v protinádorové imunitní odpovědi [The Role of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Antitumor Immune Response]. *Klin Onkol*. 2016 Fall;29 Suppl 4(Suppl 4):72-77.
- Zavala-Vega S, Palma-Lara I, Ortega-Soto E, Trejo-Solis C, de Arellano IT, Ucharima-Corona LE, Garcia-Chacón G, Ochoa SA, Xicohtencatl-Cortes J, Cruz-Córdova A, Luna-Pineda VM, Jiménez-Hernández E, Vázquez-Meraz E, Mejía-Aranguré JM, Guzmán-

Bucio S, Rembao-Bojorquez D, Sánchez-Gómez C, Salazar-Garcia M, Arellano-Galindo J. Role of Epstein-Barr Virus in Glioblastoma. *Crit Rev Oncog*. 2019;24(4):307-338.

Zhang JY, Yan YY, Li JJ, Adhikari R, Fu LW. PD-1/PD-L1 Based Combinational Cancer Therapy: Icing on the Cake. *Front Pharmacol*. 2020 May 15;11:722.

Ziv E, Durack JC, Solomon SB. The Importance of Biopsy in the Era of Molecular Medicine. *Cancer J*. 2016 Nov/Dec;22(6):418-422.