

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Lékařská fakulta**

**MECHANIZMY NAVOZENÉ IMUNOTOLERANCE  
NÁDOROVÝCH BUNĚK CESTOU DRÁHY  
PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI U CHRONICKÉ  
LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE A MOŽNOSTI JEJICH  
DETEKCE METODAMI PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE**

**Dizertační práce**

**RNDr. MARTIN NOVÁK**

**Olomouc 2015**

**Jméno a příjmení autora:** RNDr. Martin Novák

**Název disertační práce:** Mechanizmy navozené imunotolerance nádorových buněk cestou dráhy programované buněčné smrti u chronické lymfocytární leukémie a možnosti jejich detekce metodami průtokové cytometrie.

**Doktorský studijní program:** Onkologie

**Pracoviště:** Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a Fakultní nemocnice Olomouc

**Školitel:** prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.

**Rok obhajoby disertační práce:** 2015

**Abstrakt:** Dráha programované buněčné smrti se významně podílí na navození funkční inaktivity cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u chronických a virových infekcí a je jedním z mechanismů umožňujících únik nádorových buněk imunitnímu dozoru. Interakce receptoru PD-1 se svými ligandy potlačuje protinádorovou aktivitu T-lymfocytů a stimuluje populaci T-regulačních lymfocytů (Tregs). Cílem práce bylo porovnat expresi PD-1 mezi nemocnými s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a zdravými dárci krve a u nemocných s CLL analyzovat vztahy mezi expresí PD-1 na efektorových T-lymfocytech, fází onemocnění, stadiem dle Bineta, dalšími exprimovanými antigeny a prognostickými faktory. V rámci výzkumu byla metodami průtokové cytometrie analyzována periferní krev doposud neléčených nemocných s CLL, pacientů s relabovaným/refrakterním onemocněním a zdravých dárců krve. Exprese znaku PD-1 na CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech z periferní krve u nemocných s CLL se významně odlišovala od kohorty zdravých dárců krve. Nejvyšší počty jak CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> tak CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> subpopulací byly zjištěny u nemocných s relabovaným/refrakterním onemocněním, rozdíl však nebyl statisticky významný. Ve srovnání jednotlivých stádií dle Bineta nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly, stejně jako u ostatních standardně udávaných prognostických faktorů u CLL, kromě mutačního stavu IGVH, kde byla zjištěna statistická závislost mezi expresí PD-1 a přítomností mutovaného stavu IGVH. Zdá se tedy, že nádorový klon může cestou dráhy PD-1/PD-L1 ovlivňovat stav protinádorové imunitní odpovědi a marker PD-1 je možno u CLL považovat za znak systémové imunitní dysregulace ve vztahu ke zdravým jedincům. Na základě získaných výsledků nelze kvantifikovat postžení mechanismů protinádorové imunity u CLL, nicméně výsledky opravňují k provedení dalších studií, nejlépe prospektivního charakteru, se sledováním odezvy na léčbu u větších souborů.

**Klíčová slova:** průtoková cytometrie, chronická lymfocytární leukémie, regulace imunity, dráha programované buněčné smrti.

Dizertační práce byla částečně zpracována v rámci řešení grantového úkolu IGA-LF-2014-001.

**Author's first name and surname:** RNDr. Martin Novák

**Title of the doctoral thesis:** Mechanisms of induced immune tolerance of tumor cells via programmed cell death pathway in chronic lymphocytic leukemia and possibilities of their detection by flow cytometry.

**Doctoral study programme:** Oncology

**Department:** Dpt. of Hemato-oncology, Palacký University and Univerzity Hospital of Olomouc

**Supervisor:** prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.

**The year of presentation:** 2015

**Abstract:** Programmed cell death pathway is involved in the functional impairment of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in chronic viral infection and in mechanisms of tumor immune evasion. The interaction of PD-1 with its ligands suppresses antitumor T cell function and stimulates the regulatory T cell population. The objectives were to compare PD-1 expression between patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and healthy volunteers and to analyze expression of PD-1 on peripheral T cells in disease phases, Binet stages and other antigens and prognostic factors in patients with CLL. The study analyzed peripheral blood from previously untreated patients with CLL, patients with relapsed/refractory disease under treatment and healthy blood donors using flow cytometry. PD-1 expression in peripheral blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells was markedly different between patients with CLL and healthy subjects. The highest numbers of both CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> cells were found in patients with relapsed/refractory disease, but the difference was not significant. No significant differences were found with respect to Binet stages or the other standard prognostic factors in CLL; the only exception was IGVH mutational status where a statistical correlation was found between the expression of PD-1 and the presence of a mutated form of the IGVH gene. These facts support the hypothesis that tumor clones may influence the anti-tumor response through the PD-1/PD-1L pathway and PD-1 seems to be an important marker of systemic immune dysregulation between the healthy population and patients with CLL.

The obtained results do not allow to quantify disability mechanisms of anti-tumor immunity in CLL. However, the results warrant further studies, preferably of prospective character to monitor response to treatment in larger groups of patients.

**Keywords:** flow cytometry, chronic lymphocytic leukemia, immunity regulation, programmed cell death pathway

Doctoral thesis was partially supported by grant IGA-LF-2014-001

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně pod vedením školitele prof. MUDr. Edgara Fabera, CSc., s konzultacemi MUDr. Víta Procházky, Ph.D., uvedl všechny použité literární a odborné zdroje a dodržoval zásady vědecké etiky.

Souhlasím, aby má disertační práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována podle platných norem.

V Olomouci dne 24. dubna 2015

.....  
*Martin Novák*

podpis

Děkuji svému školiteli, prof. MUDr. Edgaru FABEROVI, CSc., za pomoc, připomínky a cenné rady, které mi poskytoval po celou dobu mého studia. Velký dík zasluží MUDr. Vít PROCHÁZKA, Ph.D., za neocenitelné informace o tom, „*jak se má dělat věda*“ a za zprostředkování vhledu do problematiky klinické hematoonkologie. Tato práce by nemohla vzniknout bez podpory přednostů Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, prof. MUDr. Karla INDRÁKA, DrSc. a prof. MUDr. Tomáše PAPAJÍKA, CSc., ani bez nezištné spolupráce lékařů, bioanalytiků, sester a laborantek kliniky. Za pomoc s letitými pravidly typografie si zasluží dík Fraňo *Sabbath* Travěvec. S vděčností za trpělivost a všemožnou podporu děkuji své manželce Jitce.

1. Seznam zkratk	8
2. Úvod	11
3. Chronická lymfocytární leukémie (CLL)	13
3.1. Obecná charakteristika onemocnění	13
3.2. Biologická charakteristika	14
3.2.1. Biologická podstata onemocnění	14
3.2.2. Imunofenotypový profil	14
3.2.3. Základy molekulární biologie a genetiky CLL	15
3.2.4. Apoptóza	17
3.3. Klinická a laboratorní diagnostika a stážování	18
3.4. Terapie	20
3.4.1. Indikace terapie u CLL	20
3.4.2. Současné léčebné postupy	21
3.4.3. Nové terapeutické směry	21
3.5. Mechanizmy alterace imunity	23
3.5.1. Nádorem indukované funkční defekty T-lymfocytů	23
3.5.2. T-regulační lymfocyty a ovlivnění imunitní odpovědi	24
3.5.3. Inhibice cytotoxických T-lymfocytů cestou dráhy PD-1/PD-L1	26
3.5.4. MHC a únik leukemických buněk před imunitní odpovědí	27
3.5.5. Biologické podklady regulace imunitní odpovědi u CLL	27
3.5.6. Dráha PD-1/PD-L u CLL - souhrn	28
4. Průtoková cytometrie	31
4.1. Úvod to problematiky	31
4.2. Základy průtokové cytometrie	32
4.2.1. Obecné principy	32
4.2.2. Konstrukční celky	32
4.2.3. Fluorescence	38
4.2.4. Interakce záření a analytu	39
4.2.5. Protilátky	42

4.3. Využití .....	43
4.3.1. Biomedicínské vědy .....	43
4.3.2. Aplikace v hematookologii .....	44
5. Pracovní hypotézy a cíle disertační práce .....	47
5.1 Pracovní hypotézy .....	47
5.2 Cíle disertační práce .....	48
6. Nemocní a metody .....	49
6.1 Soubor nemocných .....	49
6.2 Použité metody .....	51
6.2.1. Multiparametrická průtoková cytometrie .....	51
6.2.2. Kontrola kvality, nejistota měření .....	51
6.2.3. Statistická analýza .....	52
7. Výsledky .....	53
7.1. Zastoupení subpopulace CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> dle fáze onemocnění .....	53
7.2. Zastoupení subpopulace CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> dle fáze onemocnění .....	56
7.3. Subpopulace CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> dle Binetova stádia .....	59
7.4. Subpopulace CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> dle Binetova stádia .....	60
7.5. Korelace prognostických znaků a PD-1 na CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> a CD8 <sup>+</sup> PD-1 .....	61
8. Vyhodnocení cílů dizertační práce .....	63
9. Diskuze .....	67
10. Závěr .....	75
11. Literatura .....	77
12. Přehled obrázků .....	91
13. Přehled tabulek .....	92
14. Publikační činnost autora .....	93

## 1. Seznam zkratek

ADC	Analog-to-Digital Convertor
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
AML1/Runx1	Acute myeloid leukemia 1/Runt-related transcription factor 1
APC	Allophycocyanin
BCL-1	B-cell lymphoma 1
bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	B-cell receptor
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
BP	Band pass filtr
BTK	Brutonova tyrosin kináza
CARs	Chimeric antigen receptors
CD	Cluster Designation
CIITA	Class II, Major Histocompatibility Complex, Transactivator
CLL	Chronická lymfocytární leukemie
CMV	Cytomegalovirus
c-Myc	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
COP	Cyklofosfamid, vincristin, prednison, léčebný režim
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-lymfom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EHK	Externí hodnocení kvality
Fas-1	Fasciclin-like 1
FBXW7	F-Box And WD Repeat Domain Containing 7
FCR	Fludarabin, cyklofosfamid, rituximab, léčebný režim
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
FITC	Fluorescein isothiokyanát
Fos	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog-
FoxP3	Forkhead box P3
FRET	Förster (fluorescence) resonant energy transfer
FSC	Forward Scatter



GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPIO	General Purpose In/Out
HCDM	Human Cell Differentiation Molecules
HLDA	Human Leucocyte Differentiation Antigens
CHOP	Cyklofosamid, adriamycin, vinkristin, prednison, léčebný režim
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGVH	Variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů
IL	Interleukin
IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
JAK2	Janusova kinázy 2
LDT	Lymphocyte doubling time
LP	Long pass filtry
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
MDR	Multidrug resistance
MHC II	Hlavní histokompatibilní komplex II. třídy
NCI-WG	National Cancer Institute Sponsored Working Group
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NFATC2	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer cells
PD-1	Programmed death -1 receptor
PD-L1	Programmed death ligand-1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
POT1	Protection of Telomeres 1
PRAD1	Parathyroid adenoma 1
RNA	Ribonukleová kyselina
SEKK	Systém externí kontroly kvality
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1
SP	Short pass filtry
SSC	Side Scatter

STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
TCM	T central memory
TEM	T effector memory
TEMRA	T effector memory CD45RA+)
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha ( $\alpha$ )
TP53	Gen kódující protein p53
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAIL 1	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	T-regulačních lymfocytů
UV	Ultra violet
W	Watt
XPO1	Exportin 1
YAG	Yttrium aluminium garnet
ZAP 70	Zeta-asociovaný protein o 70 kDa

## 2. Úvod

Výzkum vztahů mezi nádorem a hostitelským prostředím, zprostředkovaný imunokompetentními subpopulacemi, je jedním z ústředních témat současné hematologické a onkologické. Původní „tumorcentrický“ model, ve kterém je výsledek interakce určován téměř výhradně charakteristikami nádorové tkáně, v současné době ustupuje novému pojetí, které zohledňuje výrazný podíl imunitní komponenty hostitele v oblastech geneze nádoru, jeho růstu, prognózy a reakce na terapeutické postupy, zejména na biologickou léčbu na bázi imunoterapie.

Typickým příkladem se jeví chronická lymfocytární leukémie (CLL), která je nejčastější leukémií západní polokoule. Je charakteristická klonální proliferací nádorově transformovaných antigenně stimulovaných zralých B-lymfocytů s typickým imunofenotypem  $CD5^+CD19^+CD20^+CD22^+CD23^+$  a jejich následnou kumulací v periferní krvi a kostní dřeni, případně ve slezině a lymfatických uzlinách.

Biologicky i prognosticky se CLL dělí na dvě podskupiny dle diferenciačního stádia maligního B-lymfocytu [1]. Ukazuje se, že životaschopnost maligní populace z velké části závisí na mikroprostředí nádoru, tedy na působcích komplexu celulární komponenty, nezbytných pro přežití nádorových buněk [2]. Pronádorově se rovněž uplatňuje dráha B-buněčného receptoru (B-cell receptor, BCR), která cestou aktivace transkripčních faktorů podporuje přežití maligní populace [3, 4, 5]. Recentní literatura také naznačuje, že se u CLL může uplatňovat autonomní signalizace BCR nezávislá na antigenní stimulaci [6]. Lepší přežívání maligních B-lymfocytů rovněž vyplývá z jejich zvýšené odolnosti vůči apoptóze [7, 8]. Imunitní mechanismy, které se podílejí na proliferaci patologického klonu u CLL lze schematicky rozdělit podle místa působení na mechanismy vázané na BCR receptor, T-regulační lymfocyty (Tregs), stimulaci dráhy programované buněčné smrti cytotoxických T-lymfocytů a pravděpodobně i NK buněk, funkční defekty pomocných T-lymfocytů indukované nádorem a konečně mechanismy vázané na MHC. Dopadem jejich společného působení je alterace imunity jako celku, tedy nejen navození imunitní tolerance nádorové tkáně, ale i poškození mechanismů imunitní odpovědi proti mikrobiálním patogenům, které jsou pak zodpovědné za podstatnou část mortality nemocných s CLL v důsledku převážně oportunních infekcí [9].

Jednu z klíčových rolí zde pravděpodobně hraje interakce receptoru PD-1 (Programmed Death-1) se svými ligandy PD-L1 a PD-L2, která způsobuje trvalou aktivaci signální dráhy programované buněčné smrti. Tímto mechanismem je inhibována fyziologická aktivita efektorových T-lymfocytů, které se spolu s dalšími mechanismy významně podílejí na procesu navození imunitní tolerance nádoru [10].

Expres markerů dráhy programované buněčné smrti je v současné době studována u mnoha maligních onemocnění, neboť se jeví jako vhodný cíl pro biologickou léčbu.

V nedávné době byly publikovány první výsledky klinických studií s využitím monoklonálních protilátek zaměřených proti receptoru PD-1 u solidních tumorů, které přinášejí velmi povzbudivé výsledky [11, 12, 13, 14]. Předpokládáme, že ve světle těchto experimentů pomůže analýza exprese markerů programované buněčné smrti u chronické lymfocytární leukémie osvětlit mechanismy vzniku nádorové tolerance a alterace imunity jako celku, což má u tohoto onemocnění významné klinické konsekvence.

### **3. Chronická lymfocytární leukémie (CLL)**

#### **3.1. Obecná charakteristika onemocnění**

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější formou leukémie na západní polokouli a nejčastější hematologickou malignitou dospělých. Celosvětová incidence se udává mezi 1-5,5 nemocnými na 100 000 obyvatel [15], přičemž existuje výrazný rozdíl v incidenci mezi východní a západní polokoulí [16].

Jedná se o velmi heterogenní lymfoproliferativní onemocnění charakteristické klonální proliferací nádorově transformovaných antigenně stimulovaných zralých B-lymfocytů s typickým imunofenotypem a jejich následnou kumulací v periferní krvi a kostní dřeni, případně ve slezině a lymfatických uzlinách [17].

Medián věku nemocných je udáván mezi 65-72 lety, přibližně třetina pacientů bývá v době diagnózy mladší 55 let [15]. Muži jsou postiženi častěji než ženy, a to v poměru 2:1 [18]. Pro nemocné je typická lymfocytóza přesahující  $10 \cdot 10^9/l$ , někdy až  $100 \cdot 10^9/l$  [19].

Diagnostická kritéria CLL dle National Cancer Institute Sponsored Working Group (NCI-WG) zahrnují absolutní lymfocytózu s přítomností více než  $5 \cdot 10^9/l$  klonálních B-lymfocytů v periferní krvi trvající nejméně 3 měsíce, nález malých zralých lymfocytů při cytologickém vyšetření periferní krve s více než 55 % atypických buněk a prolymfocytů a typický imunofenotyp  $CD19^+CD20^+CD22^-CD23^+CD5^+$  [20]. U většiny nemocných je diagnóza stanovena na základě náhodného záchytu lymfocytózy v periferní krvi v období bez příznaků onemocnění.

Morfologicky se jedná o populaci atypických lymfocytů uniformního vzhledu, s kulatým či oválným jádrem, kondenzovaným chromatinem a úzkým lemem slabě bazofilní, většinou agranulární cytoplazmy. Jadérka nebývají patrná. Patologické lymfocyty jsou velmi křehké, což se v nátěru periferní krve projevuje přítomností tzv. Gumprechtových stínů [17].

## **3.2. Biologická charakteristika**

### **3.2.1. Biologická podstata onemocnění**

V klinické praxi se CLL dělí do dvou prognosticky odlišných jednotek dle stupně aktivace B-lymfocyty. Mutační analýzou variabilní části imunoglobulinového řetězce (IGVH) lze rozlišit přítomnost nebo nepřítomnost mutace IGVH genu, kdy CLL s mutovanou formou IGVH genu vzniká klonální proliferací postgerminálního paměťového B-lymfocyty, zatímco CLL s nemutovaným IGVH genem je onemocněním pregerminálního nebo aktivovaného B-lymfocyty, který neprošel změnami v germinálním centru [21]. Rozdíly nalézáme i v expresi markeru CD38 [22], přítomnosti zeta-asociovaného proteinu ZAP-70 [24], i v genových profilech získaných při sekvenačních experimentech [25].

Oba subtypy jsou schopny manipulovat mechanismy buněčné signalizace a vrozené i adaptivní imunity hostitele a unikat tak zničení obrannými mechanismy [26].

### **3.2.2. Imunofenotypový profil**

Klíčovou roli v diagnostice hraje imunofenotypizace periferní krve metodami průtokové cytometrie [20]. Stabilní imunofenotyp  $CD5^+CD19^+CD20^+CD22^-CD23^+$  je charakteristický slabou expresí pan B-lymfocytárních antigenů (CD19, CD20, CD79), nízká je rovněž exprese povrchových lehkých i těžkých řetězců imunoglobulinů [27]. Pozitivitu rovněž vykazuje znak CD200, který je využíván v diferenciální diagnostice B-lymfoproliferací, zejména k odlišení lymfomu z plášťových buněk (MCL) [28], a dále CD43 a bcl-2. U dalších markerů (CD25, CD38, CD11c, ZAP-70) je exprese variabilní, v případě CD38 a ZAP-70 koreluje jejich vyšší exprese s nepříznivou prognózou [29, 30]. Znaky CD10, FMC7, CD103 a cyklin D1 bývají negativní [31]. Imunofenotyp se během klonální evoluce může měnit, zejména v případě transformace onemocnění do agresivnější formy, častá je ztráta markeru CD5 u Richterova syndromu [32]. Součástí analytických protokolů je rovněž analýza exprese markerů užívaných jako cíle biologické léčby, CD20 a CD52, která slouží jako vazebná místa pro monoklonální protilátky anti-CD20 (rituximab) [33] a anti-CD52 (alemtuzumab) [34].

Marker	Struktura	[kDa]	Funkce
CD5	Transmembránový glykoprotein	67	CD72 ligand
CD10	Integrální membránový protein	100	Neutrální endopeptidáza
CD11c	Transmembránový glykoprotein	150	Integrin- $\alpha$ X podjednotka
CD19	Membránový glykoprotein	95	Regulace, aktivace a diferenciacie B-lymfocytů
CD20	Membránový protein, izoformy	33-37	Regulace, aktivace a diferenciacie B-lymfocytů
CD21	Transmembránový glykoprotein	145	C3d receptor, EBV receptor, aktivace a proliferace B-lymfocytů
CD22	Transmembránový glykoprotein, izoformy	130 a 140	Aktivace a diferenciacie-lymfocytů, ztráta po aktivaci B-lymfocytů před stádiem plazmocyty
CD23	Transmembránový glykoprotein	45	asociace s MHC II. třídy Nízkoafinitní receptor pro IgE
CD25	Glykoprotein	55	Receptor pro IL-2
CD38	Integrální membránový glykoprotein	45	Enzym (NAD-glykohydroláza, ADP-ribozylcykláza, cyklická ADP-ribózo-hydroláza)
CD40	Glykozylovaný fosfoprotein	44-48	Receptor pro TNF
CD79a/C D79b	Glykoprotein	33-45	asociace se SmIg. Struktura BCR komplexu
CD103	Dvouřetězcový heterodimer	25 a 150	Integrin- $\alpha$ E podjednotka
CD138	Transmembránový heparan-sulfát-proteoglykan (Syndecan-1)		Adhezivní molekula
CD200	Glykoprotein	41-47	Regulační molekula
FMC7	Glykoprotein	105	Regulace, aktivace a diferenciacie B-lymfocytů
ZAP-70	TCR-zeta asociovaný protein	70	Proteinová tyrozinkináza

Tab. č. 1. Přehled nejdůležitějších diferenciací diagnostických B-markerů [35]

### 3.2.3. Základy molekulární biologie a genetiky CLL

U velké části nemocných je možno pomocí interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) identifikovat chromozomální abnormality typu translokací, delecí či triploidie [36], přičemž další klonální evoluce se objevuje u více než 25% nemocných [37]. Nejčastěji popisovanou změnou bývá delece zasahující lokus 13q14, popisovaná ve více než 50% případů, která postihuje několik genů v tomto regionu [38]. Delece genů pro specifické mikro-RNA, které jsou součástí deletovaných dlouhých ramen chromozomu 13, zvyšují odolnost vůči apoptóze a umožňuje lepší přežívání maligních B-lymfocytů [7, 8].

Přibližně 20 % pacientů bývá postiženo delecí v oblasti dlouhého ramene chromozomu 11, typicky v oblasti 11q22.3-q23.1. Nemocní s delecí v oblasti 11q bývají mladšího věku a v typickém případě se jedná o agresivnější formy onemocnění [39], odlišitelné i dle vyšší exprese markerů CD38, FMC-7, CD25 a exprese povrchových imunoglobulinů [40].

Trizomie chromozomu 12 bývá rovněž prokazována u přibližně 20% nemocných, ať již jako jediná genetická změna nebo v kombinaci s dalším postižením [41]. CLL s přítomností trizomie chromozomu 12 vykazují vyšší úroveň exprese znaků CD19, CD20, CD22, CD24, CD27, CD25, CD79b, CD38 a povrchových imunoglobulinů, nižší míru exprese CD43 a vyšší frekvenci výskytu DNA aneuploidie [40, 42].

Častěji je rovněž asociována s progresí onemocnění [43] a s transformací do Richtera syndromu [44].

Postižení chromozomu 6 se nejčastěji týká delecí v oblasti 6q23, ale vyskytují se i delece v oblastech 6q25-27 a 6q21 [45]. Tyto změny jsou asociovány s vyšším zastoupením prolymfocytů v periferní krvi, agresivnějším průběhem onemocnění a vyšším stupněm exprese znaku CD38 [46].

U přibližně 10% nemocných lze identifikovat delece postihující oblast 17p13.1 na krátkém rameni chromozomu 17 [47]. Deletovaná oblast nese gen TP53, který je jedním z klíčových tumor supresorových genů a jeho ztráta či mutace je spojena se špatnou prognózou, horším celkovým přežitím a odpovědí na terapii [48, 49].

Delece 17p je považována za marker ovlivňující výběr terapie u nemocných s CLL a u mladších osob může být její přítomnost důvodem alogenní transplantace již v první či druhé remisi [50,51].

Na chromozomu 14 se u nemocných s CLL setkáváme s inverzemi a translokacemi, postihujícími zejména oblast 14q32, kde se nalézají geny pro těžké řetězce imunoglobulinů [52], a oblast 14q11.2 s geny kódujícími  $\alpha$ - a  $\delta$ -řetězce T-buněčného receptoru [53].

Translokace (11;14) (q13;q32), zaměňující geny pro těžké řetězce imunoglobulinů za protoonkogen BCL-1, vede k deregulaci protoonkogenu PRAD1 kódujícího syntézu cyklinu D1 [54]. Tato translokace je u CLL vzácná, typicky se s ní setkáváme u lymfomu z pláštěvých buněk, kde deregulovaná syntéza cyklinu D1 přispívá k maligní transformaci postižené buňky [55]. Translokace (14;18), zaměňující geny pro těžké řetězce imunoglobulinů za BCL-2, typická pro folikulární lymfom, je u CLL zřídka [56], a jen raritně je popisována translokace t(14;19)(q32;q13.1) [57].

U 5 % pacientů jsou na chromozomu 18 detekovatelné přestavby v oblasti 18q21, [58] postihující 5' konec BCL-2 genu a ovlivňující geny pro  $\kappa$ - a  $\lambda$ - řetězce imunoglobulinů [59].

V současné době probíhá výzkum dalších genů, hrajících významnou roli v patogenezi a prognóze CLL. Jedná se zejména o NOTCH1, BIRC3, SF3B1, XPO1, POT1, FBXW7, jež se ukazují být významnými ukazateli nepříznivé prognózy [60, 61].



### 3.2.4. Apoptóza

Jednou z podmínek nádorového růstu je schopnost maligního klonu unikat apoptóze.

U CLL se uplatňuje několik mechanismů, k nejčastějším patří zvýšená exprese anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2, (Mcl-1 a Bcl-2), popisovaná u více než 80 % nemocných [62]. Tyto proteiny blokují apoptózu ovlivněním membránového potenciálu mitochondrií, hladiny vnitrobuněčných  $Ca^{2+}$  iontů, inhibicí proapoptotického proteinu BAX, kaspázové signalizace, atd. [63, 64, 65, 66]. Dalším mechanismem je narušení vnitřní i vnější cesty apoptózy.

Vnitřní cesta je charakterizována především aktivací signální dráhy proteinu p53, která za fyziologických podmínek brzdí buněčné dělení cestou blokování cyklin dependentní kinázy a produkcí proteinů podílejících se na oxidativním stresu. Dráha p53 bývá narušena delecí 17p13 nebo mutací TP53, což je asociováno s nejkratším celkovým přežitím nemocných [49].

Vnější cesta apoptózy, tedy signální dráhy receptorů smrti Apo/Fas-1, TRAIL 1 a 2, spojená s kaskádovou aktivací kaspáz vede ke změnám permeability mitochondriálních membrán vedoucím k uvolnění proapoptických působků a vedoucím k plánované buněčné smrti [67]. U nemocných CLL není tato cesta funkční z důvodu rezistence maligních buněk vůči Fas a TRAIL indukované apoptóze [68].

Antiapoptoticky dále působí deregulace signální dráhy TNF- $\alpha$  [69] a dráhy NF- $\kappa$ B [70]. Aktivace dráhy NF- $\kappa$ B je však podmíněna přítomností TNF- $\alpha$ , [71] kdy vazba TNF- $\alpha$  aktivuje proteiny TRAF, indukující fosforylaci inhibitoru I $\kappa$ B. V následném kroku dochází k aktivaci NF- $\kappa$ B a produkci antiapoptotických působků [72].

Paradoxem je, že ačkoliv jsou buňky CLL v *in vitro* kultuře velmi citlivé vůči apoptóze, *in vivo* jsou značně rezistentní. Ukázalo se, že klíčovou roli v přežívání maligní populace hraje mikroprostředí kostní dřeně a lymfatických uzlin, především komplex T-lymfocytů, endotelových buněk a stromálních podpůrných buněk, tzv. nurse-like cells [73, 74].

Důležitým prvkem je zde integrin CD49d exprimovaný na maligní populaci, který umožňuje migraci buněk CLL do lymfoidních tkání a interakci patologických buněk se stromálními buňkami, což má protektivní antiapoptotický efekt [75].

Role mikroprostředí v přežívání maligní populace a jejího úniku před imunitními mechanismy hostitele je jedním ze zásadních nových paradigmat dnešní nádorové biologie. Působení na mikroprostředí nádoru se ukazuje být jednou z nových léčebných modalit, v současné době je v rámci klinických studií testována terapeutická protilátka proti výše zmíněnému CD49d, natalizumab [76].

### 3.3. Klinická a laboratorní diagnostika a stážování

Pro diferenciální diagnostiku metodami průtokové cytometrie je zásadní skóre dle Matutes, který umožňuje odlišení CLL od ostatních B lymfoproliferativních onemocnění [77]. Skóre odráží expresi markerů CD23, CD5, FMC-7, CD79b a povrchových imunoglobulinů, přičemž u jednotlivých znaků nabývá hodnot 0 a 1. Součet  $\geq 4$  svědčí pro diagnózu CLL, hodnota  $\leq 3$  ukazuje na jiný typ B-lymfoproliferace a na nezbytnost další diagnostiky.

V roce 1997 byla publikována modifikace původního Matutes skóre, která nahradila znak CD22 markerem CD79b [78]. Viz Tab. č. 2.

Povrchový marker	Počet bodů	
	0	1
CD79b (nebo CD22)	Silná exprese	Slabě pozitivní
CD23	Negativní	Pozitivní
CD5	Negativní	Pozitivní
FMC7	Pozitivní	Negativní
Smlg	Silná exprese	Slabě pozitivní

Tab. č. 2. Modifikovaná skórovací tabulka dle Matutes [77, 78]

Onemocnění může probíhat po dlouhé období bez příznaků, v typickém případě dojde po navýšení nádorové nálože k cytokiny nebo autoimunitními mechanismy navozenému souboru příznaků, označovanému jako B-symptomy. Jedná se o neinfekční teploty nad 38 °C, noční pocení vyžadující výměnu prádla během spánku a váhový úbytek, který dosáhl více než 10 % za posledních 6 měsíců [79]. U velké části nemocných jsou již v časných stádiích CLL přítomny zvětšené lymfatické uzliny, přidává se i hepatosplenomegalie. U pokročilejších stádií CLL bývá přítomna anemie a trombocytopenie [79].

Ke stanovení klinického stádia onemocnění se v současné době používají dva systémy, dle Bineta a Raie, dělíci nemocné s CLL do tří skupin lišících se celkovým přežitím a prognózou [80, 81]. Viz Tab. č. 3 a Tab. č. 4.

Nemocní ve stádiu Binet A, resp. Rai 0, jsou zatíženi nejnižším rizikem a vykazují nejdelší celkové přežití. Kategorie Binet B, resp. Rai I a II, zahrnuje pacienty s intermediární prognózou, s udávaným přežitím 5-7 let. Skupina s nejvyšší mírou rizika a nejhorší prognózou spadá do stádia Binet C, resp. Rai III a IV, kdy celkové přežití je kratší než 3 roky [80, 81, 82].

Za jednu oblast jsou považovány uzliny krční, axilární, mediastinální, retroperitoneální a tříselné, dále játra a slezina. Oboustranné postižení je počítáno jako jedna oblast.

Stádium	Definice
A	Méně než 3 postižené lymfatické oblasti
B	3 a více postižených lymfatických oblastí
C	Anémie - hemoglobin < 110 g/l a/nebo trombocytopenie - trombocyty < $100 \cdot 10^9/l$ , + libovolný počet postižených oblastí

Tab. č. 3. Stážování CLL dle Bineta [80]

Dle modifikovaného třístupňového stážování je stádium nízkého rizika 0, středního I/II a vysokého III/IV [41].

Stádium	Definice
0	Lymfocytóza
I	Lymfadenopatie
II	Hepatomegalie a/nebo splenomegalie
III	Anémie - hemoglobin < 110 g/l
IV	Trombocytopenie - trombocyty < $100 \cdot 10^9/l$

Tab. č. 4. Stážování CLL dle Raie [81]

Vzhledem velké heterogenitě CLL a faktu, že většina nemocných je diagnostikována v časném stádiu onemocnění [79], je nezbytná stratifikace přístupu dle předpokládaného dalšího vývoje onemocnění. V současné době dělíme prognostické faktory do dvou skupin. Na klasické prognostické faktory, zahrnující klinické stádium, výkonnostní stav pacienta (performance status), věk, pohlaví, zdvojovací čas lymfocytů, sérové markery a typ infiltrace kostní dřeně [79] a na prognostické faktory, opírající se o pokroky v oblasti cytogenetiky a molekulární biologie, které byly zmíněny v odstavci 3.2.3.

### **3.4. Terapie**

#### **3.4.1. Indikace terapie u CLL**

Navzdory zavádění nových diagnostických markerů a terapeutických modalit, zvláště pak na bázi terapeutických monoklonálních protilátek, vycházejí kritéria pro zahájení léčby stále z doporučení NCI-WG z roku 1996 [20].

K zahájení léčby jsou indikováni nemocní s pokročilým onemocněním (stádium C dle Bineta, resp. stádium III a IV dle Raie). U nemocných se středně pokročilým onemocněním (Binet B, resp. Rai I/II) se léčba zahajuje pouze při průkazu aktivity CLL.

Aktivní fáze onemocnění je definována přítomností minimálně jednoho z níže uvedených kritérií:

1. Potvrzené progresivní selhání kostní dřeně, projevující se rozvojem nebo zhoršením anémie a/nebo trombocytopenie.
2. Masivní (více než 6 cm pod levým žeberním obloukem) nebo progresivní či symptomatická splenomegalie.
3. Masivní lymfadenopatie (nad 10 cm v nejdelším průměru) nebo progresivní či symptomatická lymfadenopatie.
4. Progresivní lymfocytóza se vzestupem nad 50 % po dobu 2 měsíců nebo doba zdvojnásobení počtu lymfocytů (LDT) kratší než 6 měsíců.
5. Autoimunitní anémie a/nebo trombocytopenie nereagující nebo špatně reagující na kortikosteroidy nebo jinou standardní léčbu.
6. Nejméně jeden z následujících systémových příznaků souvisejících s onemocněním:
  - a. Úbytek hmotnosti  $\geq 10\%$  v průběhu předchozích 6 měsíců.
  - b. Noční pocení vyžadující výměnu prádla během spánku po dobu delší než 1 měsíc.
  - c. Horečky nad 38,0 °C po dobu 2 a více týdnů bez průkazu infekčního agens.
  - d. Významná únava (tj. výkonnostní stav dle ECOG 2 nebo horší, nemožnost pracovat nebo provádět obvyklé činnosti).

### 3.4.2. Současné léčebné postupy

Na základě výsledků randomizované studie CLL-8 jsou v rámci 1. linie terapie nemocní v dobrém stavu a bez závažných komorbidit léčeni kombinovanou chemoimunoterapií využívající fludarabin, cyklofosfamid a rituximab (FCR) [83].

U starších nemocných s významnými komorbiditami je léčbou volby chlorambucil a v případě těžce komorbidních nemocných ve špatném celkovém stavu je indikována jen podpůrná léčba [83, 84].

V odůvodněných případech, zejména vzhledem k častým komorbiditám u starších nemocných, lze využít i další terapeutické přístupy, např. monoterapie anti CD20 (rituximab) u nemocných s masivním postižením kostní dřeně a komorbiditami vylučujícími chemoterapii, popř. u nemocných s autoimunitní cytopenií nereagující na 1. linii imunosupresivní léčby [85], kombinované podání anti CD20 s chemoterapií (chlorambucil, COP, CHOP) u nemocných s kontraindikovanými fludarabinovými režimy (renální insuficience, aktivní autoimunitní hemolytická anémie atd.) [86], podání redukovaných dávek fludarabinu a cyklofosfamidu v kombinaci s anti CD20 (tzv. nízkodávkovaný FCR) u starších, popř. komorbidních nemocných, jejichž stav nedovoluje podání FCR režimu v plné dávce [87], popř. monoterapie bendamustinem u nemocných, kteří nejsou vhodní pro léčbu fludarabinovým režimem [88], nebo podání anti CD52 (alemtuzumab) u nemocných s kontraindikovanými fludarabinovými režimy [89].

### 3.4.3. Nové terapeutické směry

Pokroky v poznání biologické podstaty onemocnění a rozvoj technologií přípravy léčiv přinášejí nové potenciální terapeutické možnosti, které jsou v dnešní době ověřovány klinickými studiemi. Příkladem je např. inhibice cyklin dependentních kináz pomocí flavopiridolu (alvocidib) [90], nebo využití antisense oligonukleotidu proti Bcl-2 (oblimersen) [91].

V prvních stádiích klinických studií je v současné době testováno další léčivo zasahující antiapoptotický protein BCL-2; jeho antagonistu ABT-199, namířený proti BH3 doméně (tzv. BH3 mimetika) a indukující buněčnou smrt s dramatickou redukcí nádorových buněk do 12 hodin po podání [92].

Dráha B-buněčného receptoru (BCR) je cílem malé molekuly ibrutinibu, který vazbou na Brutonovu tyrosin kinázu (BTK) blokuje aktivaci dráhy BCR. To má za následek omezení migrace a proliferace maligních buněk a indukci apoptózy [93].

Dalším novým léčivem, cílícím na dráhu BCR, je idelalisib, inhibitor phosphoinositide 3-kinázy (PI3K) [94]. Mechanismus účinku není zcela objasněn, ale zasahuje jednak expresi jaderného faktoru NFκB a dále omezuje schopnost maligních buněk migrovat do ochranného mikroprostředí, což je činí více zranitelnými chemoterapií [95].

V bouřlivě se rozvíjející skupině terapeutických monoklonálních protilátek se u CLL zkouší použití např. o lumiliximabu (anti CD23) [96] a ofatumumabu (anti CD20 protilátka, obsazující jiný epitop antigenu CD20 než rituximab) [97].

Významným cílovým místem se jeví být také zásah do mikroprostředí nádoru, konkrétně cestou zásahu do interakcí mezi nádorovou populací a buňkami kostní dřeně či lymfatických uzlin protilátkou proti integrinu CD49d, natalizumabem [98].

Dále se jedná o preparát thalidomid a jeho derivát lenalidomid s antiangiogenním a imunomodulačním účinkem [99, 100], přičemž zejména lenalidomid se jeví jako nadějně léčivo, byť mnohdy s výraznými vedlejšími účinky [101].

### **3.5. Mechanizmy alterace imunity**

#### **3.5.1. Nádorem indukované funkční defekty T-lymfocytů**

Biologicky i klinicky významnou interakcí mezi nádorem a imunitou je zejména funkční postižení T-lymfocytů, ústící v selhávání protinádorové imunity a snížení schopnosti aktivně působit proti bakteriálním a virovým patogenům. Toto postižení je způsobeno komplexem dějů, z nichž vedoucí úlohu hraje činnost T-regulačních lymfocytů a kostimulátorů a koinhibitorů T-lymfocytů, označovaných jako B7 homology, a jejich receptorů [102]. Jedná se o jev označovaný jako vyčerpání (exhausting) T-lymfocytů, které takto modulovány nejsou schopny efektivního cytotoxického působení na cílové buňky. Tento získaný stav T-lymfocytární dysfunkce je definován zvýšenou expresí markeru PD-1 (receptor programované buněčné smrti-1, programmed cell death-1) [103], sloužícího jako negativní regulátor aktivace lymfocytů, který byl původně popsán v kontextu chronických virových infekcí (mezi ligandy výše uvedených markerů patří např. proteiny mediující vstup herpetických virů do buňky) [104].

Dopad spočívá v nižší expresi genů pro cytoskeletální proteiny, vede k chybnému formování synapsí a tím k nefunkčnímu směřování transportu cytotoxických vezikul z efektorové buňky. Vlastní produkce F-aktinu, granzymu B ani vlastní degranulace není postižena [105]. Chronická stimulace virovými antigeny vede ke ztrátě imunokompetence CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, ústící v defekt cytotoxického působení, redukované produkci cytokinů a ztrátě proliferační kapacity [105]. Podobné postižení imunokompetentních T-lymfocytárních subpopulací je popisováno i u nemocných se solidními tumory i s dalšími hematologickými malignitami [106, 107].

Funkční testy u nemocných s CLL odhalily, že markery T-lymfocytární dysfunkce (PD-1, CD244 a CD160) jsou nejsilněji exprimovány na T<sub>EM</sub> buňkách (T effector memory, CCR7<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) a T<sub>EMRA</sub> (CD45RA<sup>+</sup>), zatímco na naivních (CCR7<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>RA<sup>+</sup>) a paměťových T<sub>CM</sub> central memory, CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) je exprese významně nižší. Tyto výsledky ukazují posun v kompartmentu cirkulujících T-lymfocytů směrem k diferencovaným formám po kontaktu s antigenem, nesoucím markery vyčerpání [105]. Dále byla zjištěna redukce počtu CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů schopných proliferace po polyklonální aktivaci a prolongace buněčného cyklu u dělících se forem [105]. A konečně, experimentálně byla prokázána snížená schopnost cytotoxického působení na patologické buňky [105, 108]. Na rozdíl od vyčerpání T-lymfocytů u chronických virových infekcí nebyla u pacientů s CLL pozorována ztráta schopnosti produkovat efektorové cytokiny, intracelulární koncentrace interferonu- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) a faktoru indukujícího nekrózu nádoru (TNF $\alpha$ )

byla ve srovnání se zdravými dárci dokonce zvýšená, což odpovídá vyššímu zastoupení  $T_{EM}$  a  $T_{EMRA}$  buněk, produkujícím vyšší množství  $IFN\gamma$  a  $TNF\alpha$ , než naivní T-lymfocyty a  $T_{CM}$  [105].

Byl studován i vliv cytomegalovirové infekce (CMV) u nemocných s CLL, přičemž defekt proliferace  $CD8^+$  T-lymfocytů i jejich cytotoxické funkce byl pozorován bez příčinné souvislosti s CMV pozitivitou. Naopak, zastoupení jednoho z markerů funkční inaktivity, PD-1, bylo zvýšené pouze u CMV negativních nemocných [105]. Rozdílný efekt virových a nádorových buněk na funkčnost  $CD8^+$  T-lymfocytů může odpovídat odlišnému působení vysoce afinitních virových antigenů a nízké afinitních antigenů nádorově transformovaných tělu vlastních B-lymfocytů. Lze zvažovat i hypotézu, ve které jsou vyčerpané T-lymfocyty udržovány v mikroprostředí nádoru cíleně, neboť jej saturují pronádorově působícími cytokiny  $IFN\gamma$  a  $TNF\alpha$  [109, 110]. Nádorová populace tedy dokáže komplexně a efektivně potlačovat funkce T-buněčné složky imunity a to hned na několika úrovních, počínaje redukcí počtu proliferujících T-lymfocytů, přes ovlivnění buněčného cyklu až k zásahu do transportu a směřování vlastních cytotoxických působků.

### **3.5.2. T-regulační lymfocyty a ovlivnění imunitní odpovědi**

Aktivita efektorových T-lymfocytárních subpopulací je řízena prostřednictvím T-regulačních lymfocytů (Treg), které jsou součástí komplexní sítě regulující adaptivní typ imunity. Role Treg v regulačních procesech je velmi komplexní a není do dnešní doby zcela objasněna. Jejich schopnost potlačovat protinádorovou imunitu je jedním ze zásadních faktorů umožňujících maligním buňkám uniknout zničení a vede k růstu tumoru [111, 112], u pacientů s některými lymfomy však vyšší zastoupení Treg pozitivně koreluje s aktivitou cytotoxických efektorových buněk a tedy s lepší prognózou [113]. Ukazuje se, že minimálně některé subpopulace Treg jsou u hematologických malignit indukovatelné nádorem, konkrétně se jedná o konverzi konvenčních  $CD4^+CD25^-$  T-lymfocytů na  $CD4^+FoxP3$ , přičemž fyziologické B-lymfocyty schopnost konvertovat Treg postrádají [114, 115].

Ve světle současných znalostí rozdělujeme Treg do čtyř funkčních skupin:

- 1) maligní Treg, infiltrující zralé T-lymfocytární leukémie a lymfomy, typické expresí FoxP3;
- 2) supresorové Treg, přítomné v matrix solidních tumorů a lymfomů, charakterizované schopností potlačovat protinádorovou funkci cytotoxických  $CD8^+$  T-lymfocytů;
- 3) Treg s přímým antitumorovým efektem;
- 4) tzv. „incompetent“ Treg, přispívající k autoimunitním fenoménům u angioimunoblastického T-buněčného lymfomu [113].



Pro účely detekce Treg metodami průtokové cytometrie jsou v současné době využívány dva přístupy: první, tradiční, využívá exprese znaku FoxP3, což je 47 kDA protein z „forkhead/wingedhelix“ rodiny transkripčních faktorů. Proteiny rodiny Fox fungují jako aktivátory i represory transkripce a jsou charakterizovány přítomností „forkhead“ domény, nezbytné pro vazbu DNA a lokalizaci v jádře [116]. FoxP3 slouží jako represor transkripce promotorů genů pro cytokiny IL-2 a GM-CSF [117].

Rovněž byla publikována zjištění, že FoxP3 interaguje s transkripčními faktory hrajícími klíčovou roli v expresi mnoha genů pro cytokiny, jako např. nuclear factor of activated T cells (NFAT), acute myeloid leukemia 1/Runt-related transcription factor 1 (AML1/Runx1) a pravděpodobně i jaderný faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) [118, 119]. Vnitrobuněčná lokalizace FoxP3 však komplikuje cytometrickou analýzu, objevily se proto tendence nahradit jej v rutinních protokolech povrchovým markerem, který by byl snáze přístupný a zároveň umožňoval vysokou senzitivitu a specificitu stanovení Treg. Liu a kolektiv popsali metodiku identifikace Treg pomocí znaku CD127, který inverzně koreluje s expresí FoxP3 na T-regulačních lymfocytech [120].

Marker CD127 je jednou ze složek heterodimerického receptoru IL-7, který mimo CD127 dále sestává ze základní strukturní domény (common chain), sdílené dalšími receptory pro cytokiny (IL-2R, IL-4R, IL-9R, IL-15R a IL-21R). CD127 je exprimován na thymocytech, T- a B-lymfocytárních progenitorech, zralých T-lymfocytech, monocytech a dalších buňkách lymfoidní a myeloidní linie. Bylo prokázáno, že receptor pro IL-7 sehrává důležitou roli v proliferaci a diferenciaci T-lymfocytů a *in-vitro* experimenty odhalily pokles exprese CD127 v průběhu aktivace T-lymfocytů [121, 122].

Role Treg u CLL není doposud jednoznačně odhalena, nicméně počet T-regulačních lymfocytů inverzně koreluje s dobou přežití bez léčby (treatment free survival) a může sloužit jako nezávislý prognostický faktor předpovídající čas do začátku terapie u pacientů s nízkým až středním rizikem [123]. Zajímavým zjištěním, ukazujícím na provázanost mezi regulačními faktory imunity a malignitou, je rovněž signifikantně vyšší absolutní počet Treg u pacientů s CLL komplikovanou autoimunitní cypenií [124]. Ukazuje se, že analýzy vztahů mezi T-regulačními lymfocyty, tumorem a imunitou hostitele mohou přinést nové a velmi významné informace o jejich vzájemných interakcích a to zejména v počátečních obdobích nádorového růstu, kde pravděpodobně spolurozhodují o osudu nádorově transformovaných buněk.

### 3.5.3. Inhibice cytotoxických T-lymfocytů cestou dráhy PD-1/PD-L1

Na snížení imunitní odpovědi vůči tumoru se mimo Treg významně podílí interakce receptoru PD-1, exprimovaného především na B- a T- lymfocytech, se svými ligandy PD-L1 (CD274, B7-H1) a PD-L2 (CD273, B7-DC), tzv. dráha programované buněčné smrti [125]. PD-1 je významným členem rodiny B7 homologů, jejichž kostimulační a koinhibiční funkce jsou u T-lymfocytů již dlouho známy [102]. V poslední době bylo mimo receptoru PD-1 (CD279, B7-H1) popsáno mnoho dalších významných homologů (B7-H2, B7-H3, B7-H3, B7-H4, B7-DC, atd.) s významnou rolí v regulaci vrozené i adaptivní imunity, včetně nádorové imunotolerance. Některé z nich účinně potlačují hostitelovu imunitu a umožňují tak nádorovým buňkám unikat cytotoxické odpovědi [126, 127, 128]. U T-lymfocytů tyto interakce inhibují proliferaci, produkci cytokinů i schopnost cytotoxického působení, což bývá označováno jako vyčerpání (exhausting) [129]. U některých hematologických malignit byl též popsán vliv PD-1 na NK buňky, tedy NK vyčerpání, což může mít vliv na použití terapeutických monoklonálních protilátek působících cestou NK buňkami mediované cytotoxicity (ADCC) [130]. Působení rodiny B7-H se nevztahuje pouze na přímé interakce mezi maligními buňkami a imunokompetentními efektorů, ale jejich exprese na nemaligních buňkách tumoru významně ovlivňují mikroprostředí a vytváří vhodnou niku pro přežití a růst nádorové populace [125]. PD-1 pozitivní nádorové buňky jsou rovněž schopny indukovat T-regulační lymfocyty a řídit jejich expanzi a tlumivé působení, přičemž stejný efekt vykazují i PD-1 pozitivní dendritické buňky infiltrující nádor [131, 132, 133].

V neposlední řadě nádorové buňky s vyšší expresí PD-1 vykazují rezistenci vůči apoptotickým stimulům indukovaným jak Fas dráhou, tak účinkem chemoterapie [134]. Dlouhodobá stimulace antigeny nádorových buněk, v tomto případě interakce receptoru PD-1 se svými ligandy, způsobuje chronickou aktivaci signální dráhy programované buněčné smrti, což inhibuje fyziologickou aktivitu efektorových T-lymfocytů formou výše popsaných defektů buněčné diferenciaci a cytotoxicity. Inhibice imunokompetentních lymfocytárních subpopulací, která cestou této dráhy během nádorového růstu nastává, zásadním způsobem ovlivňuje možnosti protinádorové imunity hostitele, spolu s dalšími faktory vede k imunitní toleranci nádorové tkáně a v konečném důsledku je spojena s horší terapeutickou odpovědí [135].

Geny obou ligandů (PD-L1 a PD-L2) jsou umístěny v oblasti 9p24.1, tedy pod vlivem Janusovy kinázy 2 (JAK2). Experimenty na buněčných liniích Hodgkinova lymfomu a primárně mediastinálního velkobuněčného B-lymfomu prokázaly navýšení transkripce PD-L1 vlivem amplifikace JAK2 [136]. Receptor PD-1 i jeho ligandy jsou vzhledem k svému umístění

na povrchu buňky ideálním cílem pro analýzu metodami multiparametrické průtokové cytometrie, přičemž vhodné protilátky jsou již dostupné ve formě konjugátů i pro mnohobarevná stanovení [137].

Dráha programované buněčné smrti významně ovlivňuje možnosti protinádorové imunity a je schopna zásadním způsobem redukovat míru cytotoxického působení jak CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, tak i NK buněk. Tato schopnost manipulovat výkonnou složkou adaptivní imunity poskytuje maligní populaci významnou konkurenční výhodu a interakce receptoru PD-1 se svými ligandy je proto oprávněně v centru zájmu mnoha výzkumných skupin, neboť lze předpokládat, že blokáda dráhy programované buněčné smrti například terapeutickou monoklonální protilátkou umožní obnovení funkce hostitelské protinádorové imunity.

#### **3.5.4. MHC a únik leukemických buněk před imunitní odpovědí**

Další modalitou ovlivnění imunitní odpovědi je snížení exprese proteinů hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (MHC II) na antigen prezentujících buňkách CD4 T-lymfocytům. Touto cestou dochází k nižší úrovni exprese HLA (Human Leukocyte Antigen) antigenů, ke snížení imunogenity nádorových buněk a tím k jejich „ukrytí“ před imunitní odpovědí ve formě cytotoxického působení T-lymfocytů [138]. Geny pro MHC II. třídy jsou většinou umístěny v oblasti 6p12 a jsou konstitutivně exprimovány na antigen prezentujících buňkách (B-lymfocyty, dendritické buňky, monocyty), s možností indukovatelné exprese na dalších typech leukocytů. Snížení exprese genů MHC II. třídy u nemocných s difúzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) výrazně koreluje s kratším přežíváním [139].

Z recentních výzkumů plyne, že podkladem nižší exprese těchto genů je snížení jejich transkripce, která je řízena expresí transkripčních aktivátorů kódovaných genem transkripčního aktivátoru pro MHC II. třídy (Class II, Major Histocompatibility Complex, Transactivator; CIITA) respektive jeho mutovaných forem [140, 141]. Lze se oprávněně domnívat, že analogický mechanismus regulace transkripce se uplatňuje i u CLL a dalších hematologických malignit [142]. Na snížení imunitního dozoru nad nádorovými buňkami má dále vliv míra exprese genů Janusovy kinázy (JAK2). Amplifikace oblasti 9p24, tedy postihující gen JAK2, vede k jeho hyperexpresi a tím ke konstitutivní aktivaci JAK2, což má za následek nekontrolovanou buněčnou proliferaci a dále amplifikaci genů PD-L1 a PD-L2, tedy genů přímo ovlivňujících cytotoxickou imunitní odpověď organismu [136].

#### **3.5.5. Biologické podklady regulace imunitní odpovědi u CLL**

Společným jmenovatelem všech výše uvedených cest alterace imunitní odpovědi jsou primární genetické změny, předcházející nebo souběžné s růstem nádoru, zejména amplifikace

genu Janusovy kinázy a pravděpodobně i zásah do mechanismů transkripčního aktivace genu pro MHC II. třídy [142], což vede k vyšší aktivitě dráhy programované buněčné smrti a tím k indukci imunoregulačních Treg, k navýšení proliferační aktivity nádorových buněk a k nižší expresi HLA [136]. Nádorové buňky pak unikají imunitnímu systému především použitím „stealth mode“, tedy snížením imunogenity prostřednictvím nižší exprese HLA [116] a cestou aktivace dráhy PD-1/PD-L1 spojené s alterací funkce efektorových CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, čímž dochází k navození imunologické tolerance [117].

Dále se uplatňuje vliv nádorové tkáně zvyšující aktivitu CD4<sup>+</sup> Treg, vykazujících tlumivý efekt na cytotoxické efektorové buňky, potlačení procesů apoptózy a ovlivnění mikroprostředí nádoru cestou protumorových cytokinů a chemokinů [109, 110, 134]. Vyčerpání efektorových T-lymfocytů, indukované chronickou aktivací signální dráhy programované buněčné smrti vede nejen k navození imunotolerance nádorových buněk, ale k alteraci T-buněčné imunity jako celku, což je v konečném důsledku patrné ve vyšší incidenci a závažnějším průběhu bakteriálních a virových infekcí [143]. Navýšení exprese ligandu PD-1L je prokázáno nejen u hematologických malignit, ale i u mnoha solidních tumorů, kde inhibuje produkci cytokinů i aktivitu tumor infiltruujících CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů [144, 145, 146]. Blokáda interakce receptoru PD-1 s ligandy (PD-L1 a PD-L2) *in vitro* zvyšuje úroveň imunitní odpovědi [147] a přímo se podílí na obnově efektivity protinádorové aktivity imunitního systému [143, 148].

Mimo dráhu programované buněčné smrti se v regulaci T-buněčné odpovědi uplatňují i další mechanismy, recentně byl popsán vliv dráhy CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), která ovlivňuje inhibuje proliferaci a přežívání buněk CLL cestou downregulace T-lymfocytární odpovědi, konkrétně se podílí na ovlivnění exprese transkripčních (STAT1, NFATC2), proliferačních (c-Fos, c-Myc) a antiapoptotických (Bcl-2) faktorů [149].

Blokáda CTLA4 terapeutickými monoklonálními protilátkami je v současné době předmětem klinických studií zejména u solidních tumorů a to se slibnými výsledky. Zajímavý je synergní protinádorový efekt souběžné blokády dráhy PD-1 a CTLA4, což demonstruje možnosti komplexního terapeutického ovlivnění imunitní odpovědi v budoucnu [150].

### **3.5.6. Dráha PD-1/PD-L u CLL - souhrn**

Důležitým faktorem rozvoje nádorové imunotolerance je interakce receptoru PD-1 se svými ligandy PD-L1 (CD274, B7-H1) a PD-L2 (CD273, B7-DC). Receptor programované buněčné smrti -1 (PD-1), původně popsán u apoptotických T-buněčných linií [151], je za fyziologických podmínek exprimován na aktivovaných T- i B- lymfocytech a na myeloidních buňkách [102].

Biologická funkce PD-1 *in vivo* byla objasněna pomocí PD-1 deficitních (PD-1<sup>-/-</sup>) myši, kdy u kmene C57BL/6 PD-1<sup>-/-</sup> došlo již ve věku šesti měsíců k rozvoji lupus-like glomerulonefritidy a artritidy [152]. Tyto poznatky přispěly k poznání inhibiční funkce PD-1 a jeho potenciální role v oblasti regulace tolerance a autoimunitních mechanismů [153].

V rámci dráhy programované buněčné smrti interaguje receptor PD-1 se dvěma ligandy, PD-L1 a PD-L2. První z nich, PD-L1 byl identifikován pomocí homologií s dříve známými molekulami rodiny B7 [154, 155], druhý, PD-L2, byl odhalen jednak pro svou homologii s PD-L1 a také pomocí analýzy genových knihoven dendritických buněk a aktivovaných makrofágů [156, 157]. Zatímco exprese příbuzných zástupců rodiny B7, B7-1 (CD80) a B7-2 (CD86), je omezena na lymfocyty, mRNA ligandů PD-L1 a PD-L2 byla zjištěna v mnoha typech tkání a orgánů, včetně srdce, plic a placenty [153].

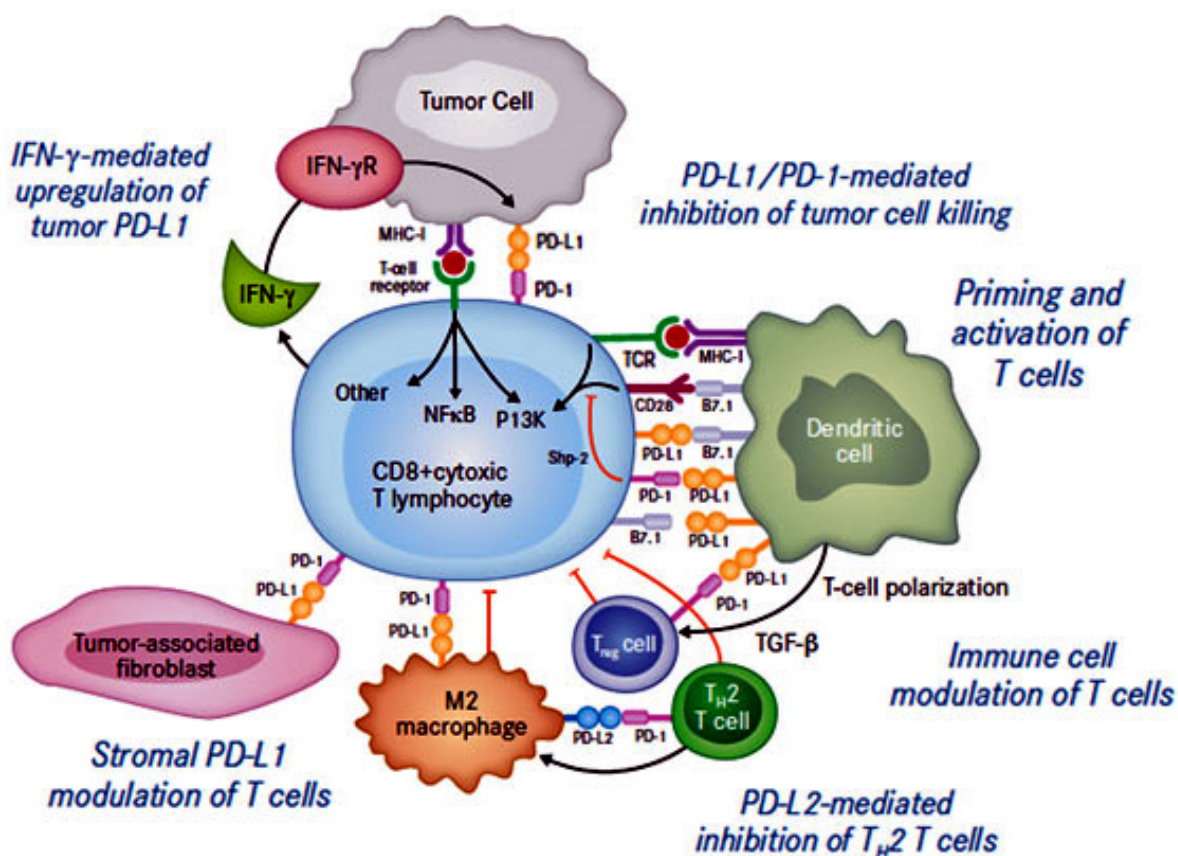
Ligand PD-L1 je primárně exprimován na membráně makrofágů a aktivovaných B- i T-lymfocytů a jeho biologická funkce spočívá především v regulaci autoimunitních procesů [158]. V recentní literatuře jsou v současné době popisovány interakce receptoru PD-1 se svými ligandy PD-L1 a PD-L2, a to zejména u T-lymfocytů, u kterých způsobují stav označovaný jako funkční vyčerpání (exhausting) [159] cestami oslabení TCR-mediované proliferace T-lymfocytů [155] pomocí negativní kostimulace kontrolující aktivační stav T-lymfocytů během prezentace antigenů dendritickými buňkami. T-lymfocyty aktivované bez vlivu dráhy programované buněčné smrti vykazují vyšší míru aktivace, vyšší proliferativní aktivitu a vyšší hladiny produkovaných cytokinů, včetně IFN- $\gamma$  a IL-10, jak bylo prokázáno pomocí blokády PD-L2 [160]. Podobný efekt přineslo i zablokování ligandu PD-L1, přičemž vyřazení obou ligandů PD-L1 i PD-L2 vykazovalo aditivní efekt [161].

Přestože je u mnoha typů lidských tumorů, včetně hematologických malignit, popisována zvýšená exprese PD-L1, úplná biologická funkce receptoru PD-1 a jeho ligandů na nádorových buňkách stále zůstává nejasná [156, 162, 126, 148]. Je jisté, že inhibice imunokompetentních lymfocytárních subpopulací cestou dráhy PD-1 během tumorigeneze má zásadní vliv na hostitelovu protinádorovou imunitu. Spolu s dalšími faktory se receptor PD-1 podílí na navození a udržení imunitní tolerance nádorové tkáně a v konečném důsledku může vést i k horší léčebné odpovědi [125].

Z důvodu membránové exprese je receptor PD-1 a jeho ligandy PD-L1 a PD-L2 potenciálním cílem cílené terapie založené na monoklonálních protilátkách. V současné době bylo realizováno několik klinických studií, zaměřených na blokádu dráhy programované buněčné smrti: anti PD-1 protilátka lambrolizumab byla testována na kohortě nemocných v pokročilých stádiích melanomu včetně pacientů v progresi onemocnění, kdy bylo ve významném

procentu dosaženo regrese tumoru [11]. Další z anti PD-1 protilátek, nivolumab, byl testován u nemocných s Hodgkinovým lymfomem, pokročilým melanomem, nemalobuněčným karcinomem plic, některými typy karcinomu prostaty a kolorekta, přičemž byly publikovány výsledky dokumentující velmi slibnou terapeutickou odpověď, navíc s dobrou tolerancí léčiva [12, 13]. V roce 2013 byly publikovány povzbudivé výsledky 1a fáze testování monoklonální protilátky MPDL3280A, blokující ligand PD-L1 [14].

Interakce receptoru PD-1 a jeho ligandů způsobuje chronickou aktivaci signální dráhy PD-1/ PD-L1/L2. Inhibice fyziologické funkce cytotoxických efektorových T-lymfocytů postihuje imunitu jako celek včetně antibakteriálního a protivirového působení, což má zvláště u nemocných s CLL zásadní dopad na četnost oportunních infekcí.



Obr. 1. Mapa vztahů dráhy Programované buněčné smrti [165]

## 4. Průtoková cytometrie

### 4.1. Úvod to problematiky

Průtoková cytometrie je bioanalytická metoda spojující v sobě principy fluorescenční mikroskopie a hematologického analyzátoru. Využívá fluorescenčně značených monoklonálních protilátek pro detekci komplementárních antigenů na povrchu i uvnitř analyzovaných buněk. Vzhledem k vysoké senzitivitě, rychlosti laboratorní odezvy, široké paletě analytických možností a rovněž díky relativně nízké ceně za vyšetření, se stala zlatým standardem v mnoha oborech biomedicínských analýz.

Pravděpodobně nejširšího využití dosáhla v diagnostice hematologických malignit a stavů s nimi spojených, kde právě rychlá a přesná diagnostika dává klinickému lékaři stěžejní indicie ke správnému stanovení diagnózy a následně mu umožňuje sledovat průběh léčby takřka v reálném čase. Konkrétně se jedná především o identifikaci jednotlivých typů lymfomů, leukémií a dalších malignit včetně stanovení minimální reziduální nemoci po léčbě, o sledování imunologických charakteristik pacientů během léčby i rekonstituce imunity po transplantaci a v neposlední řadě o kontrolu kvality štěpů hematopoetických kmenových buněk u auto- i alogenních transplantací.

Indikace k vyšetření průtokovou cytometrií byly definovány pracovní skupinou expertů v roce 2006 v Bethesdě [166] (*Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia*). Dle tohoto konsenzu jsou indikací k cytometrickému vyšetření kvantitativní poruchy v krevním obraze typu leukocytózy nejasné etiologie, cytopenie, lymfocytózy, monocytózy, eozinofilie, přítomnost atypických buněk, případně blastů v periferní krvi či kostní dřeni a při klinikem vyjádřeném podezření na hematologickou chorobu (suspektní uzlinový syndrom, hepatomegalie, splenomegalie, monoklonální gamapatie, defekt funkce trombocytů, trombocytóza s přítomností abnormálních trombocytů, klinický imunodeficit, atd.).

Další vývoj biomedicínsky orientované průtokové cytometrie se ubírá směrem vícebarevných stanovení (projekt Euroflow) [167], kvantitativních analýz a především ke standardizaci jednotlivých metod, která by umožnila vyšší míru mezilaboratorní kontroly kvality.

## **4.2. Základy průtokové cytometrie**

### **4.2.1. Obecné principy**

Průtoková cytometrie je založena na měření a následné analýze fyzikálních charakteristik vyšetřovaných částic unášených nosnou kapalinou a interagujících se světelným zářením. Základními analyzovanými veličinami jsou velikost částic, densita jejich vnitřního obsahu (granularita) a intenzita fluorescence. Vzorek je vnášen do kapiláry s laminárně proudící nosnou kapalinou, kde hydrodynamická izofokuse zajišťuje stabilní pozici a rychlost analyzovaných částic. K vlastnímu procesu stanovení, tedy interakci buněk s laserovým paprskem, dochází v měřicí komoře. Po průchodu komorou jsou buňkám přiřazeny naměřené hodnoty a tato data jsou uložena k dalšímu zpracování ve formě datového souboru, tzv. listmode. Ten umožňuje naměřená data opakovaně analyzovat a kombinovat za použití booleovských operátorů (tzv. gatování).

Analyzovaný materiál musí být připraven ve formě jednobuněčné suspenze, resp. suspenze částic menších než průměr trysky v měřicí komoře.

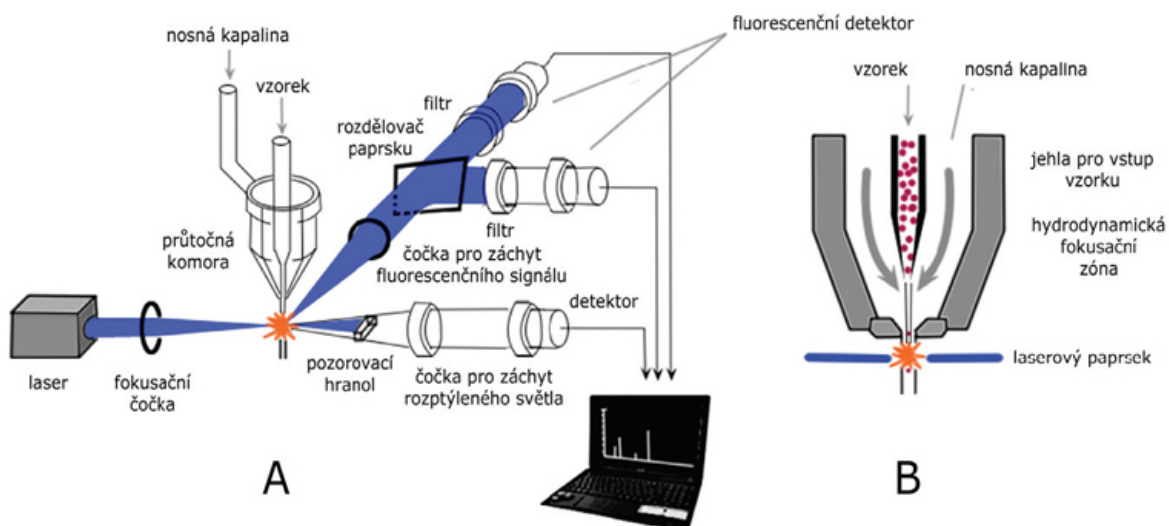
V medicínských aplikacích je tedy průtoková cytometrie nejčastěji využívána pro stanovení z periferní krve, kostní dřeně, likvorů, punktátů a dalších tekutých materiálů.

### **4.2.2. Konstrukční celky**

Průtokový cytometr sestává ze tří, respektive čtyř technických celků:

1. Systému fluidiky, který definovaným a uživatelsky ovlivnitelným způsobem transportuje analyzované částice do měřicí komory
2. Optického systému, skládajícího se ze zdroje záření (různé typy laserů, UV lampa) k měření v rovině procházejícího světla (FSC) a odraženého světla (SSC) a k aktivaci fluorochromu a optické cesty zrcadel a filtrů vedoucích a rozdělujících signál na příslušné detektory.
3. Výpočetního systému umožňujícího změny nastavení parametrů cytometru, převádějícího světelný signál na elektrický, analog-digitálního převodníku a modulu zobrazení, analýzy a archivace naměřených hodnot.
4. Sortovacího modulu, který bývá součástí specializovaných cytometrů. Sortování umožňuje oddělit z analyzovaného vzorku zájmovou populaci. Nejčastěji používanou metodou je vychylování elektricky nabitých kapek obsahujících cílové buňky v elektrostatickém poli.

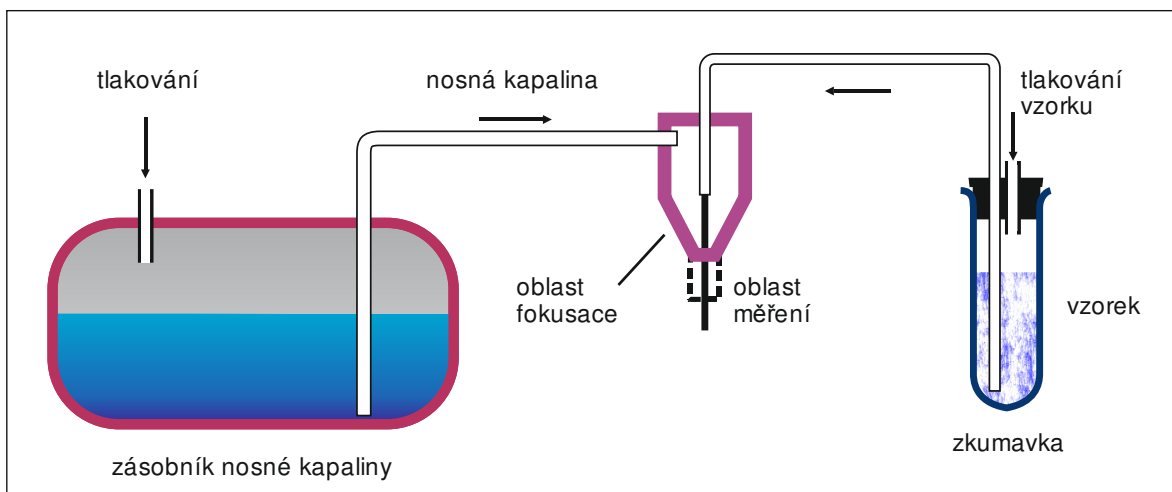




Obr. 2. Schéma průtokového cytometru (A) a měřicí komory (B)

### Systém fluidiky

Jak již název napovídá, průtoková cytometrie je založena na transportu analyzovaných částic kapalinou. Tato tzv. nosná kapalina, kterou bývá modifikovaný fyziologický roztok, unáší analyzované částice definovanou a ovlivnitelnou rychlostí a směřuje je do ideální pozice vzhledem k sensorům. Pozice jednotlivých částic je kontrolována hydrodynamickou izofokusací nosné kapaliny [168]. Její proud je usměrněn do konické části měřicí komory, čímž dojde ke zrychlení průtoku vlivem zmenšení plochy kapiláry. Do takto upravené, laminárně proudící nosné kapaliny je vstřikován vzorek tak, aby nedošlo k jeho smísení s nosnou kapalinou, ale k vytvoření koaxiálního proudu. Průměr kapiláry je dále zúžen, aby měřícím bodem procházela v okamžiku analýzy právě jedna buňka. Rychlost průtoku nosné kapaliny a tedy i počet analyzovaných buněk za časovou jednotku lze uživatelsky upravovat, se zvyšující se rychlostí analýzy však roste i míra nepřesnosti měření (počet dublet v měřícím bodě atd.).



Obr. 3. Schéma systému fluidiky průtokového cytometru [168]

### Optické cesty

Princípem vyšetření metodou průtokové cytometrie je záznam interakce analyzovaných částic s excitovaným fluorochromem a elektromagnetického vlnění emitovaného laserem či UV lampou.

Optický systém cytometru sestává z excitační optiky a sběrných optických cest. Excitační optiku tvoří zdroj záření a optické členy, které transportují a zaostřují paprsek do bodu měření. Zdroj musí být schopen stabilní emise fotonů, které jsou následně usměrněny do paprsku o průměru většinou 0,5–2 mm a použity k osvětlení vzorku [169]. Naprostá většina komerčně dostupných cytometrů je vybavena jedním či několika lasery, nejčastěji vzduchem chlazeným argonovým laserem o výkonu 10-25 W vyzařujícím na 488 nm jako základním zdrojem záření.

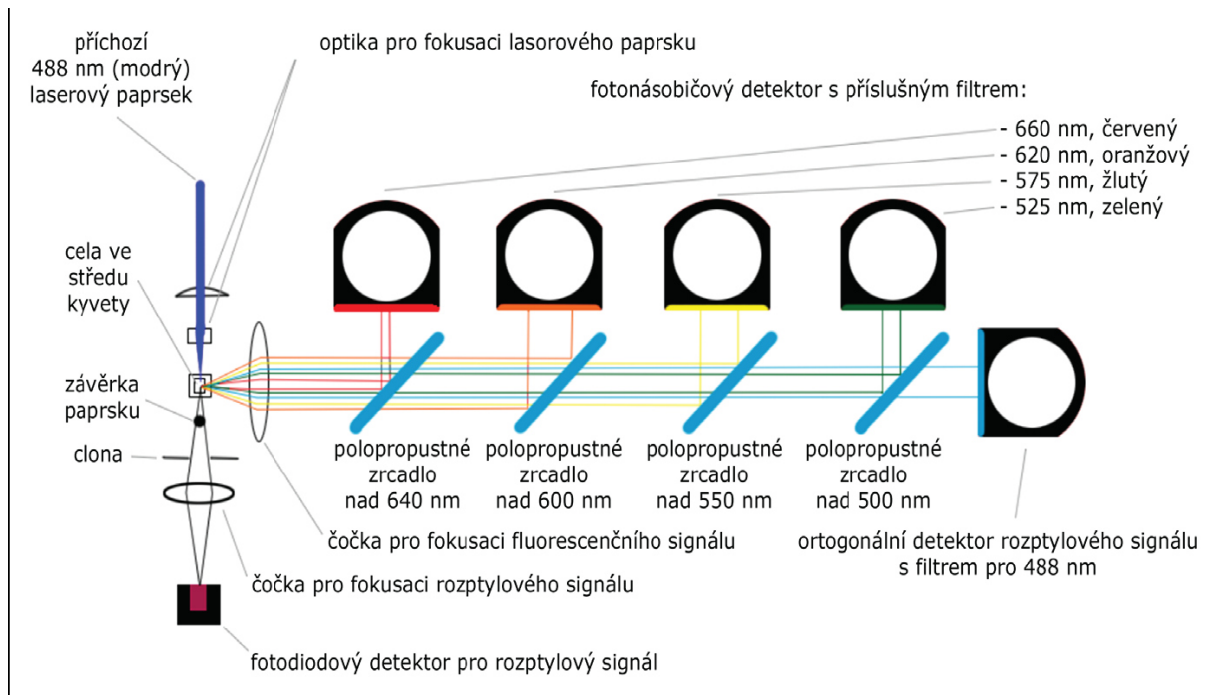
Výhodou tohoto typu laseru je především to, že jeho vlnová délka umožňuje excitaci několika důležitých fluorochromů současně (FITC-fluorescein isothiokyanát, PE-phycoerythrin, PerCP-peridinin chlorophyll protein, atd.). Především v cytometrech pro pokročilé aplikace se využívají i jiné typy laserů včetně jejich kombinací (Kr, He-Ne, He-Cd, neodým-YAG, polovodičové lasery atd.) pro aktivaci více fluorochromů jinými vlnovými délkami. Zvláštním typem excitačního zdroje je pak rtuťová oblouková lampa.

Sběrnou optiku tvoří sestava čoček, které koncentrují fotony rozptýleného (light scatter) a emisního záření a sady zrcadel a filtrů rozdělujících a usměrňujících světlo různých vlnových délek na příslušné detektory.

K rozdělení signálu pro jednotlivé detektory se používají filtry dvojího typu:

1. barevná skla, která umožňují průchod jen určitým vlnovým délkám tím, že absorbují nechtěné vlnové délky.
2. interferenční filtry, které dále dělíme na:
  - a) Úzkopásmové filtry (Band pass filtry, BP) umožňující průchod pouze úzkému rozmezí vlnových délek, které odpovídají emisnímu vrcholu konkrétního fluorochromu.
  - b) Blokovací filtry propouštějící záření o vlnové délce delší nebo rovné nastavené hodnotě. (Long pass filtry, LP)
  - c) Blokovací filtry propouštějící záření o vlnové délce kratší nebo rovné nastavené hodnotě. (Short pass filtry, SP)

Specifickým typem interferenčního filtru jsou dichroické filtry (tzv. beam splitters), které v závislosti na vlnové délce rozdělují přicházející světlo různých barev do dvou směrů, většinou pod úhlem 90°. Celý optický systém tvoří tzv. optickou lavici.



Obr. 4. Schéma optické lavice průtokového cytometru [169]

## **Detekce a zpracování signálu**

Signál vzniklý interakcí analyzovaných částic s fotony generovanými laserem je detekován dvěma způsoby v závislosti na jeho hodnotách. Intenzivnější signál, tedy signál generovaný dopředným rozptylem (forward scatter, FSC) bývá měřen fotodiodou, kdežto signál nižší intenzity, zde signál bočního rozptylu (side scatter, SSC) a fotony emitované fluorochromem, zpracovává fotonásobič.

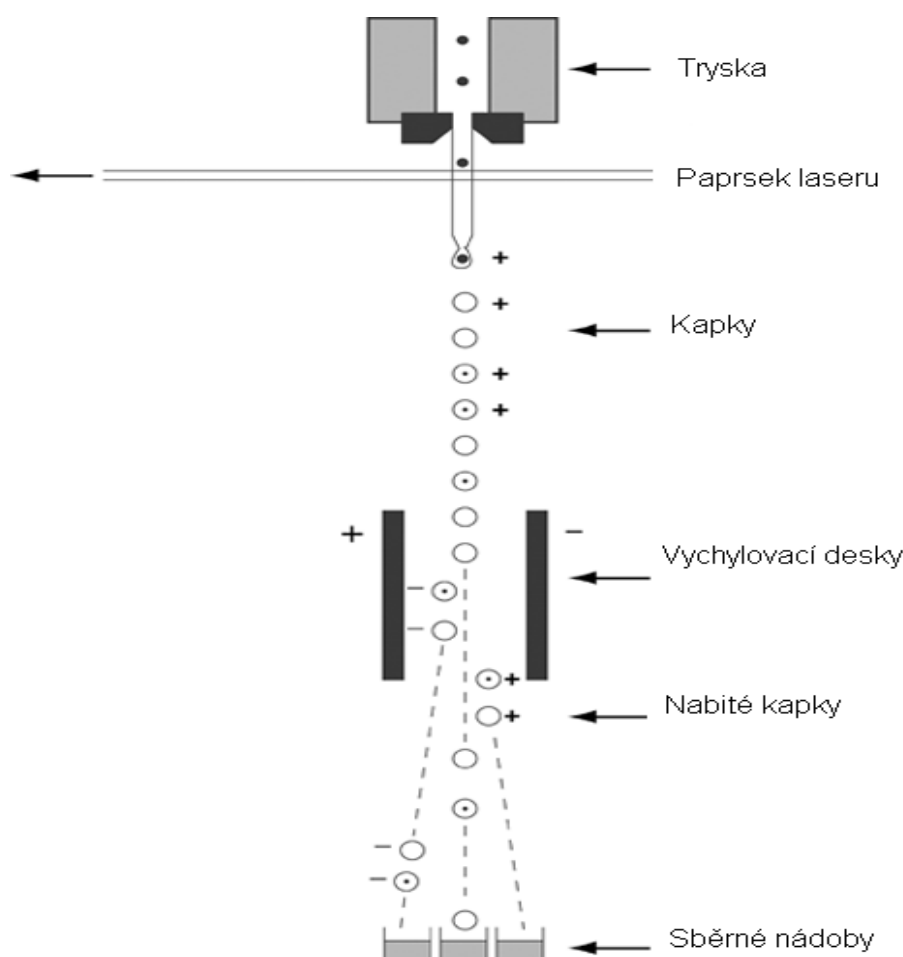
Fotony dopadající na detektor (fotodioda nebo fotonásobič) jsou převedeny na tok elektronů sekundární emise, signál je proporcčně zesílen (vynásoben) na měřitelné hodnoty elektrického proudu, který je v následujícím derivátoru převeden na napěťový pulz. Jeho nejvyšší hodnota odpovídá pozici měřené částice ve středu laserového paprsku a tedy nejvyšší hodnotě fluorescence či rozptylu, jinak řečeno, amplituda pulzu odpovídá počtu detekovaných fotonů.

Zesílení signálu lze provést zvýšením napětí mezi katodou a anodou fotonásobiče, tedy generováním vyššího proudu, nebo navýšením zisku zesilovače, což se v praxi kombinuje. Také je možno využít fotonásobič s vyšším počtem elektrod (dynod). Zesilovač může být nastaven tak, aby jeho zesílení probíhalo lineárně nebo logaritmicky. Lineární způsob je využíván k zesílení hodnot dopředného a bočního rozptylu a fluorescenčního signálu, logaritmický způsob je obvykle potřebný k odlišení slabého signálu od šumu pozadí.

V následném kroku je v ADC převodníku (Analog-to-Digital Converter) přidělena napěťovému pulzu digitální proměnná tak, že pulzu o napětí 0 – 1000 mV je přidělen digitální kanál 0 - 1000 [169]. Číslo kanálu je pomocí rozhraní GPIO (General Purpose In/Out) převedeno do počítače, zobrazeno v odpovídající poloze na data plotu a uloženo do paměti. Uložená data mohou být zobrazena různými způsoby v závislosti na metodě analýzy.

## Sortování

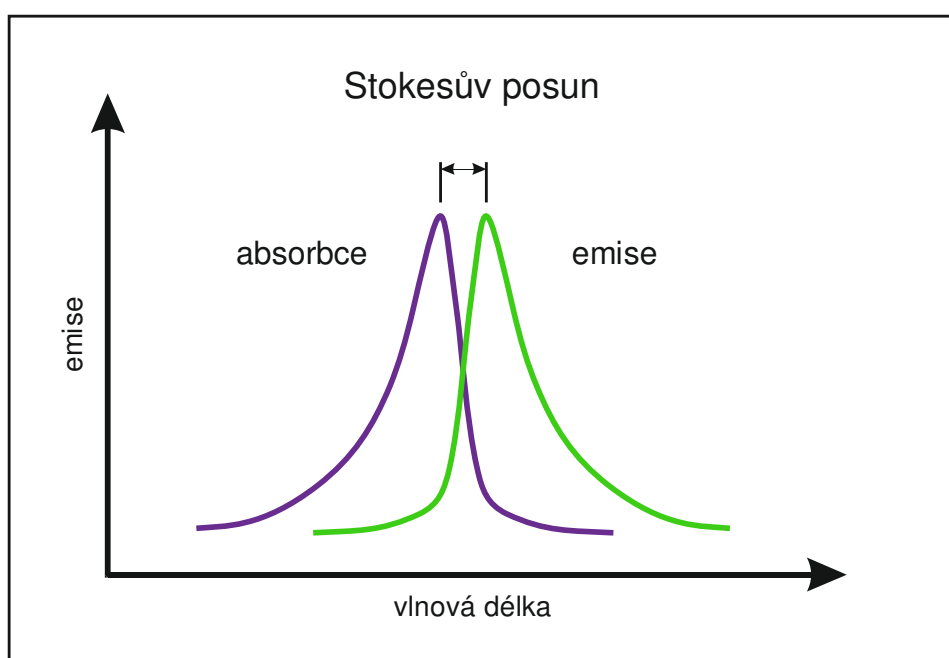
Pokročilou nadstavbou specializovaných cytometrů je možnost oddělit ze vzorku cílovou populaci pomocí sortování. Nejpoužívanější technické řešení spočívá v roztržení proudu nosné kapaliny kmitajícím piezoelektrickým krystalem do uniformních kapek, z nichž každá nese právě jednu buňku [169]. Vlastní cytometrická analýza je provedena před tímto krokem a buňkám jsou přiřazeny naměřené hodnoty. Splňuje-li analyzovaná buňka předem nastavené parametry a je tedy vybrána pro sortování, pak je kapka ji obsahující v okamžiku svého formování nabita elektrickým nábojem, dle potřeby pozitivním či negativním, což umožňuje souběžné oddělování dvou populací. V průběhu pádu se kapky dostávají mezi dvě vodivé, elektricky nabitě desky, kdy efekt elektrostatické deflektace vede k vychýlení nabitých kapek do sběrných nádob. Kapky, které nenesou zájmovou populaci buněk, nejsou nabity, deflektace se tedy neprojevuje [170].



Obr. 5. Schéma sortovacího modulu [170]

### 4.2.3. Fluorescence

Fluorescence je kvantově mechanický jev spočívající v uvolnění části excitační energie elektronu ve formě fotonu [171]. Elektrony fluorochromu jsou v případě průtokové cytometrie excitovány nejčastěji laserovým zářením specifické vlnové délky, která odpovídá absorpčnímu maximu užitého fluorochromu. Tím dojde k přechodu elektronu na vyšší energetický stav, popřípadě na stav valenční. Část excitační energie je spotřebována na změny rotačně vibračního stavu molekuly, nicméně většina této energie je při návratu elektronu na původní energetickou hladinu vyzářena do okolí ve formě fotonů o nižší energii, tedy větší vlnové délce, než fotony excitující [169]. Rozdíl mezi vlnovou délkou excitujícího a emitovaného záření nazýváme Stokesův posun, jehož hodnoty u jednotlivých fluorochromů jsou zásadní při sestavování vícebarevného experimentu. Viz Obr. 6.

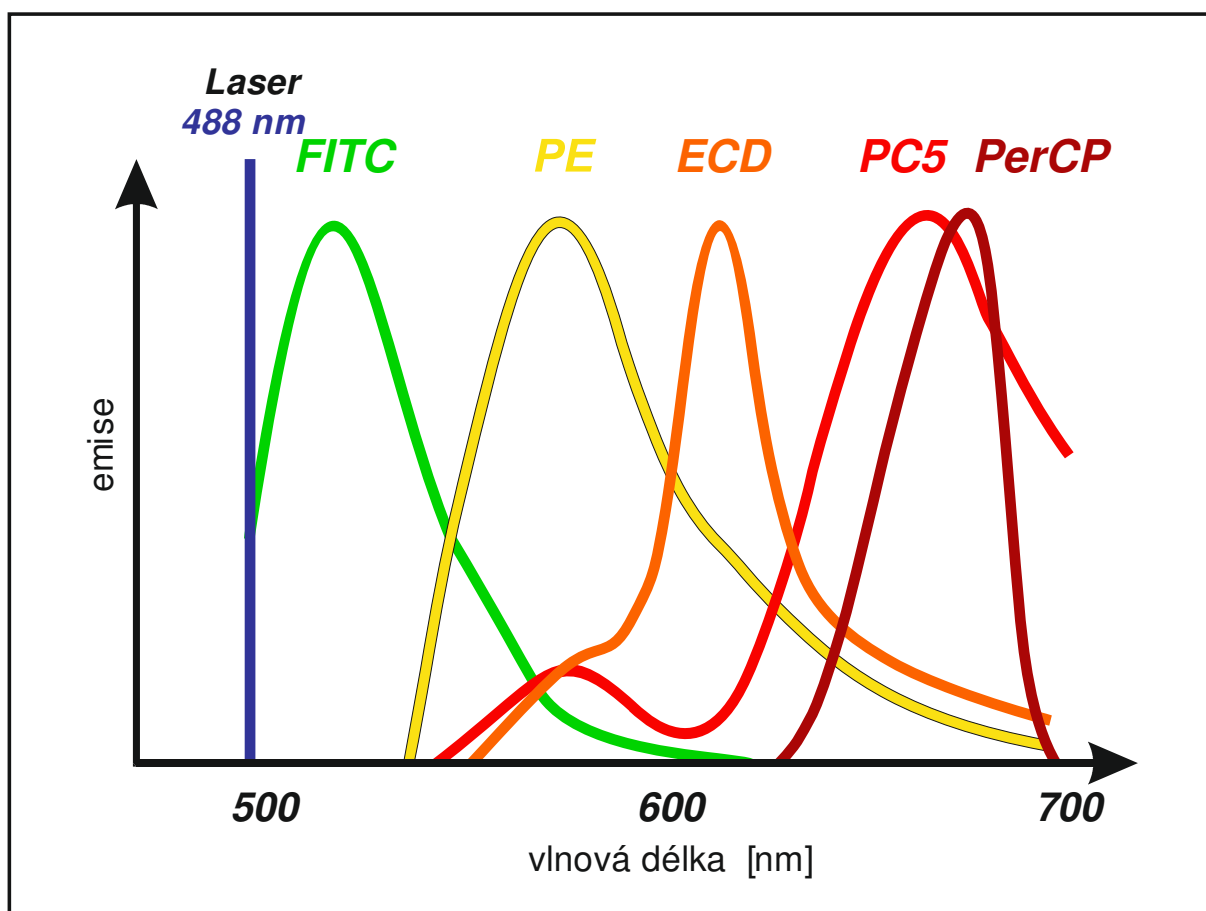


Obr. 6. Stokesův posun [171]

V praxi se používají fluorochromy s absorpčními maximy dosažitelnými excitací komerčně dostupnými lasery, a to buď jako fluorochromy samostatné nebo tandemové, u kterých je využito přenosu energie (FRET- Förster (fluorescence) resonant energy transfer) mezi fluorochromem sloužícím jako donor a fluorochromem akceptorovým. To vede k navýšení hodnoty Stokesova posunu, což umožňuje využít širší paletu fluorescenčních barviv.

Použití více fluorochromů v jednom experimentu (zkumavce) umožňuje detekci několika znaků na jedné buňce současně, což dramaticky zvyšuje výpovědní hodnotu analýzy. Některá klinicky

zásadní stanovení (např. sledování minimální reziduální nemoci) by nebyla bez vícebarevné průtokové cytometrie vůbec možná. Užití více fluorochromů však s sebou přináší zásadní komplikaci, jejíž vyřešení je u mnohobarevných stanovení nezbytné. Jedná se o problematiku kompenzace fluorescenčního přesahu. Jak bylo uvedeno výše, excitované fluorochromy vyzařují v intervalu vlnových délek označovaném jako emisní spektrum. Jádrem problému spočívá ve skutečnosti, že emisní spektra jednotlivých fluorochromů se mohou výrazně překrývat, jak je patrné z Obr. 7., což v nekompensovaném experimentu vede k detekci emisního záření jednoho fluorochromu více detektory a tak k závažné chybě měření. Cílem kompenzace je tedy matematická korekce signálu detektorů tak, aby byl emisní přesah korigován.



Obr. 7. Příklad překryvu emisních spekter fluorochromů [169]

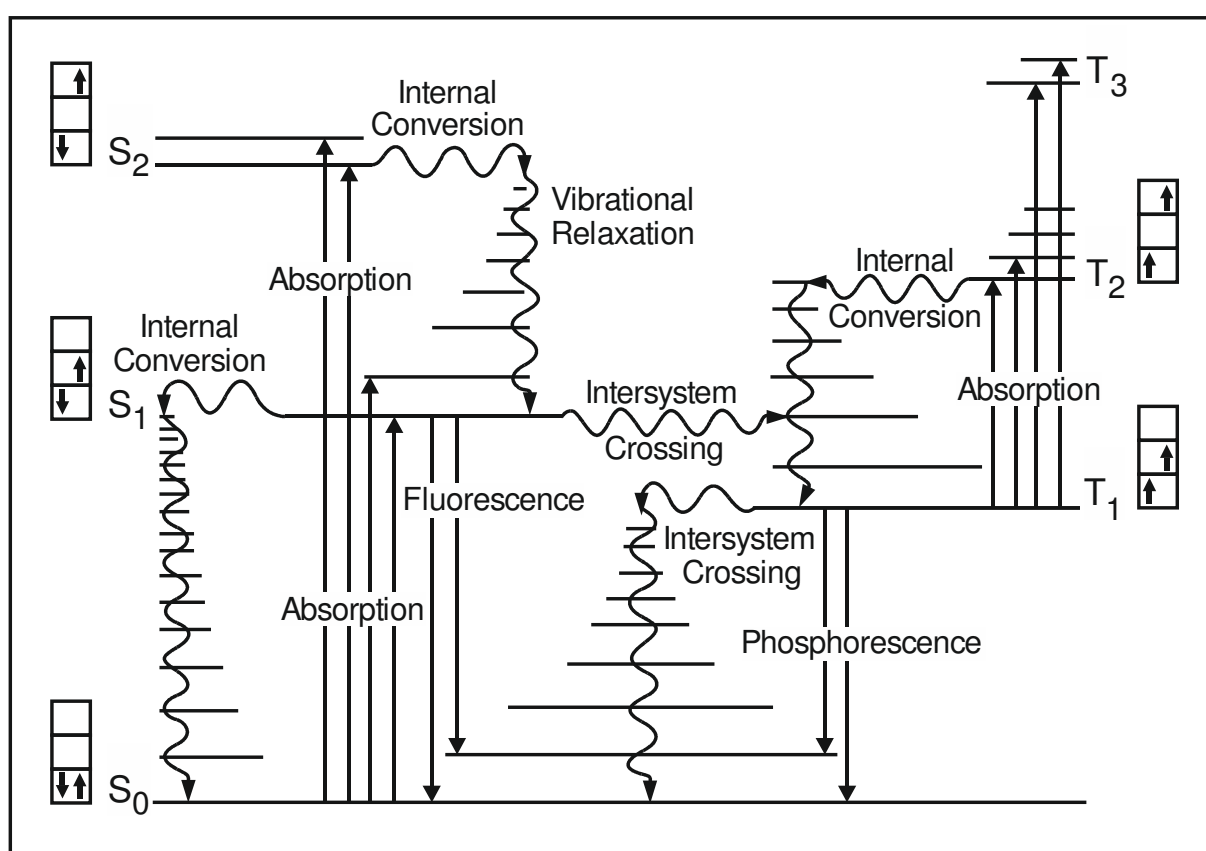
#### 4.2.4. Interakce záření a analytu

Interakce analyzovaných částic se světelným zářením jsou dvojího typu:

- 1) interakce záření s navázanou značenou protilátkou
- 2) jevy ohybu, odrazu a absorpce - tzv. light scatter

ad 1) Při excitaci fotonů o energii odpovídající absorpčnímu maximu použitého fluorochromu dojde k přechodu elektronů v horních vrstvách molekuly na vyšší energetické hladiny. Část dodané energie je transformována v rámci nezářivých procesů, tedy při jevech, které nejsou spojeny s emisí fotonů (změny rotačně-vibračního stavu, atd.), zbytek se při přechodu na původní energetický stav uvolní ve formě fluorescence a případně fosforescence [171]. V obou případech jde o kvantově mechanické jevy spojené s přechody z vyšších orbitalů na nižší, respektive základní energetický stav. Pro praktickou cytometrii má význam pouze fluorescence.

Jevy spojené s výše uvedenými změnami stavů demonstruje Jablonského diagram. Viz Obr. 8.



Obr. 8. Jablonského diagram [171]

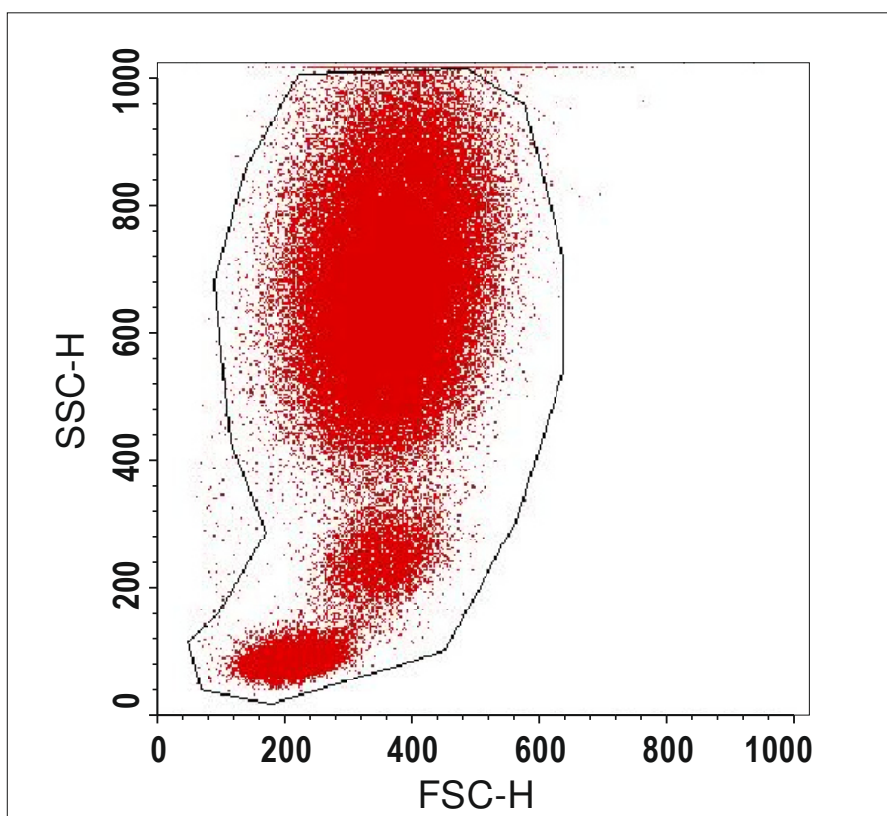
ad 2) Jevy souhrnně označované jako rozptylové (light scatter) závisejí na fyzikálních parametrech buňky, především na její velikosti a vnitřní komplexitě, zejména pak na densitě vnitřního obsahu (velikost jádra, membránové organely, granulární materiál)



Light scatter dále dělíme na dva typy:

- a) Dopředný rozptyl (FCS) označuje měření v rovině procházejícího světla a jeho velikost odpovídá povrchu buňky, popř. jiné analyzované částice. FCS je měřen fotodiodou umístěnou v rovině procházejícího světla.
- b) Bočný rozptyl (SSC) odpovídá měření interference světla s denzními strukturami uvnitř buňky. Jedná se zejména o jevy ohybu a odrazu světelného paprsku, z tohoto důvodu je SSC měřen detektorem umístěným v úhlu  $90^\circ$  od roviny procházejícího světla.

Sloučením hodnot FSC a SSC do prostoru definovaného osami  $x$  a  $y$ , které odpovídají hodnotám FSC a SSC, získáme dvojrozměrné uspořádání analyzovaných částic dle jejich velikosti a denzity vnitřního obsahu. V případě analýzy tělních tekutin se buňky rozdělí do tzv. třípopulačního diferenciálu, ve které je možno rozlišit populace lymfocytů, monocytů a granulocytů od případného debris. Obr. 9.



Obr. 9. Scattergram FSC  $\times$  SSC

#### 4.2.5. Protilátky

Fluorochromy jsou v naprosté většině konjugovány s monoklonální protilátkou, která zajišťuje specifickou vazbu na cílovou strukturu. Pro diagnostické účely se používají komerčně syntetizované monoklonální protilátky, získávané většinou ze specificky imunizovaných myší. Imunizovaný organismus syntetizuje paletu polyklonálních protilátek, odpovídající množství aktivovaných lymfocytů, které jsou v následném kroku izolovány *ex vivo*, imortalizovány fúzí s plazmatickými buňkami a pěstovány v čisté kultuře [169]. Tato tzv. hybridomová technologie umožňuje využít jediný aktivovaný lymfocyt ke komerční produkci imunoglobulinů, identických jak v antigenní determinantě, tak ve všech dalších biologických, fyzikálních a chemických vlastnostech. Vhodné klony jsou poté separovány a použity k produkci monoklonálních protilátek. Tyto protilátky, naplňující představu prof. Ehrlicha o „kouzelné střele“ schopné nalézt cílovou buňku mezi mnoha podobnými, mají přesně definovanou třídu i podtřídu, specifické zaměření proti cílovému epitopu a definovanou specificitu, čímž umožňují standardizaci metody včetně vnější i vnitřní kontroly kvality a tím přispívají k možnosti mezilaboratorní kontroly výsledků.

## **4.3. Využití**

### **4.3.1. Biomedicínské vědy**

Průtoková cytometrie je analytickou metodou využívanou v mnoha odvětvích biologických a medicínských věd. Mnoho diagnostických postupů, zejména v hematologii a nádorové biologii, imunologii a molekulární patologii, je v současné době postaveno na multiparametrických analýzách buněčných populací prováděných pomocí průtokové cytometrie.

V hematologii se jedná především o imunofenotypizaci, tedy o vyšetření kvalitativní i kvantitativní přítomnosti specifických markerů jak na povrchu buněk, tak v cytoplazmě či v jádře a dále o stanovení minimální reziduální nemoci, respektive sledování zastoupení nádorových buněk v různých tělesných kompartmentech nemocného [172].

Imunologické analýzy se zaměřují na sledování aktivity lymfocytárních subpopulací, např. na problematiku cytotoxických reakcí závislých na protilátkách (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC), tedy, na aktivaci jednotlivých T-lymfocytárních populací ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , NK buňky), imunitní reakce (např. enzymy oxidativního vzplanutí) a další [173].

Molekulární biologie, molekulární patologie a nádorová biologie využívá cytometrických metod například pro analýzu buněčného cyklu a buněčné kinetiky stanovením nukleových kyselin, pro vyšetření a případně sortování chromozomů, velký význam má cytometrie pro výzkum mechanismů apoptózy (mitochondriální membránové potenciály, změny permeability membrán, aktivace apoptotických drah, degradace DNA, atd.) [169], klinicky významné je sledování vzniku lékových rezistencí u nádorových buněk, zvláště vícečetné lékové rezistence (multidrug resistance, MDR).

Ve vědeckovýzkumných aplikacích se setkáváme např. s analýzou exprese a lokalizace proteinů v proteomických experimentech, s měřením fosforylace a jiných forem značení, s využitím fluorescenčních proteinů a podobně.

Rozsáhlé je použití cytometrických metod u rostlin a mikroorganismů, v oblasti buněčné a molekulární biologie rostlin bylo dosaženo značného pokroku v oblasti sledování velikosti a struktury genomu, ploidie, analýzách plastidů, atd. Výsledky nacházejí praktické uplatnění např. ve šlechtitelství a fytopatologii [174].

Cytometrické metody detekce a kvantifikace pronikají i do bakteriologie a virologie, ať jako součást biotechnologických procedur, tak v medicínském, případně vojensko-bezpečnostním uplatnění. Kruh se uzavírá analýzami fytoplanktonu, jehož fotosyntetické pigmenty stály u počátku používání fluorochromů v cytometrii.

Typ analýzy	příklad
<b>Povrchové antigeny</b>	Imunofenotypizace v CD systému, receptory pro interleukiny, HLA-typizace, detekce MRD
<b>Intracelulární antigeny</b>	cy Ig, cy CD3, cy CD22, gen <i>BCR/ABL</i> , FoxP3 atd.
<b>DNA</b>	Stupeň ploidie, kinetika buněčného cyklu, sortování chromozomů
<b>Apoptóza</b>	Rhodamin 123, TRAIL, kaspázy, atd.
<b>Protilátky</b>	Stanovení autoprotilátek proti erytrocytům, trombocytům, granulocytům, křížové zkoušky, atd.
<b>Funkční studie</b>	Funkce neutrofilů, fagocytóza, cytotoxické reakce, markery zánětu-CD64, cytokiny
<b>Buněčné prostředí</b>	Intracelulární Ca <sup>2+</sup> , Intracelulární pH, membránový potenciál
<b>Průnik léčiv do buňky</b>	Adriamycin, anthracyklin, methotrexát
<b>Testování alergií</b>	Test degranulace bazofilů
<b>Buněčná signalizace</b>	Fosforylace a defosforylace proteinů
<b>Ostatní</b>	Fetomaternální transfúze, cirkadiální periodicitu, viabilita spermatu
<b>Nelékařská biologie</b>	autofluorescence chlorofylu, detekce mikroorganismů, palynologické analýzy, plankton, rostlinné chromozomy, atd.

Tab. č. 5. Přehled aplikací průtokové cytometrie [169, 172, 174]

### 4.3.2. Aplikace v hematologii

V klinické praxi je hematologie spolu s imunologií nejvýznamnějším uživatelem průtokové cytometrie, mnohé skórovací tabulky diagnostických postupů jsou pak přímo postaveny na výsledcích cytometrických analýz.

Metoda umožňuje provádět stanovení z mnoha kompartmentů, nejlepších výsledků však dosahuje u analýz tekutých tkání, tj. krve, kostní dřeně, mozkomíšního moku, ascitu atd. Analýze lze podrobit i tuhé tkáně jako solidní tumory, lymfatické uzliny, plicní tkáň, slezinu a pod., avšak tyto je nutno nejprve dezintegrovat na buněčnou suspenzi, čímž se pochopitelně ztrácí část informace, zejména o charakteru postižení (nodulární versus difúzní).

Cytometrická analýza v hematologii poskytuje odpovědi na mnoho klinicky významných otázek, umožňuje mimo jiné [172, 173]:

- odlišit maligní lymfoproliferace od benigních
- klasifikovat onemocnění dle exprese povrchových či cytoplazmatických markerů
- hodnotit specifické markery mající vztah k prognóze nemocného
- stanovovat minimální reziduální nemoc a monitorovat léčebnou odpověď
- sledovat kvalitu štěpu krvetvorných buněk

Základem cytometrické diagnostiky je imunofenotypizace, postavená na detekci specifických povrchových i cytoplazmatických markerů. V případě vyšetřování hematologických malignit se zaměřuje na analýzu leukocytárních antigenů, pro které používáme souhrnné označení HLDA (Human Leucocyte Differentiation Antigens), respektive nově HCDM (Human Cell Differentiation Molecules) [175].

Lidské membránové antigeny zařazené v systému HCDM jsou definovány pomocí monoklonálních protilátek a pro přehlednost jsou zařazeny do klasifikačního systému, kde je jednotlivým antigenům přiděleno označení CD (Cluster Designation) a pořadové číslo [175].

Proti klinicky významným CD markerům jsou dostupné komerčně vyráběné monoklonální protilátky, často konjugované s několika různými fluorochromy pro sestavení vícebarevného experimentu. Mimo CD nomenklaturu však existuje mnoho dalších diagnosticky významných epitopů, proti kterým jsou k dispozici klinicky důležité protilátky (myeloperoxidáza, terminální deoxynukleotidyl transferáza, Ki-67, atd.) [173].

Principem imunofenotypizační diagnostiky je kvantitativní i kvalitativní analýza zastoupení diagnosticky významných markerů. Srovnáním výsledku měření se skórovacími tabulkami lze přiřadit zjištěný imunofenotyp konkrétní nozologické jednotce.

Známe-li z primodiagnózy imunofenotyp onemocnění daného pacienta, můžeme v průběhu léčby sledovat kvantitativní i kvalitativní změny v zastoupení nádorové populace a informovat klinika o reakci na léčbu. Důležitou prognostickou roli zde hraje i vyšetření minimální reziduální nemoci, která odpovídá počtu neoplastických buněk perzistujících po léčbě v organismu [9].

Na našem pracovišti se nejčastěji setkáváme s diagnostikou hematologických malignit. Jedná se o klonální proliferativní onemocnění vycházející z hematopoetických kmenových buněk a lymfoidních tkání v různém stupni maturace. V současné chvíli je všeobecně přijímanou hypotézou, že všechna tato onemocnění mají svůj původ v genetických abnormalitách, byť ne všechny jsou k dnešnímu datu objasněny [176]. Rozmanitosti původu odpovídá i široká paleta genetických, imunofenotypových, cytologických a dalších charakteristik, které se dále odrážejí v nejednotnosti projevů nemocí, v různém stupni malignity, reakci na léčbu, prognóze, atd.

Společným znakem a biologickým podkladem těchto onemocnění je vznik aberantních proteinů, jejichž regulační vlastnosti jsou vlivem odlišné funkce (např. chimérické proteiny u leukemií) či hypo- nebo hyperexprese (lymfomy) změněny natolik, že se postižená buňka vymaní z regulačních mechanismů a dojde k nastartování procesu onkogeneze [54].

Komplexní diagnostika hematologických malignit zahrnuje širokou paletu vyšetření, které dohromady skládají informace vedoucí k identifikaci a klasifikaci onemocnění a umožňuje tak zahájení cílené léčby. Cílem vyšetření je zjistit maximum validních informací o expresi diagnosticky relevantních markerů. Jedná se buď o kombinaci pozitivitu a negativitu běžně se vyskytujících znaků, které tvoří sestavu znaků (tzv. pattern) typický pro konkrétní onemocnění (např. CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD22<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup> u CLL), nebo o detekci typických markerů (např. DBA-44 u leukémie z vlasatých buněk).

## 5. Pracovní hypotézy a cíle disertační práce

### 5.1 Pracovní hypotézy

Interakce receptoru PD-1 (Programmed Cell Death-1) s ligandy PD-L1 a PD-L2 způsobuje trvalou aktivaci signální dráhy programované buněčné smrti. Tímto mechanismem je inhibována fyziologická aktivita efektorových T-lymfocytů a spolu s dalšími mechanismy se výrazně podílí na procesu navození imunitní nádorové tolerance. Z publikovaných údajů vyplývá, že exprese markerů programované buněčné smrti na CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech u nemocných v časných fázích CLL je spojeno se ztrátou imunitní kontroly a s agresivnějším chováním onemocnění nezávisle na prognostických markerech tumoru, věku nemocných, změnách v poolu T-regulačních lymfocytů a titru protilátek proti cytomegaloviru [177].

Předpokládáme-li, že exprese markerů dráhy programované buněčné smrti odráží schopnost nádoru modifikovat imunitní odpověď a navozovat imunotoleranci, pak by měl být nalezen signifikantní rozdíl v expresi markerů dráhy programované buněčné smrti na CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech mezi zdravými dárci krve a kohortou nemocných s CLL. Rovněž hodláme analyzovat expresi markerů programované buněčné smrti na imunokompetentních subpopulacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u jednotlivých fází onemocnění CLL, konkrétně mezi doposud neléčenými osobami a pacienty s refrakterním/relabujícím onemocněním, v jednotlivých stádiích dle Bineta, s expresí vybraných antigenů leukemických lymfocytů a dalších vybraných známých prognostických faktorů (např. mutační stav IGVH, exprese ZAP-70) s cílem ověřit, zda ji lze využít ke kvantifikaci stupně postižení mechanismů protinádorové imunity.

## **5.2 Cíle disertační práce**

Cílem práce je porovnat expresi PD-1 u nemocných s CLL a zdravých dárců krve a analyzovat vztahy mezi expresí PD-1 na efektorových T-lymfocytech, fází onemocnění, stádiem dle Bineta a dalšími markery asociovanými s prognózou CLL, a to:

1. Vyhodnocením exprese receptoru PD-1 na imunokompetentních populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL a u zdravých dárců krve.
2. Analýzou exprese receptoru PD-1 na imunokompetentních populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL v různých stádiích onemocnění, konkrétně mezi doposud neléčenými pacienty a nemocnými s refrakterním/relabujícím onemocněním a u nemocných s rozdílným stádiem dle Bineta.
3. Ověřením možného vztahu exprese receptoru PD-1 na imunokompetentních populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL s některými dalšími známými prognostickými faktory (exprese CD38 a ZAP-70, mutační stav IGVH a přítomnost prognosticky nepříznivých cytogenetických abnormalit, delecí oblasti 17p a/nebo 11q).
4. Zhodnocením exprese markeru programované buněčné smrti jako potenciálního markeru systémové imunitní dysregulace u CLL



## 6. Nemocní a metody

### 6.1 Soubor nemocných

V rámci studie bylo vyšetřeno 52 nemocných s chronickou lymfocytární leukémií diagnostikovaných na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc v letech 2012 a 2013. Pro zařazení do studie bylo nezbytné splnění diagnostických kritérií dle mezinárodních doporučení NCI-WG z roku 2008 [20].

Před vstupem do studie podepsali všichni nemocní informovaný souhlas a studie byla provedena dle zásad Helsinské deklarace [178].

Skupina nemocných s CLL byla rozdělena do dvou kategorií dle fáze onemocnění (nově diagnostikovaní nemocní doposud bez léčby versus nemocní s refrakterní/relabovanou CLL) a do tří kategorií dle Binetova stádia, poměr muži (M) : ženy (F) byl 2,2 : 1.

Ve skupině doposud neléčených nemocných [n = 30, M = 22, F = 8, Binet A = 18 (M = 8, F = 10), Binet B = 8 (M = 5, F = 3), Binet C = 4 (M = 3, F = 1)] bylo identifikováno 14 pacientů s nemutovanou formou IGVH genu (M = 7, F = 7), u 11 nemocných byla prokázána delece 17p a/nebo delece 11q (M = 8, F = 3), medián absolutního počtu leukocytů v době analýzy dosahoval  $29,51 \cdot 10^9/l$ , medián absolutního počtu lymfocytů pak  $27,5 \cdot 10^9/l$ . Medián věku nemocných v době analýzy byl 66 let (minimum 46 let – maximum 89 let).

Skupina s relabovanou/refrakterní CLL [n = 22, M = 14, F = 8, Binet A = 3 (M = 2, F = 1), Binet B = 10 (M = 6, F = 4), Binet C = 9 (M = 5, F = 4)] sestávala z 14 pacientů s nemutovanou formou IGVH genu (M = 9, F = 5), u 10 nemocných byla prokázána delece 17p a/nebo delece 11q (M = 6, F = 4), medián absolutního počtu leukocytů v době analýzy dosahoval  $29,11 \cdot 10^9/l$ , medián absolutního počtu lymfocytů pak  $28,68 \cdot 10^9/l$ . Medián věku nemocných v době analýzy byl 65 let (minimum 36 let – maximum 84 let).

Kontrolní skupinu tvořilo 15 zdravých dárců krve (7 mužů a 8 žen ve věku od 31 do 56 let, medián 43 roky).

Srovnání kohort ukázalo výraznou převahu nižších stádií dle Bineta u doposud neléčených pacientů s CLL (Binet A = 18, Binet B = 8, Binet C = 4) ve srovnání s nemocnými s refrakterní/relabovanou CLL (Binet A = 3, Binet B = 10, Binet C = 9). Binet A: doposud neléčení pacienti s CLL 60 % vers. nemocní s refrakterní/relabovanou CLL 13,6 %,  $p < 0,0001$ . Binet B: doposud neléčení pacienti s CLL 26,7 % vers. nemocní s refrakterní/relabovanou CLL 45,5 %,  $p = 0,024$ . Binet C: doposud neléčení pacienti s CLL 13,3 % vers. nemocní s refrakterní/relabovanou CLL 40,9 %,  $p < 0,0001$ . U doposud neléčených pacientů byla v 53,3 %

prokázána prognosticky příznivá mutovaná forma IGVH genu. V kohortě refrakterních/relabovaných nemocných byla mutovaná forma IGVH genu přítomna pouze v 36,4 % ( $p = 0,0481$ ).

Delece 17p a/nebo delece 11q byla u neléčených pacientů zastižena v 36,7 % případů, u refrakterních/relabovaných nemocných pak v 45,5 % ( $p = 0,068$ ).

Srovnání mediánu absolutního počtu leukocytů i lymfocytů v době analýzy vykazovalo pouze minimální rozdíly mezi oběma kohortami nemocných. Absolutní počet leukocytů u doposud neléčených nemocných  $29,51 \cdot 10^9/l$  versus absolutní počet leukocytů u relabovaných/refrakterních nemocných  $29,11 \cdot 10^9/l$ ,  $p = 0,886$  a absolutní počet lymfocytů u doposud neléčených nemocných  $27,5 \cdot 10^9/l$  versus absolutní počet lymfocytů u refrakterních/relabovaných  $28,68 \cdot 10^9/l$ ,  $p = 0,794$ . Medián věku neléčených nemocných v době analýzy byl 66 let, u relabovaných/refrakterních nemocných pak 65 let ( $p = 0,872$ ).

Základní klinická a laboratorní data z doby analýzy jsou uvedena v tabulce Tab. č. 6.

N = 52	počet	pohlaví	věk	Binet status	IGVH nemutovaný	FISH del 17p, del 11q		Leukocyty	Lymfocyty
			medián min. - max.			a/nebo	bez	medián ( $\cdot 10^9/l$ ) min. - max.	medián ( $\cdot 10^9/l$ ) min. - max.
CLL doposud neléčení	30	M = 22	66	A = 18	14	11	19	29,51	27,50
		F = 8	46-89	B = 8				7,30 – 291,30	4,00 – 275,08
				C = 4					
CLL relabování/refrakterní	22	M = 14	65	A = 3	14	10	12	29,11	28,68
		F = 8	36-84	B = 10				5,50 – 305,50	1,20 – 302,50
				C = 9					

Tab. č. 6. Základní charakteristiky kohorty nemocných v době analýzy

## **6.2 Použité metody**

### **6.2.1. Multiparametrická průtoková cytometrie**

Vzorky periferní krve byly odebírány do zkumavek Vacuette 3 ml K<sub>3</sub>EDTA, alikvoty byly značeny monoklonálními protilátkami anti CD3 FITC klon MEM-57 (Exbio Praha), anti CD4 FITC klon MEM-241 (Exbio Praha), anti CD8 PE klon MEM-31 (Exbio Praha), anti CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> PE klony LNK-16 a MEM-188 (Exbio Praha), anti PD-1 PE (CD279) klon EH12.2H7 (Biolegend), anti CD4 APC klon MEM-241 (Exbio Praha), anti CD8 PerCP klon MEM-31 (Exbio Praha), anti CD45 PerCP klon MEM-28 (Exbio Praha), anti CD45 APC klon MEM-28 (Exbio Praha) a zpracovány metodikou lyse/no-wash. Lýza erytrocytů byla prováděna přípravkem BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences). Značené buňky byly vyšetřeny na průtokovém cytometru FACSCalibur (BD Biosciences), analýza imunokompetentních subpopulací byla provedena pomocí software CellQuest Pro (BD Biosciences). Populace PD-1 (CD279) pozitivních lymfocytů byla gatována z CD3 pozitivních T-lymfocytů; minimální akvizice vyžadovala 10 000 CD3<sup>+</sup> událostí. Míra positivity byla stanovena na základě srovnání s expresí izotypových kontrol příslušných protilátek. Procentuální zastoupení CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, jakož i CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> buněk ukazuje jejich zastoupení v gate leukocytů CD45<sup>+</sup>, procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> pak jejich zastoupení v gate CD3<sup>+</sup> T-lymfocytů. Absolutní počty vyjadřují počet buněk \*10<sup>9</sup>/l.

Marker ZAP-70 byl stanovován z periferní krve pomocí monoklonálních protilátek anti CD45 PerCP klon 2D1 (BD Biosciences), anti CD5 PE klon L17F12 (BD Biosciences), anti CD19 APC klon SJ25C1 (BD Biosciences) a anti ZAP-70 Alexa Fluor klon 1E7.2 (Caltag) a činidla The Fix & Perm kit (Invitrogen). Hranice positivity byla 20%. Ke stanovení procentuálního zastoupení znaku CD38 bylo použito protilátky anti CD38 PE klon HIT2 (Exbio Praha) a anti CD45 PerCP klon MEM-28 (Exbio Praha), hranice positivity 30%.

### **6.2.2. Kontrola kvality, nejistota měření**

Validace, resp. verifikace metody byla prováděna na základě vypočtených hodnot opakovatelnosti, reprodukovatelnosti, nejistoty měření a externího hodnocení kvality (EHK) dle zpracovaného validačního protokolu. Průtokový cytometr FACS Calibur, na kterém byly analýzy prováděny, je v rámci vnitřní kontroly kvality pravidelně kalibrován pomocí mikrosfér BD Calibrite Beads (Becton Dickinson). V procesu validace/verifikace byl analyzován následující materiál: CD-Chex Plus (CE, IVD) Streck (kontrolní krev pro hodnocení CD markerů průtokovou cytometrií), vzorky periferní krve dodávané v rámci EHK SEKK a patientské vzorky

s fyziologickým a patologickým zastoupením T-lymfocytů. Ke stanovení nejistoty měření jsme použili software Kalkulačka pro výpočet odhadu kombinované nejistoty dle Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích [179].

### 6.2.3. Statistická analýza

Data byla před vlastní statistickou analýzou testována Shapirovým Wilkovým testem na normalitu. Statistická analýza byla provedena pomocí Studentova t-testu v případě normálního rozdělení a Mannova Whitneyova U testu u dat, která neměla normální rozdělení. Analýzy byly provedeny s využitím software NCSS 2001. Výsledky jsou zobrazeny jako medián absolutního počtu buněk na jeden litr periferní krve ( $\cdot 10^9/l$ ) nebo jako medián procentuálního zastoupení z gatované populace.

Stanovení statistické závislosti mezi expresí markeru CD38, ZAP - 70, delecí oblasti 17p a/nebo 11q a PD-1 bylo vypočteno pomocí stanovení Spearmanova koeficientu pořadové korelace ( $r_{sp}$ ).

K hodnocení korelací bylo použito následujícího interpretačního rámce:  $|r| = 1$  naprostá závislost (funkční závislost);  $0,90 \leq |r| < 1,00$  velmi vysoká závislost;  $0,70 \leq |r| < 0,90$  vysoká závislost;  $0,40 \leq |r| < 0,70$  střední závislost;  $0,20 \leq |r| < 0,40$  nízká závislost;  $0,00 < |r| < 0,20$  slabá (nepoužitelná) závislost;  $|r| = 0$  naprostá nezávislost.

<b> r </b>	<b>typ závislosti</b>
$ r  = 1$	naprostá (funkční)
$0,90 \leq  r  < 1,00$	velmi vysoká
$0,70 \leq  r  < 0,90$	vysoká
$0,40 \leq  r  < 0,70$	střední
$0,20 \leq  r  < 0,40$	nízká
$0,00 <  r  < 0,20$	slabá (nepoužitelná)
$ r  = 0,00$	naprostá nezávislost

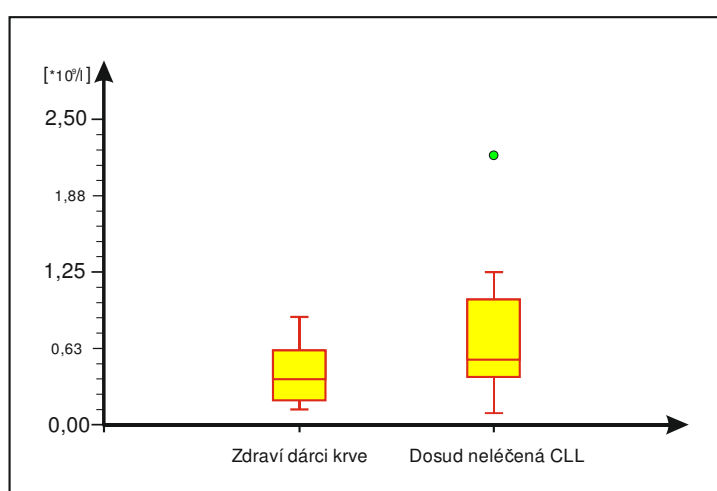
Tab. č. 7. Interpretační rámec Spearmanova korelačního koeficientu

## 7. Výsledky

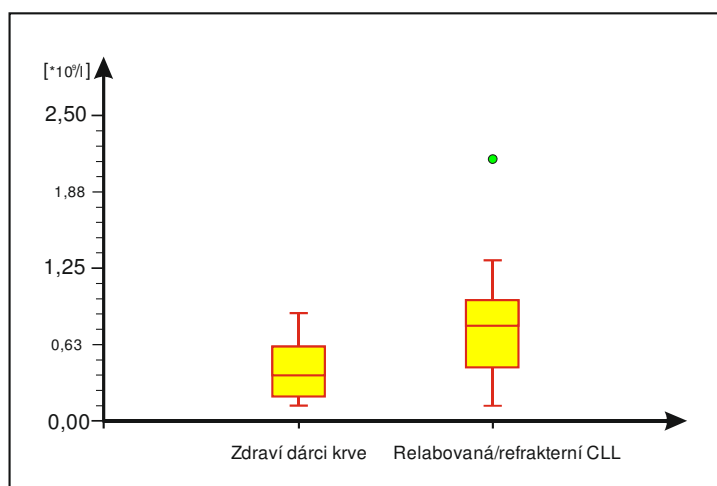
### 7.1. Zastoupení subpopulace CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> dle fáze onemocnění

Medián absolutního počtu CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> buněk vykazoval nárůst od zdravých dobrovolníků (0,412\*10<sup>9</sup>/l), přes skupinu doposud neléčených nemocných (0,674\*10<sup>9</sup>/l) k pacientům s refrakterním/relabovaným onemocněním (0,769\*10<sup>9</sup>/l).

Statisticky signifikantní rozdíl byl prokázán mezi zdravými dobrovolníky a oběma skupinami nemocných: zdraví dobrovolníci vers. doposud neléčení pacienti s CLL, 0,412\*10<sup>9</sup>/l a 0,674\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,037, a zdraví dobrovolníci vers. nemocní s refrakterním/relabovaným onemocněním, 0,412\*10<sup>9</sup>/l a 0,769\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,009.

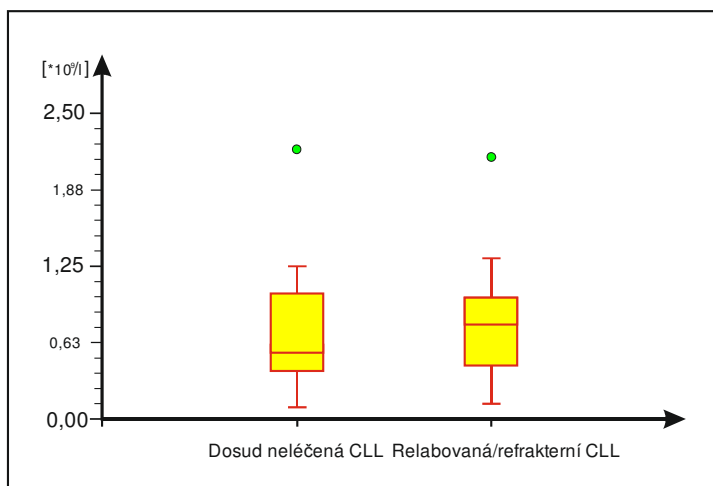


Obr. 10. CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (abs. počet) Zdraví dárce krve vers. doposud neléčení pacienti s CLL (0,412\*10<sup>9</sup>/l vers. 0,674\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,037)



Obr. 11. CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (abs. počet) Zdraví dárce krve vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL (0,412\*10<sup>9</sup>/l vers 0,769\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,009)

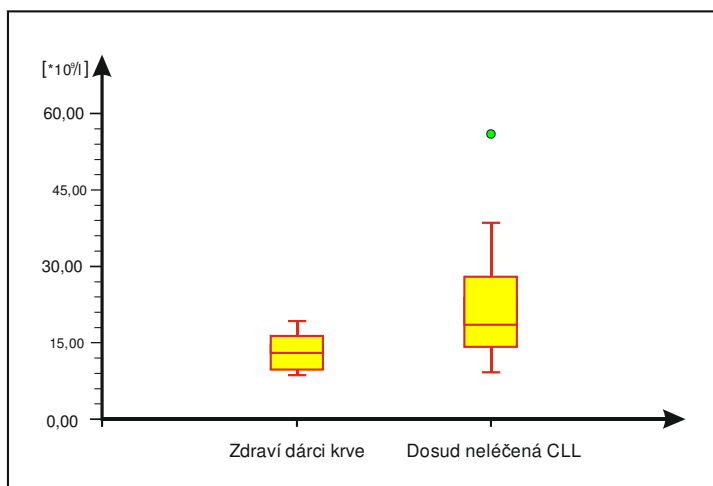
Porovnání kohort doposud neléčených nemocných s relabovanými/refrakterními odhalilo nižší zastoupení CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> subpopulace u neléčených nemocných, rozdíl však nebyl statisticky signifikantní: 0,674\*10<sup>9</sup>/l vers. 0,769\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,455. Viz Obr. 10. až 12.



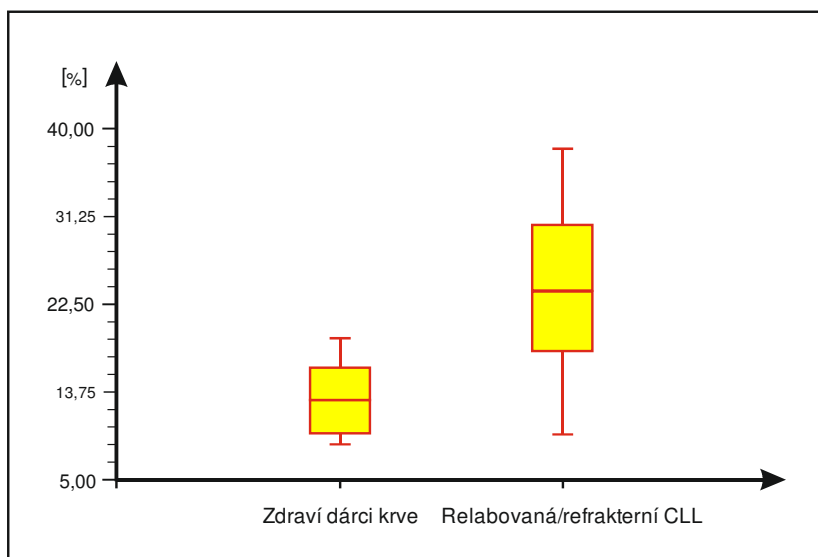
Obr. 12.  $CD4^+PD-1^+$  (abs. počet) Doposud neléčení pacienti s CLL vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL ( $0,674 \cdot 10^9/l$  vers.  $0,769 \cdot 10^9/l$ ;  $p = 0,455$ )

Procentuální zastoupení  $CD4^+PD-1^+$  subpopulace vzrůstalo od zdravých dárců (13,22 %) přes skupinu doposud neléčených nemocných (21,30 %) k nejvyšším hodnotám naměřeným u nemocných s relabovaným/refrakterním onemocněním (23,715 %). Statisticky významné rozdíly byly prokázány v procentuálním zastoupením  $CD4^+PD-1^+$  buněk jak mezi zdravými dárci a doposud neléčenými: 13,22 % vers. 21,30 %;  $p = 0,005$ , tak mezi zdravými dárci a refrakterními/relabovanými nemocnými: 13,22 % vers. 23,715 %;  $p < 0,0001$ .

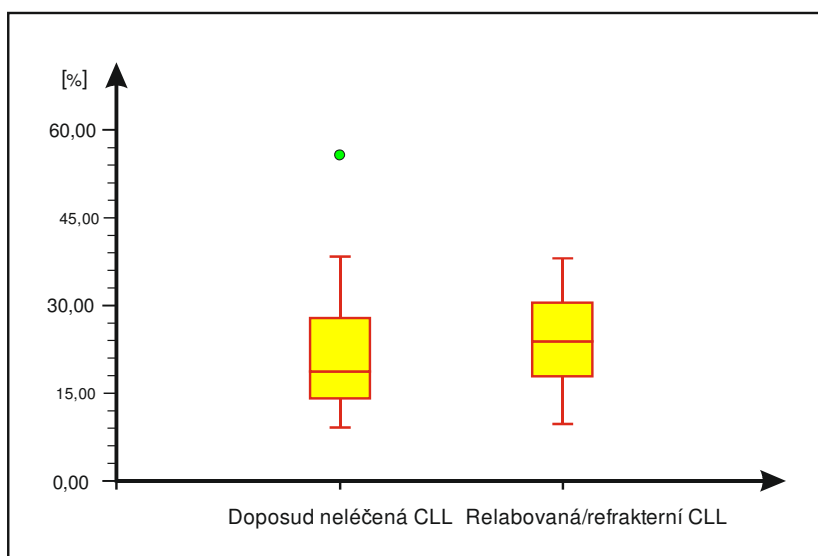
Bylo též prokázáno nižší zastoupení  $CD4^+PD-1^+$  subpopulace ve skupině neléčených nemocných, které však nebylo statisticky významné: 21,30 % vers. 23,715 %;  $p = 0,363$ . Viz Obr. 13. až 15.



Obr. 13.  $CD4^+PD-1^+$  (%) Zdraví dárci krve vers. doposud neléčení pacienti s CLL (13,22 % vers. 21,30 %;  $p = 0,005$ )



Obr. 14.  $CD4^+PD-1^+$  (%) Zdraví dárci krve vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL  
(13,22 % vers 23,715 %;  $p < 0,0001$ )



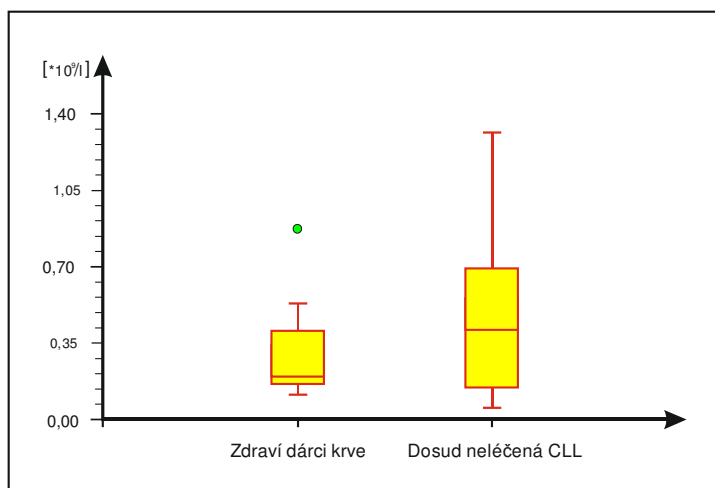
Obr. 15.  $CD4^+PD-1^+$  (%) Doposud neléčení pacienti s CLL vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL  
(21,30 % vers 23,715 %;  $p = 0,362656$ )

## 7.2. Zastoupení subpopulace CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> dle fáze onemocnění

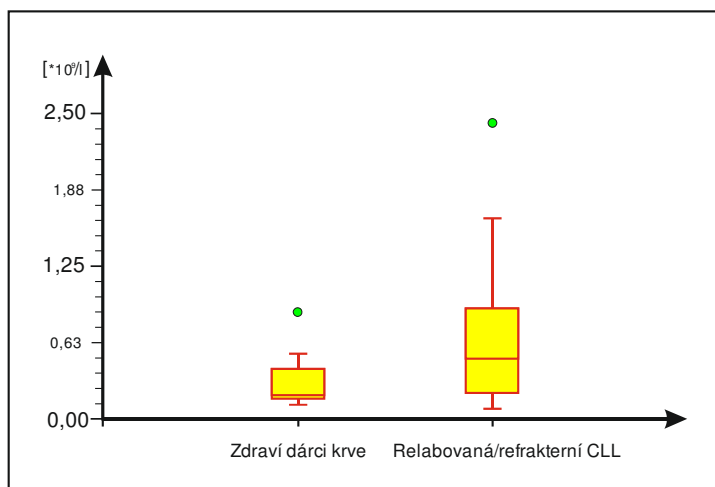
Absolutní počet CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> buněk měl vzrůstající tendenci od zdravých dobrovolníků (0,298\*10<sup>9</sup>/l), přes skupinu doposud neléčených nemocných (0,494\*10<sup>9</sup>/l) k pacientům s refrakterním/relabovaným onemocněním (0,645\*10<sup>9</sup>/l).

Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi zdravými dobrovolníky a oběma skupinami nemocných: zdraví dobrovolníci vers. doposud neléčení pacienti s CLL, 0,298\*10<sup>9</sup>/l vers. 0,494\*10<sup>9</sup>/l;  $p = 0,007$ , a zdraví dobrovolníci vers. nemocní s refrakterním/relabovaným onemocněním, 0,298\*10<sup>9</sup>/l vers. 0,645\*10<sup>9</sup>/l;  $p = 0,032$ .

Porovnání kohort doposud neléčených nemocných s relabovaným/refrakterním onemocněním ukázalo nižší zastoupení CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> subpopulace u neléčených nemocných, rozdíl však nebyl statisticky signifikantní: 0,494\*10<sup>9</sup>/l vers. 0,645\*10<sup>9</sup>/l;  $p = 0,254$ . Viz Obr. 16. až 18.

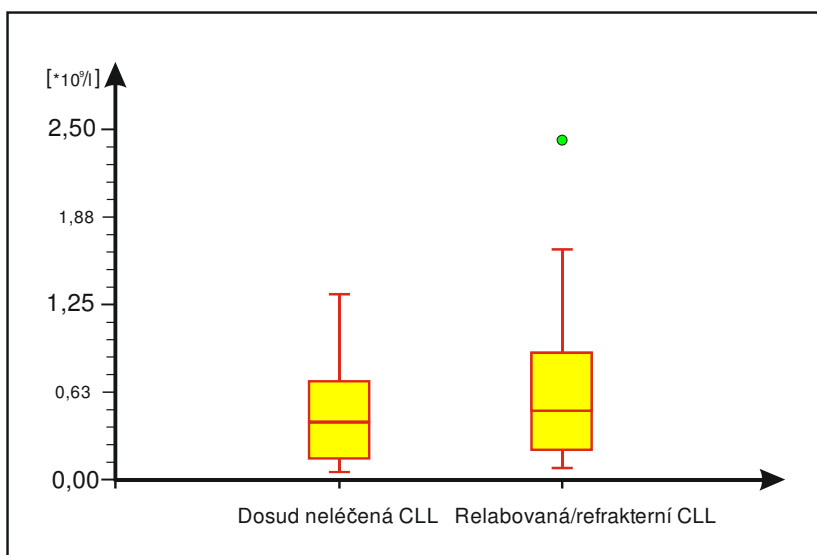


Obr. 16. CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (abs. počet) Zdraví dárci krve vers. doposud neléčení pacienti s CLL (0,298\*10<sup>9</sup>/l vers 0,494\*10<sup>9</sup>/l;  $p = 0,007$ )



Obr. 17. CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (abs. počet) Zdraví dárci krve vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL (0,298\*10<sup>9</sup>/l vers. 0,645\*10<sup>9</sup>/l;  $p = 0,032$ )

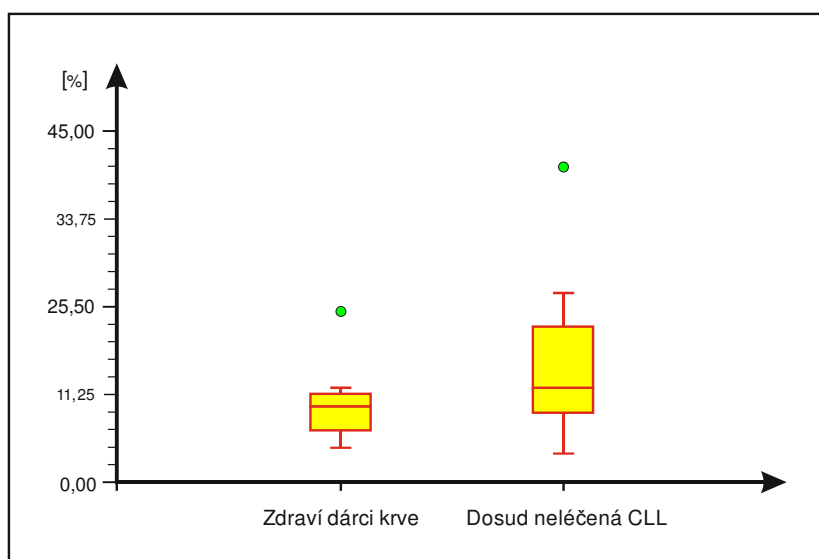




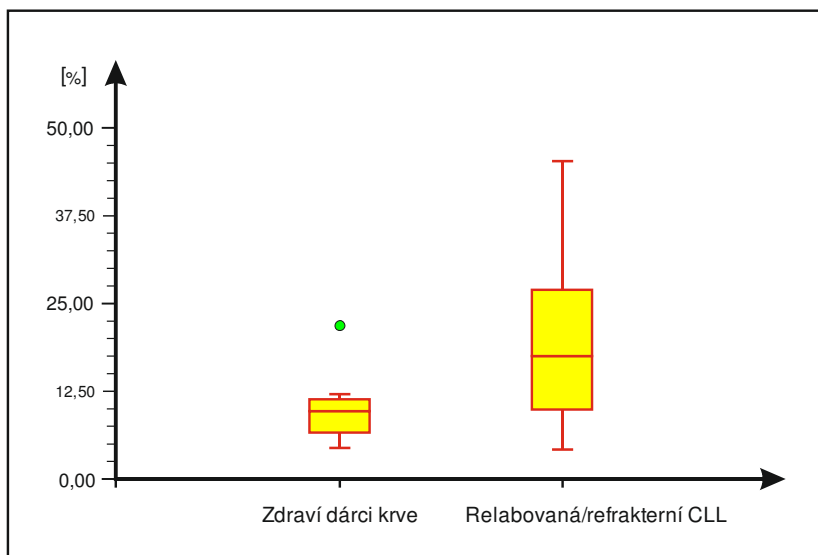
Obr. 18. CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (abs. počet) Doposud neléčení pacienti s CLL vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL (0,494\*10<sup>9</sup>/l vers 0,645\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,254)

Procentuální zastoupení CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> subpopulace vzrůstalo od zdravých dárců (9,67 %), přes skupinu doposud neléčených nemocných (14,96 %) k nejvyšším hodnotám naměřeným u nemocných s relabovaným/refrakterním onemocněním (19,78 %). Statisticky významné rozdíly byly prokázány v procentuálním zastoupením CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> buněk jak mezi zdravými dárci a doposud neléčenými: 9,67 % vers. 14,96 %; p = 0,033, tak mezi zdravými dárci a refrakterními/relabovanými nemocnými: 9,67 % vers. 19,78 %; p = 0,004.

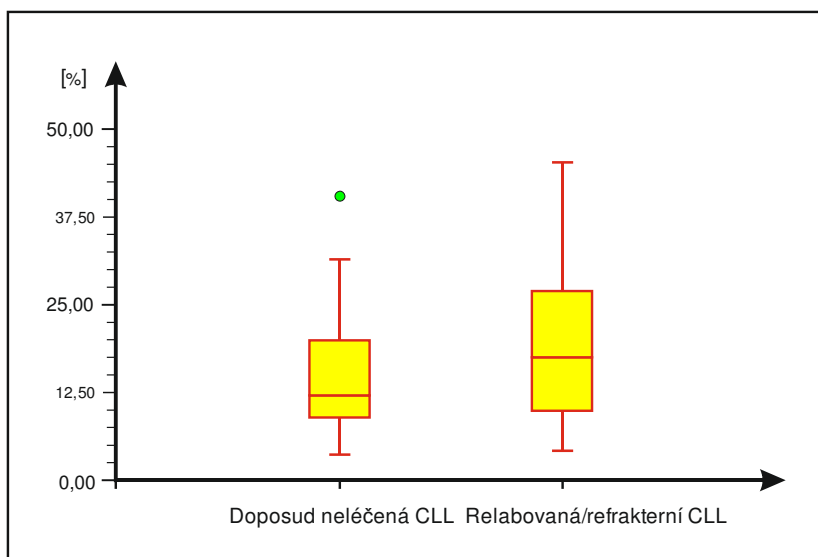
I zde bylo prokázáno nižší zastoupení CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> subpopulace ve skupině neléčených nemocných, které však nebylo statisticky významné: 14,96 % vers. 19,78 %; p = 0,254. Viz Obr. 19. až 21.



Obr. 19. CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (%) Zdraví dárci krve vers. doposud neléčení pacienti s CLL (9,67 % vers. 14,96 %; p = 0,033)



Obr. 20. CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (%) Zdraví dárce krve vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL (9,67 % vers. 19,78 %;  $p = 0,004$ )



Obr. 21. CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> (%) Doposud neléčení pacienti s CLL vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL (14,96 % vers. 19,78 %;  $p = 0,136241$ )

### 7.3. Subpopulace CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> dle Binetova stádia

Srovnání mediánu absolutního počtu CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> subpopulace u jednotlivých skupin nemocných v různých stádiích onemocnění dle Bineta neprokázalo žádný statisticky signifikantní rozdíl:

Binet A 0,5846\*10<sup>9</sup>/l vers. Binet B 0,5783\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,942

Binet A 0,5846\*10<sup>9</sup>/l vers. Binet C 0,5264\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,769

Binet B 0,5783\*10<sup>9</sup>/l vers. Binet C 0,5264\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,713

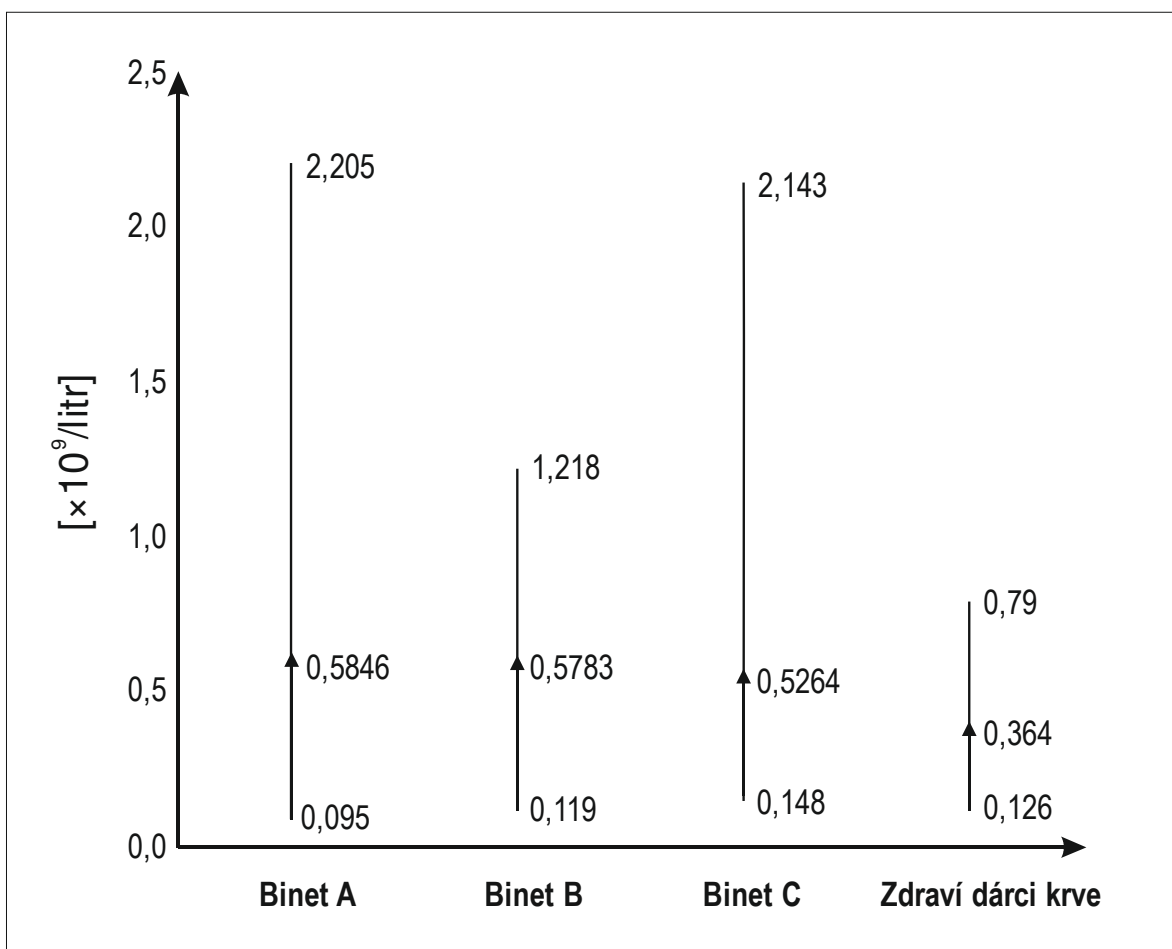
Statisticky signifikantní rozdíl nebyl nalezen ani mezi kontrolní kohortou zdravých dárců krve (HV) a nemocnými:

Binet A 0,5846\*10<sup>9</sup>/l vers. HV 0,3640\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,241

Binet B 0,5783\*10<sup>9</sup>/l vers. HV 0,3640\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,232

Binet C 0,5264\*10<sup>9</sup>/l vers. HV 0,3640\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,108.

Viz Obr. 22.



Obr. 22. Absolutní počet CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> buněk u pacientů s CLL ve stádiích dle Bineta a zdravých dárců krve

#### 7.4. Subpopulace CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> dle Binetova stádia

Statisticky signifikantní rozdíl v mediánu absolutního počtu CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-lymfocytů mezi jednotlivými skupinami nemocných v různých stádiích onemocnění dle Bineta nebyl nalezen:

Binet A 0,4339\*10<sup>9</sup>/l vers. Binet B 0,4336\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,973

Binet A 0,4339\*10<sup>9</sup>/l vers. Binet C 0,4090\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,816

Binet B 0,4336\*10<sup>9</sup>/l vers. Binet C 0,4090\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,816.

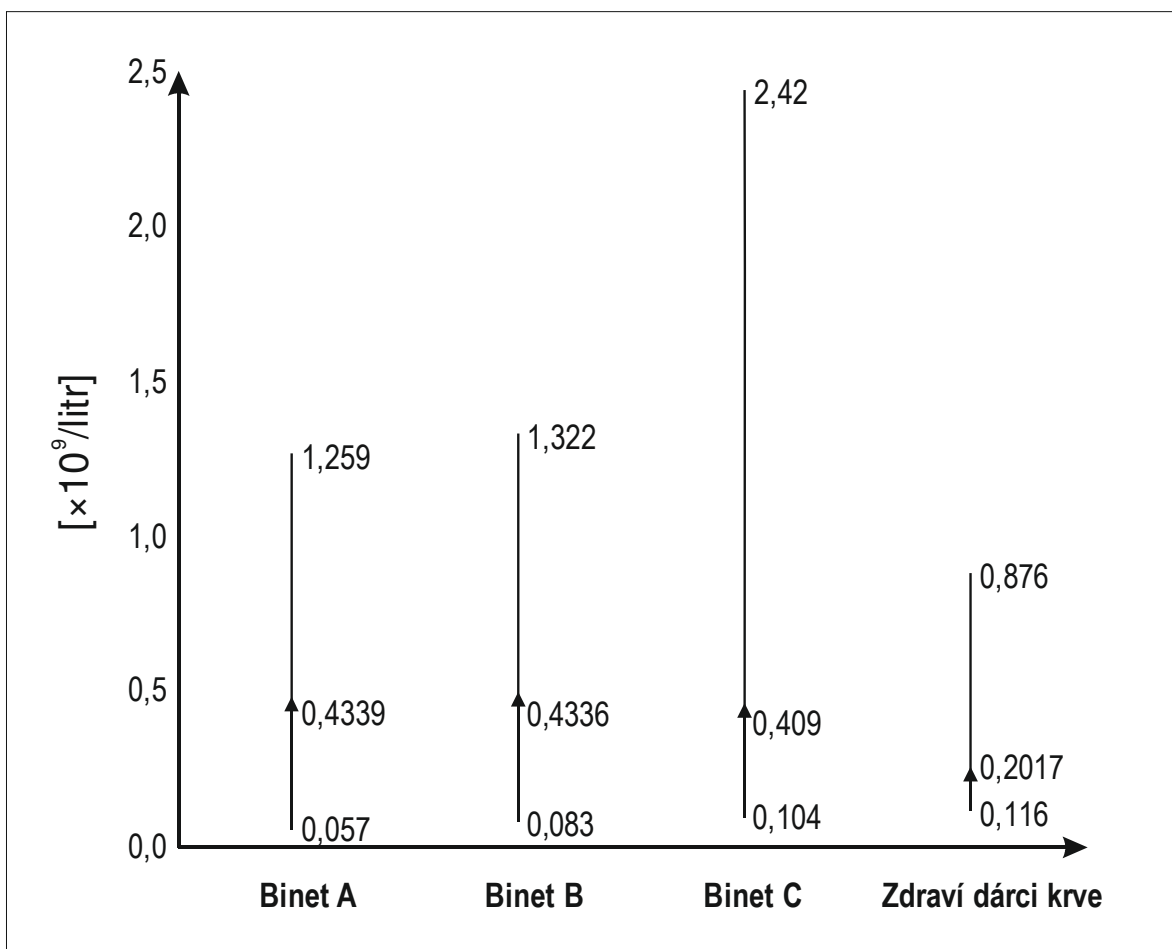
Jediný statisticky signifikantní rozdíl byl prokázán ve srovnání mezi kontrolní kohortou zdravých dárců krve (HV) a jednotlivými skupinami nemocných dle Binetova stádia:

Binet A 0,4339\*10<sup>9</sup>/l vers. HV 0,2017\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,012

Binet B 0,4336\*10<sup>9</sup>/l vers. HV 0,2017\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,012

Binet C 0,4090\*10<sup>9</sup>/l vers. HV 0,2017\*10<sup>9</sup>/l; p = 0,037.

Viz Obr. 23.



Obr. 23. Absolutní počet CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> buněk u pacientů s CLL ve stádiích dle Bineta a zdravých dárců krve

### 7.5. Korelace prognostických znaků a PD-1 na CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>PD-1

Analýzou korelací získaných výpočtem Spearmanova korelačního koeficientu byly zjištěny následující skutečnosti:

CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a CD38:  $r_{Sp} = 0,142$  slabá (nepoužitelná) závislost;

CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a CD38:  $r_{Sp} = 0,092$  slabá (nepoužitelná) závislost.

CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a ZAP-70:  $r_{Sp} = 0,168$  slabá (nepoužitelná) závislost.

CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a ZAP-70:  $r_{Sp} = 0,175$  slabá (nepoužitelná) závislost.

CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a delece oblasti 17p a/nebo 11q:  $r_{Sp} = 0,116$  slabá (nepoužitelná) závislost,

CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a delece oblasti 17p a/nebo 11q:  $r_{Sp} = 0,183$  slabá (nepoužitelná) závislost.

CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a přítomností mutované formy genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGVH<sup>MUT</sup>):  
 $r_{Sp} = 0,452$  střední závislost.

CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a přítomností mutované formy genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGVH<sup>MUT</sup>):  
 $r_{Sp} = 0,584$  střední závislost.

Medián absolutního počtu PD-1<sup>+</sup> buněk na CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech u nemocných s mutovanou formou IGVH genu (IGVH<sup>MUT</sup>) byl signifikantně vyšší, než u nemocných bez přítomnosti této mutace (IGVH<sup>UNMUT</sup>):

CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> IGVH<sup>MUT</sup>  $0,628 \cdot 10^9/l$  vers. CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>IGVH<sup>UNMUT</sup>  $0,345 \cdot 10^9/l$ ,  $p = 0,025$ .

CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> IGVH<sup>MUT</sup>  $0,561 \cdot 10^9/l$  vers. CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>IGVH<sup>UNMUT</sup>  $0,238 \cdot 10^9/l$ ,  $p = 0,037$ .

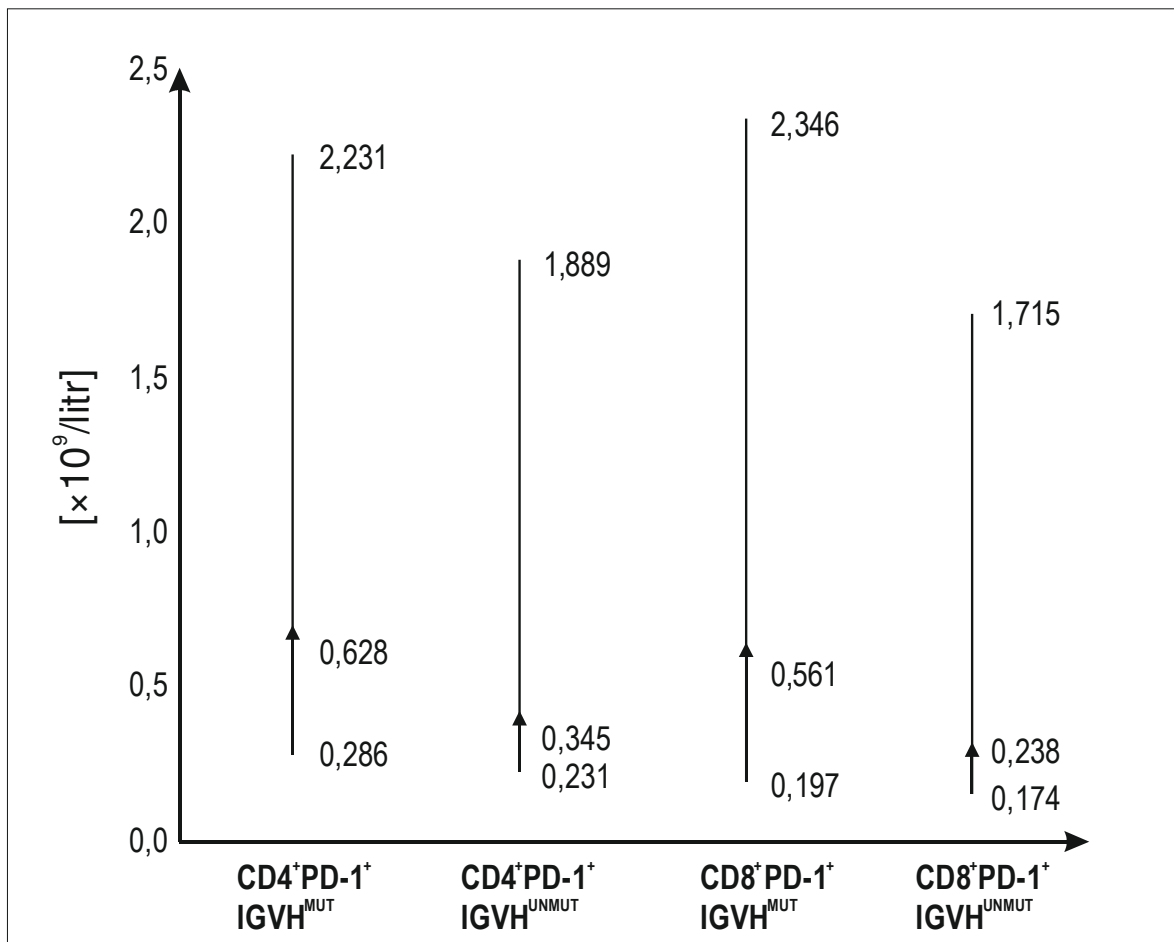
Byla prokázána průkazná korelace mezi expresí PD-1 na subpopulacích CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a přítomností mutované formy genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGVH<sup>MUT</sup>). Použitelná korelace mezi expresí CD38, ZAP-70 a přítomností prognosticky nepříznivých cytogenetických abnormalit (delece oblasti 17p a/nebo 11q) nebyla nalezena.

Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro CD38, ZAP-70, delecí 17p a/nebo 11q a mutační stav IGVH genu jsou zobrazeny v Tab. č. 8.

populace	CD38	ZAP-70	del 17p/ del 11q	IGVH <sup>MUT</sup>
	( $r_{Sp}$ )	( $r_{Sp}$ )	( $r_{Sp}$ )	( $r_{Sp}$ )
PD-1 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,142	0,168	0,116	0,452
PD-1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,092	0,175	0,183	0,584

Tab. č. 8. Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro některé prognostické faktory

Mediány absolutního počtu CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-lymfocytů ve vztahu k mutačnímu stavu IGVH genu dokumentuje Obr. 24.



Obr. 24. Absolutní počet CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-lymfocytů ve vztahu k mutačnímu stavu IGVH genu

## 8. Vyhodnocení cílů dizertační práce

1. Vyhodnocení exprese receptoru PD-1 na imunokompetentních populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL a u zdravých dárců krve.

Analýza exprese markeru PD-1 na CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech prokázala statisticky významný rozdíl mezi zdravými dobrovolníky a nemocnými s CLL a to jak v procentuálním zastoupení, tak v absolutním počtu CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-lymfocytů. Výsledky naznačují, že dráha PD-1/PD-L1 je jednou z cest, pomocí které nádorový klon CLL může unikat imunitnímu dohledu hostitelského organismu. Procentuální zastoupení a absolutní počet imunokompetentních subpopulací v době analýzy je shrnuto v Tab. č. 9 a č. 10.

2. Vyhodnocení exprese receptoru PD-1 na imunokompetentních populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL v různých stádiích onemocnění, konkrétně mezi doposud neléčenými pacienty a nemocnými s refrakterním/relabujícím onemocněním a u zdravých dárců krve a analýza exprese receptoru PD-1 u nemocných s CLL s rozdílným stadiem dle Bineta.

Počty efektorových CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů s koexpresí PD-1 vykazují vzrůstající tendenci od zdravých dobrovolníků přes skupinu doposud neléčených nemocných k pacientům s refrakterním/relabovaným onemocněním, rozdíly mezi jednotlivými stádii onemocnění však nebyly statisticky signifikantní. Procentuální zastoupení a absolutní počet imunokompetentních subpopulací v době analýzy je shrnuto v Tab. č. 8 a č. 9. Statisticky signifikantní rozdíl absolutního počtu CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> ani CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-lymfocytů nebyl nalezen ani mezi jednotlivými skupinami nemocných v různých fázích dle Binetova stádia. Jediný statisticky signifikantní rozdíl byl pozorován u subpopulace CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> ve srovnání mezi kontrolní kohortou zdravých dárců krve a jednotlivými skupinami nemocných dle Binetova stádia CLL.

V případě subpopulace CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ani mezi kontrolní kohortou zdravých dárců krve a nemocnými. Absolutní počet CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> subpopulací dle Binetova stádia je uveden v Tab. č. 11.

3. Ověření možného vztahu exprese receptoru PD-1 na imunokompetentních populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL s některými dalšími známými prognostickými faktory (exprese CD38 a ZAP-70, mutační stav IGVH a přítomnost prognosticky nepříznivých cytogenetických abnormalit, delecí oblasti 17p a/nebo 11q).

Analýzou Spearmanova korelačního koeficientu byla prokázána středně silná závislost mezi expresí markeru PD-1 na subpopulacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL a přítomností mutované formy genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGVH). Medián absolutního

počtu PD-1<sup>+</sup> buněk na CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech u nemocných s mutovanou formou IGVH genu byl signifikantně vyšší, než u nemocných bez přítomnosti této mutace.

Průkazná závislost mezi expresí markeru PD-1 na subpopulacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL a expresí markerů CD38, ZAP-70 a delecemi oblasti 17p a/nebo 11q u nemocných s CLL nebyla nalezena.

Biologický význam vyšší míry exprese PD-1 u nemocných s mutovanou formou IGVH genu, tedy u pacientů s příznivější prognózou [1], je nejasný a vyžaduje další výzkum. Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro prognostické faktory jsou uvedeny v Tab. č. 8.

**4. Zhodnocení exprese markeru programované buněčné smrti jako potenciálního markeru systémové imunitní dysregulace u CLL.**

V expresi receptoru PD-1 na imunokompetentních subpopulacích CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů byly pozorovány statisticky signifikantní rozdíly mezi nemocnými s CLL obecně a kohortou zdravých dárců krve, což ukazuje na významnou roli imunitních mechanismů v interakcích mezi nádorem a hostitelským organizmem.

Dále byla zjištěna rozdílná, byť statisticky nesignifikantní exprese PD-1 mezi doposud neléčenými nemocnými a pacienty s relabovanou/refrakterní chorobou.

Nejvyšší zastoupení CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> subpopulací bylo prokázáno u nemocných s aktivním onemocněním a v relapsu.

Rozdíly v expresi receptoru PD-1 mezi jednotlivými stádii dle Bineta jsou zcela minimální, signifikantní rozdíl nebyl zjištěn na žádné z analyzovaných T-lymfocytárních populací. Statistickou signifikanci vykazovala pouze rozdílná exprese PD-1 mezi zdravými dárci a pacienty s CLL u CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> subpopulace.

Zdá se tedy, že nádorový klon je u CLL schopen cestou dráhy PD-1/PD-L1 ovlivňovat stav nádorové tolerance, byť jednoznačná závislost mezi mírou exprese markerů dráhy programované buněčné smrti a fází onemocnění nebyla na souboru získaných dat prokázána se statistickou významností. Ve světle těchto poznatků je pak možno znak PD-1 považovat u nemocných s CLL za marker systémové imunitní dysregulace ve srovnání se zdravými jedinci. Korelovat známé prognostické faktory CLL (včetně aktivity či fáze onemocnění dle Bineta, exprese ZAP-70, vybraných cytogenetických nálezů nebo expresí některých nádorových antigenů) s expresí markerů programované buněčné smrti na imunokompetentních lymfocytárních subpopulacích se v našem souboru nemocných nepodařilo, což je v souladu s literárními údaji o expresi markerů programované buněčné smrti na nádorových buňkách CLL [164].



znak		CLL		Zdraví dárce krve [%]
		neléčení [%]	relabování/ refrakterní [%]	
CD3 <sup>+</sup>	medián	10,10	8,10	54,00
	min. - max.	1,29 - 77,24	1,64 - 34,10	17,03 - 84,00
CD4 <sup>+</sup>	medián	4,79	4,31	32,00
	min. - max.	0,93 - 21,16	0,52 - 11,20	10,60 - 43,13
CD8 <sup>+</sup>	medián	3,89	2,91	30,50
	min. - max.	0,41 - 22,38	1,15 - 22,50	20,20 - 47,90
IRI	medián	1,12	1,16	2,69
	min. - max.	0,33 - 4,94	0,39 - 3,18	0,76 - 7,20
NK <sup>+</sup>	medián	1,60	1,43	17,10
	min. - max.	0,17 - 8,39	0,30 - 7,80	6,00 - 29,00
PD-1 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	medián	21,30	23,72	13,22
	min. - max.	9,11 - 55,66	9,55 - 37,99	5,60 - 24,30
PD-1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	medián	14,96	17,78	9,67
	min. - max.	3,65 - 40,41	4,21 - 45,27	4,4 - 21,83

Tab. č. 9. Procentuální zastoupení imunokompetentních subpopulací v době analýzy

znak		CLL		Zdraví dárce krve [*10 <sup>9</sup> /l]
		neléčení [*10 <sup>9</sup> /l]	relabování/ refrakterní [*10 <sup>9</sup> /l]	
CD3 <sup>+</sup>	medián	3,05	2,97	2,50
	min. - max.	1,02 - 12,91	0,31 - 7,24	1,19 - 5,28
CD4 <sup>+</sup>	medián	1,55	1,58	1,72
	min. - max.	0,68 - 3,20	0,17 - 3,33	0,74 - 3,30
CD8 <sup>+</sup>	medián	1,39	1,38	0,64
	min. - max.	0,35 - 2,86	0,09 - 3,98	0,36 - 2,41
NK <sup>+</sup>	medián	0,33	0,37	0,34
	min. - max.	0,09 - 1,74	0,005 - 1,46	0,14 - 0,52
PD-1 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	medián	0,674	0,769	0,412
	min. - max.	0,095 - 2,200	0,120 - 2,140	0,126 - 0,883
PD-1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	medián	0,494	0,645	0,298
	min. - max.	0,057 - 1,320	0,083 - 2,420	0,116 - 0,876

Tab. č. 10. Absolutní počet imunokompetentních subpopulací v době analýzy

<b>kohorta</b>		<b>CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup></b> [*10 <sup>9</sup> /l]	<b>CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup></b> [*10 <sup>9</sup> /l]
<b>Binet A</b> (n = 21)	medián	0,5846	0,4339
	min. - max.	0,0950 - 2,2050	0,0570 - 1,2590
<b>Binet B</b> (n = 18)	medián	0,5783	0,4336
	min. - max.	0,1190 - 1,2180	0,0830 - 1,3220
<b>Binet C</b> (n = 13)	medián	0,5264	0,4090
	min. - max.	0,1480 - 2,1430	0,1040 - 2,4200
<b>Zdraví dárce krve</b> (n = 15)	medián	0,364	0,2017
	min. - max.	0,1260 - 0,7900	0,1160 - 0,8760

Tab. č. 11. Absolutní počet CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> subpopulací dle Binetova stádia

## 9. Diskuze

Podmínky mikroprostředí nádoru se ve světle recentních výzkumů jeví jako zásadní faktor životaschopnosti maligní populace [180, 181]. Je udržována komplexem celulární komponenty (T-lymfocyty, makrofágy, stromální folikulární dendritické buňky), poskytujícím chemokiny, cytokiny a angiogenními faktory nezbytnými pro přežití nádorových buněk [2]. Imunitní mechanismy, které se podílejí na podmínění proliferace patologického klonu u CLL lze schematicky rozdělit podle místa působení na procesy vázané na BCR receptor, T-regulační lymfocyty, stimulaci dráhy programované buněčné smrti cytotoxických T-lymfocytů a pravděpodobně i NK buněk, funkční defekty pomocných T-lymfocytů indukované nádorem, a konečně mechanismy vázané na MHC.

V současné době se ukazuje, že ve snížení imunitní odpovědi vůči tumoru hraje u některých onemocnění zásadní roli interakce receptoru PD-1, exprimovaného především na B- a T-lymfocytech, se svými ligandy PD-L1 a PD-L2, tzv. dráha programované buněčné smrti [125]. PD-1 je významným členem rodiny B7 homologů, jejichž kostimulační a koinhibiční funkce jsou u T-lymfocytů již dlouho známy [102], s významnou rolí v regulaci vrozené i adaptivní imunity, včetně nádorové imunotolerance. Některé z nich účinně potlačují hostitelovu imunitu a umožňují tak nádorovým buňkám unikat cytotoxické odpovědi [126, 184]. U T-lymfocytů tyto interakce inhibují proliferaci, produkci cytokinů i schopnost cytotoxického působení, což bývá označováno jako vyčerpání (exhausting) [127]. U hematologických malignit byl rovněž popsán vliv dráhy programované buněčné smrti na NK buňky, tedy NK vyčerpání, což může mít vliv na použití terapeutických monoklonálních protilátek působících cestou NK buňkami mediované cytotoxicity [185].

Působení rodiny B7-H se nevztahuje pouze na přímé interakce mezi maligními buňkami a imunokompetentními efektorovými buňkami, ale jejich exprese na nemaligních buňkách tumoru významně ovlivňuje mikroprostředí a vytváří vhodnou niku pro přežití a růst nádorové populace [125]. PD-1 pozitivní nádorové buňky jsou rovněž schopny indukovat T-regulační lymfocyty a řídit jejich expanzi a tlumivé působení, přičemž stejný efekt vykazují i PD-1 pozitivní dendritické buňky infiltrující nádor [131, 132, 133]. V neposlední řadě nádorové buňky s vyšší expresí markerů dráhy PD-1/PD-L1 vykazují rezistenci vůči apoptotickým stimulům indukovaným jak Fas dráhou, tak účinkem chemoterapie [134].

Dlouhodobá stimulace antigeny nádorových buněk, v tomto případě interakce receptoru PD-1 se svými ligandy, tedy způsobuje chronickou aktivaci signální dráhy PD-1/ PD-L1, což inhibuje fyziologickou aktivitu efektorových T-lymfocytů formou výše popsaných defektů

buněčné diferenciacie a cytotoxicity. Inhibice imunokompetentních lymfocytárních subpopulací, která cestou dráhy programované buněčné smrti během nádorového růstu nastává, zásadním způsobem ovlivňuje možnosti protinádorové imunity hostitele, spolu s dalšími faktory vede k imunitní toleranci nádorové tkáně a v konečném důsledku může být také spojena s horší terapeutickou odpovědí [135]. Schopnost manipulovat výkonnou složkou adaptivní imunity poskytuje maligní populaci významnou konkurenční výhodu a dráha programované buněčné smrti je proto oprávněně v centru zájmu, neboť navozená imunosuprese nemocného s sebou přináší zásadní klinické konsekvence.

V naší práci jsme se soustředili na interakce receptoru PD-1 (Programmed Death-1) s ligandem PD-1L, která způsobuje konstitutivní aktivaci signální dráhy programované buněčné smrti. U nemocných s chronickou lymfocytární leukemií jsme vyšetřovali expresi receptoru PD-1 na imunokompetentních populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a srovnávali ji mezi kohortami doposud neléčených nemocných, pacientů s refrakterním/relabujícím onemocněním, pacientů s rozdílným Binetovým stádiem a zdravými dárči krve. Naše práce přináší první srovnání exprese markerů programované buněčné smrti na populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u jednotlivých fází chronické lymfocytární leukemie.

Výsledky analýzy exprese markeru programované buněčné smrti PD-1 ukazují statisticky signifikantní rozdíly v expresi PD-1 na imunokompetentních subpopulacích CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů mezi nemocnými chronickou lymfocytární leukemií a kohortou zdravých dárců krve a statisticky nesignifikantní rozdíly v expresi PD-1 mezi doposud neléčenými nemocnými a pacienty s relabovanou/refrakterní chorobou. Zároveň nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi PD-1 mezi jednotlivými stadii dle Bineta.

Nejvyšší zastoupení CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> subpopulací bylo prokázáno u nemocných s aktivním onemocněním a v relapsu, nicméně statistické signifikance nebylo dosaženo.

Zatímco rozdíly mezi jednotlivými stadii dle Bineta jsou zcela minimální, mezi jednotlivými fázemi onemocnění nalézáme rozdíly zřetelné, byť ne statisticky signifikantní, což může být ovlivněno velikostí vyšetřovaného souboru. Tato zjištění jsou v souladu s daty mapujícími expresi markerů dráhy PD-1/PD-L1 na buňkách CLL [164] a budou diskutovány níže. Statisticky signifikantní rozdíl v expresi PD-1 mezi zdravými dárči a nemocnými s CLL obecně ukazuje na významnou roli imunitních mechanismů v interakcích mezi nádorem a hostitelským organismem.

V recentní publikaci Nunes a kolektivu [177] je popsán prognostický dopad exprese PD-1 na CD8 T-lymfocytech, kde přítomnost „imunofenotypu vyčerpání“, CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>, je u osob s CLL v časných fázích onemocnění spojena se ztrátou imunitní kontroly nádoru agresivnějším chováním onemocnění. Tyto dopady byly nezávislé na prognostických markerech nádorového klonu, věku nemocného, změnách počtu T-regulačních lymfocytů a sérostatutu CMV. Tato práce však studovala pouze nemocné bez předchozí terapie, nezahrnovala pacienty s vyšším stadiem dle Bineta ani subpopulaci CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>.

Zatímco roli dráhy programované buněčné smrti u nemocných s chronickou lymfocytární leukemií je nezbytné dále analyzovat a došetřit, u některých malignit, zejména u solidních tumorů, již jsou k dispozici poměrně komplexní informace.

První experimenty byly prováděny na modelu PD-1 deficientních myší, které vykazovaly schopnost inhibice nádorového růstu. Na myším modelu mastocytomu byla rovněž prokázána korelace exprese PD-1 na nádorových buňkách s invazivitou a schopností tvořit metastázy [148]. V preklinických testech vedla blokáda dráhy programované buněčné smrti monoklonálními protilátkami i genetickými manipulacemi k prodlouženému přežití a výrazně vyšší protinádorové odpovědi [186].

V *in vitro* experimentech s lidskými buněčnými liniemi bylo po blokáde PD-1 pozorováno zvýšení proliferační aktivity antigen specifických T-lymfocytů a nárůst produkce cytokinů typu 1 a 2 těmito buňkami [186]. Blokáda PD-1 též signifikantně zvyšovala proliferaci cytotoxických T-lymfocytů kultivovaných s buňkami karcinomu ovária a nemalobuněčného karcinomu plic [187, 188].

V preklinické fázi byl rovněž v testován efekt vícenásobného zásahu drah kontrolujících imunitní procesy, a to přerušením dráhy PD-1 a dráhy CTLA-4. Výsledkem byl synergní efekt vedoucí k rejekci tumoru [150]. Další preklinické práce ověřující kombinace blokády dráhy PD-1 s různými modalitami imunomodulační léčby rovněž prokázaly navýšení aktivity imunokompetentních subpopulací, což pokládá základy pro možnosti budoucí kombinované terapie [189, 190, 191]. Klinicky orientovaný výzkum dráhy programované buněčné smrti byl zpočátku orientován zejména na oblast solidních tumorů.

První klinické experimenty byly zaměřeny na podání anti-PD-1 protilátek u pacientů s metastatickým melanomem, zejména z důvodu existence předchozích prací demonstrujících efekt imunoterapie cestou ovlivnění imunitního systému interleukinem 2 a dalšími cytokiny [193] a experimentů s regulací T-lymfocytární odpovědi (inhibice CTLA-4), které ukázaly prodloužené přežívání nemocných s metastatickým melanomem [193]. Průkaz ligandu PD-L1 v melanomových buňkách spolu se slibnými preklinickými daty vedl k několika randomizovaným studiím s anti PD protilátkami [144, 193].

Na základě těchto prací byly schváleny první dvě terapeutické protilátky zaměřené proti dráze PD-1, pembrolizumab a nivolumab, přičemž v různých fázích klinického hodnocení je několik dalších preparátů [194]. Zavedení anti PD-1 a anti PD-L1 terapie do klinické praxe zcela mění paradigma léčby metastatického melanomu: Tato terapeutika jsou schopna navodit léčebnou odpověď u 20–40 % pacientů, přičemž jsou velmi dobře tolerována a jen méně než 10 % nemocných vykazuje výskyt nežádoucích účinků léčby stupně 3/4 [194].

Léčebné použití inhibitorů dráhy PD-1 s sebou přináší řadu doposud nezodpovězených otázek, aktuálních v tuto chvíli zejména u metastatického melanomu, kde jsou používány nejdéle a v největší míře. Jedná se o délku léčebné odpovědi, resp. o dobu podávání anti PD protilátek, dále o volbu terapie ve smyslu monoterapie versus kombinovaná terapie, zejména s přihlédnutím k impresivním výsledkům kombinace nivolumab a ipilimumab, která však přináší i výrazně vyšší výskyt nežádoucích účinků [195]. Třetí otázkou je prognostická role exprese markerů dráhy PD-1. Ta u melanomu zůstává nejasná; zatímco některé studie neprokázaly vliv na prognózu [196], u jiných byly zjištěny klinicky významné korelace [197].

Velká očekávání přináší výzkum dráhy PD-1/PD-L1 do terapie nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung cancer, NSCLC). Exprese ligandu PD-1 na buňkách NSCLC byla prokázána již v roce 2000 [155] a na myším modelu byla demonstrována lepší protinádorová odpověď  $CD8^+$  T-lymfocytů ovlivněných anti PD-1L protilátkou [188]. U tohoto typu tumoru byl rovněž pozorováno navýšení aktivity cytotoxických intratumorálních  $CD8^+$  T-lymfocytů po zásahu populace  $CD4^+$  Tregs anti PD-1 protilátkou [189, 198].

Terapeutické protilátky anti PD-1 a anti PD-L1 se výrazně podílejí na trendech v terapii nemalobuněčného karcinomu plic. Byl pozorován výrazný efekt monoterapie nivolumabem i pembrolizumabem s překvapivě nízkými vedlejšími účinky [13, 199, 200, 201].

Na prognostický dopad exprese markerů dráhy PD-1 u NSCLC není v tuto chvíli konzistentní názor, zatímco Gettinger a kol. publikovali výraznou korelaci exprese PD-L1 v tumoru s léčebnou odpovědí [202], jiné studie vliv PD-1 popírají [199].

Dalším z řady solidních tumorů, u kterých byla testována blokáda interakce PD-1/PD-L1 je renální karcinom (Renal cell carcinoma, RCC). Trvalé odpovědi bylo dosaženo u 20-30 % nemocných se světlobuněčným renálním karcinomem (clear cell renal carcinoma, (cc)-RCC), přičemž odpověď na léčbu korelovala s expresí PD-L1 v tumoru [203, 13], která je u pacientů s (cc)-RCC silně asociována s nepříznivou prognózou, bez ohledu na stádium onemocnění a performance status [204, 205]. S horší prognózou je spojena exprese PD-L1 i u nesvětlobuněčného

renálního karcinomu [206]. Zajímavé skutečnosti přináší práce [207], demonstrující korelaci exprese PD-1 s fázemi onemocnění RCC a její výrazné snížení po resekci tumoru.

Uroteliální karcinom močového měchýře (Urothelial bladder cancer, UBC) je dalším tumorem, u něhož byly testovány protilátky anti PD-1 a anti PD-L1. Exprese PD-L1 v mikroprostředí granulomatózně-zánětlivé reakce vyvolané terapeutickým podáním BCG vakcíny [208] je asociována s vyšší invazivitou nádoru a selháním lokální BCG terapie [209]. Míra exprese PD-L1 je rovněž nezávislým prognostickým faktorem zvýšené mortality nemocných s UBC po cystektomii [210]. Celková míra léčebné odpovědi (Overall response rate, ORR) anti PD-L1 protilátky (MPDL3280A) u PD-L1 pozitivních nemocných s metastatickým UBC rezistentním na předchozí terapii dosahovala 50 % za současné vysoké tolerance; bylo pozorováno jen 4 % nežádoucích účinků stupně 3, přičemž žádný z nich nebyl na imunitním podkladě. PD-L1 negativní nemocní odpovídali na terapii v 11% [211].

Expresí markerů dráhy programované buněčné smrti byla sledována i u karcinomu ovaria. Zdá se, že intratumorální exprese PD-L1 inverzně koreluje se zastoupením tumor infiltrujících CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a je nezávislým faktorem nepříznivé prognózy [212]. Dále byla prokázána korelace mezi expresí PD-L1, invazivitou maligní populace a tendencí šířit se do peritonea [213].

Zvláštním případem je detekce markerů programované buněčné smrti u zhoubných nádorů hlavy a krku, kde je situace komplikována asociací s infekcí lidským papilomavirem (human papillomavirus, HPV), ovlivňujícím fungování imunitního systému nemocného [214]. Nádory hlavy a krku z dlaždicových buněk (squamous cell cancer of the head and neck, HNSCC) s pozitivitou HPV jsou spojovány s lepší prognózou než HPV negativní nádory, HPV exprese koreluje s intratumorální infiltrací T-lymfocyty [215]. Přítomnost tumor infiltrujících T-lymfocytů se zvýšenou expresí PD-1 u HPV pozitivních HNSCC je pak spojována s lepší prognózou nemocných [216]. Stran ligandu PD-L1, HPV pozitivní tumory jsou typické vyšší úrovní jeho exprese a pozitivita PD-L1 v tumoru je nezávislým faktorem příznivé prognózy u HPV asociovaných HNSCC [217]. Testování terapeutických protilátek je v současné době v začátcích, data z nerandomizované multicentrické studie fáze 1b s pembrolizumabem svědčí pro ORR 20 %. Do studie však byli zahrnuti pouze nemocní s prokázanou pozitivitou PD-L1 v tumoru [218].

Specifickou a velmi heterogenní skupinu tvoří hematologické malignity, což vyplývá z odlišných biologických podstat jednotlivých nozologických jednotek. První analýzy receptoru PD-1 v této skupině onemocnění byly provedeny v roce 2006 u angioimunoblastického T-lymfomu [219] a v téže době byly na myším modelu rozpracovány mechanismy úniku nádorových buněk před imunitním systémem hostitele [220]. Na těchto podkladech byla postupně objasňována

role, kterou hraje interakce PD-1/PD-L1 v oslabení imunitní odpovědi u Hodgkinova lymfomu [221] i non-Hodgkinských lymfomů [222, 136] včetně agresivních typů [223, 224]. Dráha programované buněčné smrti byla zkoumána i u T-buněčných leukemií/lymfomů včetně kožního T-buněčného lymfomu [106].

Vysoké zastoupení PD-L1 bylo pozorováno na patologických plazmocycitech u mnohočetného myelomu [225] a na myším modelu myelomu byla detekována zvýšená exprese receptoru PD-1, čehož bylo u tohoto modelu využito v experimentální terapii sestávající z autologní transplantace krvetvorných buněk, vakcinace a blokády dráhy PD-1/PD-L1, což vedlo k signifikantnímu prodloužení přežití [226].

U akutních leukémií je situace poměrně nejasná a dostupná data odrážejí pouze poznatky u myšího modelu: PD-L1 pozitivní blastické buňky vykazují rezistenci vůči cytotoxickému působení tumor infiltrujících leukocytů i v případě blokády interakce PD-1/PD-L1 [227, 228].

Kontroverzní výsledky přináší i výzkum vlivu dráhy PD-1 v transplantologii: Zatímco u jednoho experimentu na myším modelu akutní myeloidní leukémie vedla blokáda PD-L1 k navození reakce štěpu proti tumoru (Graft versus Tumor reaction, GvT) bez současného spuštění reakce štěpu proti hostiteli (Graft versus host disease, GvHD) [229], vedl jiný experiment na stejném myším modelu po blokáde dráhy PD-1 k výraznému navýšení úmrtnosti na GvHD [230]. Pro komplexní objasnění role dráhy PD-1/PD-L1 jsou tedy nutné ještě další experimentální práce.

S rostoucím významem dráhy PD-1/PD-L1 u hematologických malignit se objevují snahy využít exprese jejích markerů ke stanovení prognózy onemocnění. Výsledky jsou však do značné míry protichůdné. Zatímco se zdá, že alespoň u agresivních typů hematologických malignit jsou zvýšené hodnoty markerů dráhy programované buněčné smrti asociovány s horší odpovědí na vysoce dávkovanou chemoterapii, kratším celkovým přežitím a obecně nepříznivou prognózou [231], jiné publikace [232] dokumentují prodloužené celkové přežití a snížení rizika transformace do high grade non-Hodgkinských lymfomů u nemocných s PD-1 pozitivními T-lymfocyty v mikroprostředí nádoru.

Odpovědí na tyto kontroverze by mohla být heterogenita PD-1 populací, jak vyplývá ze zcela recentní publikace Yanga a kolektivu [233], kteří se věnovali expresi PD-1 na CD4<sup>+</sup> T-lymfocytech u folikulárního lymfomu. V prostředí tumoru byly metodami průtokové cytometrie odhaleny dvě subpopulace lišící se intenzitou exprese PD-1 (CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> a CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>low</sup>). Tyto dvě subpopulace kolonizovaly odlišná místa; zatímco CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> subpopulace byla predominantně nalézána uvnitř folikulů, CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>low</sup> se vyskytovala především v interfolikulárním prostoru. Obě subpopulace se významně liší i funkčně, intratumorální CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> jsou folikulární T „helpers“, aktivně podporují diferenciaci B-lymfocytů, nesou fenotyp T<sub>FH</sub> buněk, exprimují CXCR5,



sekretují IL-21 a jsou BCL-6 pozitivní bez exprese TIM-3. Oproti tomu, CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>low</sup> T-lymfocyty nesou „vyčerpaný“ imunofenotyp, vykazují redukovanou produkci cytokinů a sníženou transdukci buněčné signalizace, exprimují TIM-3 a jsou negativní v CXCR5 a BCL-6. Zásadním zjištěním je, že zastoupení CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>low</sup> T-lymfocytů signifikantně koreluje s kratším celkovým přežitím u nemocných s folikulárním lymfomem, zatímco zastoupení CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>high</sup> subpopulace nemá vliv na prognózu. Výskyt takovýchto subpopulací, v experimentu odlišitelných pouze intenzitou svitu fluorochromu, může být odhaleno pouze pokročilými technikami průtokové cytometrie a lze se oprávněně domnívat, že jejich nerozlišování mohlo v minulosti vést k diskordantním závěrům.

U CLL podrobný rozbor exprese markerů dráhy PD-1/PD-L1 na buňkách tumoru publikovali Grzywnowicz a kol. [164]. Autoři se na kohortě 58 nemocných věnovali zejména expresi mRNA pro PD-1, variantám sestřihu  $\Delta$  exonu 2,3,4 PD-1 a  $\Delta$  exonu 2 PD-L1 u nemocných s CLL, rozdílům v expresi PD-1 po stimulaci fyziologických B-lymfocytů a buněk CLL interleukinem IL-4 CD40L a expresi PD-1 a PD-L1 na nádorových buňkách CLL. Výsledkem bylo zjištění, že jak hladina transkriptu, tak úroveň exprese markerů dráhy PD-1 na povrchu maligních buněk je u nemocných s CLL signifikantně vyšší, než u kontrolní skupiny zdravých dárců. Uvnitř kohorty nemocných s CLL však nebyla nalezena žádná korelace mezi expresí PD-1 a PD-L1 a stádiem onemocnění dle Bineta, cytogenetickými abnormalitami, expresí ZAP-70 a CD38, procentuálním zastoupením T regulačních lymfocytů, hladinou laktátdehydrogenázy, věkem a pohlavím.

Tyto skutečnosti jsou v souladu s výsledky naší práce, která poskytuje komplementární data mapující expresi PD-1 na imunokompetentních subpopulacích T-lymfocytů v prostředí CLL. Byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl v expresi markerů programované buněčné smrti za fyziologické situace (zdraví dobrovolníci), v porovnání se stavem ovlivněným nádorovým klonem (nemocní s CLL), přičemž jednotlivé fáze onemocnění, stádia onemocnění dle Bineta ani další vyšetřené markery se od sebe statisticky signifikantně neodlišují a to ani expresí markerů programované buněčné smrti přímo na povrchu nádorových buněk [164], ani na imunokompetentních subpopulacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. U nemocných s CLL nebyla nalezena průkazná závislost mezi expresí markeru PD-1 na subpopulacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, pozitivitou ve znacích CD38 a ZAP-70 a mezi delecemi oblasti 17p a/nebo 11q. Byla odhalena středně silná závislost mezi expresí markeru PD-1 na subpopulacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných s CLL a přítomností mutované formy IGVH genu, přičemž medián absolutního počtu PD-1<sup>+</sup> buněk na CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytech u nemocných s mutovanou formou IGVH genu byl signifikantně

vyšší, než u nemocných bez přítomnosti této mutace. Tento výsledek je však nezbytné ověřit na větších souborech nemocných. Pokud by byla tato asociace v budoucnu potvrzena, nedokážeme na základě současných znalostí adekvátně interpretovat její biologické a klinické důsledky. V současné době však k tomuto jevu neexistují žádná experimentální data a problematika nepochybně vyžaduje další zkoumání.

Ve světle současných poznatků se PD-1 jeví jako nádorem indukovatelný negativní kostimulační receptor, jehož interakce s ligandy PD-L1 a PD-L2 zasahuje T-lymfocytární subpopulace, tlumí jejich proliferaci i produkci cytokinů a redukuje schopnost cytotoxického působení. Nádorový klon je pravděpodobně schopen cestou dráhy PD-1/PD-L1 ovlivňovat stav protinádorové imunitní odpovědi a marker PD-1 je tedy možno u CLL považovat za znak systémové imunitní dysregulace ve vztahu ke zdravým jedincům. Na základě získaných dat nelze kvantifikovat postižení mechanismů protinádorové imunity u CLL, nicméně výsledky této pilotní studie opravňují k provedení dalších studií, nejlépe prospektivního charakteru, se sledováním odezvy na léčbu u větších souborů pacientů.

Dráha PD-L1/PD-1 se ukazuje být hodnotným cílem biologické léčby. Bylo publikováno několik prací týkajících se úspěšné blokády dráhy programované buněčné smrti, která u myších modelů lidských hematologických malignit vedla k navýšení protinádorové odpovědi [162, 234, 235], některá léčiva na bázi monoklonálních protilátek jsou již v pozdních fázích klinických studií. Na konci roku 2014 byly první dva preparáty inhibující interakci PD-1/PD-L1, pembrolizumab a nivolumab, schváleny úřadem U.S. Food and Drug Administration (FDA) pro terapii metastatického melanomu [236] a k 4.3.2015 byl nivolumab schválen pro léčbu skvamózního nemalobuněčného karcinomu plic s progresí po podání chemoterapie na bázi platiny [237].

Dle očekávání je léčebná odpověď pacientů s expresí PD-L1 výrazně lepší než u nemocných s PD-L1 negativními tumory, nicméně i zde bývá pozorován přínos léčby, byť v nižším zastoupení [238, 239]. Vzhledem k tomu, že exprese ligandu PD-L1 není omezena pouze na buňky tumoru, ale je prokazována na dendritických buňkách, tumor-asociovaných fibroblastech, makrofázích atd., lze léčebný efekt u PD-L1 negativních malignit přisoudit zásahu do imunitní sítě jako celku. Jev si však vyžaduje další zkoumání.

Mimo přímý protinádorový účinek lze předpokládat ještě další klinicky významný efekt blokády dráhy PD-1 humanizovanými anti-PD-1 protilátkami a to rekonstituci fyziologické T-lymfocytární odpovědi proti bakteriálním a virovým infekcím.

## 10. Závěr

Modulace imunitních mechanismů nemocného je v současné době jedním z horkých témat jak v onkologii solidních tumorů, tak v hematologii. Ač lze první experimenty vysledovat do období přelomu XIX. a XX. století, kdy americký chirurg William Coley překvapivě úspěšně ovlivňoval imunitní odpověď nemocných se solidními tumory vakcínou z usmrcených bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens*, tzv. Coleyho toxiny [240], bouřlivý rozvoj imunoterapie zažíváme nyní, o sto let později.

V současné době jsme svědky přerodu „tumorcentrického“ paradigmatu v model zahrnující širokou škálu imunitních interakcí mezi nádorovou populací a hostitelským organizmem, označovaný jako 3E (elimination, equilibrium, escape).

Poměrně komplexní poznání mechanismů, dovolujících maligním buňkám unikat protinádorové odpovědi, logicky vede k vývoji rutinně aplikovatelných diagnostických metod a nových terapeutických postupů. Velmi vhodným cílem se ukazuje být právě dráha programované buněčné smrti a to jednak pro jednoduchost interakce (jeden receptor a jeden, resp. dva, ligandy) a dále pro lokalizaci cílových struktur na povrchu buněk. V současné době lze považovat za prokázané, že nádorový klon je schopen cestou dráhy PD-1/PD-L1 ovlivňovat imunitní systém hostitelského organismu, modifikovat jeho reakce a navozovat stav imunotolerance maligní populace [148, 241], přičemž blokáda této dráhy je schopna, alespoň u některých malignit, navodit obnovu imunitní odpovědi [242].

Tyto skutečnosti v současné době vedou k velkým očekáváním při testování terapeutických monoklonálních protilátek jak u solidních tumorů [13], tak u hematologických malignit [130, 235]. Velmi slibným výsledkům studií s bloádou dráhy programované buněčné smrti u hematologických malignit bylo věnováno několik prezentací na konferenci Americké hematologické společnosti (ASH) 2014 [243, 244]. Optimistické vyhlídky přináší zejména nivolumab, který byl americkým národním regulátorem (FDA) schválen k testování u refrakterního či relabujícího Hodgkinova lymfomu v režimu průlomové terapie (Breakthrough Therapy designation) [245].

Výzkum přináší možnosti dalších léčebných modalit, které však zatím narážejí na řadu problémů. Snahy o terapeutické ovlivnění T regulačních lymfocytů jsou prozatím většinou ve stavu experimentů, zejména pro ne zcela vyjasněnou a velmi komplikovanou a provázanou síť působení mezi buňkami [246]. Terapeutická modulace exprese proteinů hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (MHC II) by pravděpodobně vyžadovala individualizované zásahy na úrovni genomu, resp. epigenomu, což je v současné době rutinně nezvládnutelné [247].

Průtoková cytometrie hraje klíčovou roli jak diferenciální diagnostice CLL, tak ve stanovení imunitní odpovědi, v případě analýz T-lymfocytárních subpopulací jsou její metody zlatým standardem a jsou rutinně využívány. Diferenciálně diagnostické analýzy a sledování minimální zbytkové nemoci prodělávají v současné době přerod směrem k využití mnohobarevných panelů protilátek dle výstupů konsorcia Euroflow [248].

Unifikace laboratorního procesu včetně použitých identických sestav monoklonálních protilátek, analytického software a kalibrátorů umožňuje nejen eliminovat nepřesnosti, ale i dříve nedosažitelné druhé čtení či konzultaci expertním pracovištěm. Do praktického použití se dále dostávají i metody kvantitativní průtokové cytometrie [249], které jsou na základě analýzy vazebných míst schopny poskytnout informace o reálném zastoupení cílových struktur na zájmových buňkách, což s sebou přináší nový pohled zejména na hodnocení účinnosti terapeutických monoklonálních protilátek [250].

Pokročilé analýzy imunokompetentních lymfocytárních subpopulací včetně dráhy programované buněčné smrti jsou zatím doménou spíše vědecko výzkumných pracovišť, nicméně v blízké době můžeme čekat přesun těchto stanovení do rutinní praxe. Týká se to zejména metod detekce a kvantifikace exprese receptoru PD-1, které v případě zavedení terapeutických monoklonálních protilátek do rutinní praxe budou nezbytné pro přesnou indikaci terapie a sledování odpovědi na léčbu.

Zásadní úlohu průtokové cytometrie lze dále s jistotou očekávat u indikace a monitorování terapie na bázi virovou transdukcí modifikovaných T-lymfocytů, exprimujících chimérické receptory antigenů (Chimeric antigen receptors, CARs), slibné nové terapeutické modality s kurativním potenciálem, která je v současné době ve stádiu klinických testů [251, 252]. Zavádění osmi a vícebarevných cytometrů, rozšiřující se spektrum fluorochromů a nové analytické metody, zejména možnost kvantifikovat expresi cílových struktur, umožňuje analyzovat širší souvislosti mezi jednotlivými imunokompetentními populacemi a maligními buňkami, posoudit jejich role v procesu regulace protinádorové odpovědi a poskytuje tak nový vhled do interakcí mezi maligními buňkami a hostitelským organizmem směrem k úspěšné terapii [253, 254, 255].

## 11. Literatura

1. Damle RN, Wa T, Fais F, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(6): 1840-1847.
2. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009; 144(16):3367-3375
3. Stevenson BK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118(16):4313-4320
4. Wienster A. Emerging role of kinase targeted strategie in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:88-96
5. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(3):229-243
6. Duhren- von Minden MD, Ubelhart R, Schneider D, at al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signaling. *Nature* 2012;489(7415):309-312
7. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15524-15529
8. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):37-50
9. Adam Z, Vorlíček J. Chronická B-lymfatická leukemie in Adam Z, Vorlíček J. Vaníček J, at al. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. Grada Publishing a.s, 2004, 453-463
10. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013;121:1612-1612
11. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma *N Engl J Med* 2013; 369: 134–144
12. Seetharamu N. The State of the Art in Non–Small Cell Lung Cancer Immunotherapy. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2015; 26(1):26-35 DOI: 10.1053/j.semctvs.2014.02.005
13. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26):2443-2454.
14. Soria JC, Cruz C, Bahleda R, et al. Clinical activity, safety and biomarkers of PD-L1 blockade in non–small cell lung cancer (NSCLC): Additional analyses from a clinical study of the engineered antibody MPDL3280A (anti-PDL1). *European Cancer Congress, 2013, Abstract 3408*
15. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *European journal of cancer care* 2004;13(3), 279-287
16. Yoo KY, Lee MS. Incidence estimation of leukemia among Koreans. *Journal of Korean medical science* 1991; 6(4), 299-307
17. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition. IARC: Lyon 2008.
18. Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV. Sex ratios and the risks of haematological malignancies. *British journal of haematology* 2002; 118(4), 1071-1077
19. Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT eds. *Williams Hematology*. 8th edition. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2011:1431-1481.

20. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 2008; 11: 5446–5456
21. Schroeder HW Jr, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994;15:288-294
22. Zupo S, Isnardi L, Megna M, et al. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 1996;88:1365-1374
23. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:181-186
24. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-4951
25. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-1638
26. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic Lymphocytic Leukemia *N Engl J Med* 2005; 352:804-815
27. Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE, et al. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1991;78(7): 1795-1802.
28. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, et al. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012; 137(1): 93–100
29. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia *Blood* 1999; 94(6): 1840-1847
30. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet* 2004;363(9403): 105-111
31. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941–3967.
32. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome. *Cancer* 2005; 103(2): 216-228
33. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000; 95(12): 3900-3908
34. Lundin J, Kimby E, Björkholm M, et al. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2002;100(3): 768-773
35. Starostka D, Mikula P. Možnosti diagnostiky CD5-pozitivních B-lymfoproliferací *Onkologie* 2014; 8(3): 102–106
36. Goorha S, Glenn MJ, Drozd-Borysiuk E. et al. A set of commercially available fluorescent in-situ hybridization probes efficiently detects cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genetics in Medicine* 2004;6 (1): 48-53
37. Shanafeld TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4634-4641

38. Bullrich F, Fujii H, Calin G, et al. Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. *Cancer Res* 2001; 61: 6640–8
39. Joshi AD, Dickinson JD, Hegde GV, et al. Bulky lymphadenopathy with poor clinical outcome is associated with ATM downregulation in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients irrespective of 11q23 deletion *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007; 172 (2):120-126
40. Quijano S, López A, Rasillo A, et al. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-Cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B* 2008; 74B: 139–149
41. Hjalmar V, Kimby E, Matutes E, et al. Trisomy 12 And Lymphoplasmacytoid Lymphocytes In Chronic Leukemic B-Cell Disorders *Haematologica* January 1998; 83:602-609
42. Hjalmar V, Hast R, Kimby E. Cell surface expression of CD25, CD54, and CD95 on B- and T-cells in chronic lymphocytic leukaemia in relation to trisomy 12, atypical morphology and clinical course. *Eur J Haematol* 2002; 68: 127 – 34
43. Garcia-Marco JA, Price CM, Catovsky D. Interphase cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94:52–58
44. Brynes RK, McCourty A, Sun NC, et al. Trisomy 12 in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Clinical Pathology* 1995; 104(2):199-203
45. Glassman A B, Harper-Allen EA, Hayes KJ, et al. Chromosome 6 abnormalities associated with prolymphocytic acceleration in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 1998; 28(1): 24-29
46. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q– shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 2003;18(3): 476-483
47. Amiel A, Arbov L, Manor Y, et al. Monoallelic p53 deletion in chronic lymphocytic leukemia detected by interphase cytogenetics. *Cancer genetics and cytogenetics* 1997; 97(2): 97-100.
48. El Rouby S, Thomas A, Costin D, et al. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993;82(11): 3452-3459
49. Cordone I, Masi S, Mauro FR., et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998;91(11): 4342-4349
50. Shanafelt TD. Predicting clinical outcome in CLL: how and why? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 421-429.
51. Dreger P, Corradini P, Kimby E., et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007; 21:12-17
52. Croce CM. Molecular biology of lymphomas. *Seminars in oncology* 1993;20, (5) Suppl 5: 31-46
53. Larramendy ML, Peltomäki P, Salonen E, et al. Chromosomal abnormality limited to T- lymphocytes in a patient with T-cell chronic lymphocytic leukaemia. *European journal of haematology* 1990;45(1): 52-59
54. Rohoň P. Molekulární biologie v hematoonkologii – od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi, UP Olomouc 2009
55. Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, et al. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994;91(2): 709-713
56. Jonveaux PH, Hillion J, Bennaceur AL, et al. t (14; 18) and BCL-2 gene rearrangement in AB-Chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 1992;81(4): 620-621
57. Ueshima Y, Bird ML, Vardiman JW, et al. A 14; 19 translocation in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a new recurring chromosome aberration. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 1985; 36(3): 287-290

58. Raghoebier S, Van Krieken JH, Kluin-Nelemans J et al. Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia. *Blood* 1991; 77(7): 1560-1564.
59. Adachi M, Tefferi A, Greipp PR, et al. Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine* 1990;171(2): 559-564
60. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119(2): 521-529
61. Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parry M et al. Mutations In XPO1, POT1, BIRC3 and FBXW7 collectively Predict Poor Outcome At Diagnosis In CLL and MBL Independent From The SF3B1 and NOTCH1 Status. *Blood* 2013; 122(21): 4138-4138
62. Cheson BD. Apoptosis Dysregulation in Chronic Lymphocytic Leukemia, Chapter 6, s.111-126 in *Chronic Lymphoid Leukemias: Second Edition, Revised and Expanded*. 2nd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. 625 p.
63. Reed JC, Kitada S. Apoptosis dysregulation in chronic lymphocytic leukemia. *Basic and Clinical Oncology* 2001; 26: 111-126
64. Jia L, Gribben JG. Dangerous power: mitochondria in CLL cells. *Blood* 2014; 123(17): 2596-2597.
65. Thomas A, El Rouby S, Reed JC, et al. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 1996;12(5): 1055-1062.
66. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research* 2009;15(4): 1126-1132.
67. Russo M, Spagnuolo C, Volpe, et al. ABT-737 resistance in B-cells isolated from chronic lymphocytic leukemia patients and leukemia cell lines is overcome by the pleiotropic kinase inhibitor quercetin through Mcl-1 down-regulation. *Biochemical pharmacology* 2013;85(7): 927-936.
68. Zhang W, Feng L, Pelicano, et al. Resistance of chronic lymphocytic leukemia cells in apoptosis: key role of stromal cells in maintaining the redox potential of CLL cells. *Medecine sciences* 2013;29(1): 36-38.
69. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, et al. The clinical significance of tumor necrosis factor- $\alpha$  plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100(4): 1215-1219
70. Munzert G, Kirchner D, Stobbe H, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* 2002; 100 (10): 3749-3756.
71. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, et al. Modulation of NF- $\kappa$ B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Immunology* 2000;164(4): 2200-2206
72. Lopez-Guerra M, Colomer D. NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert opinion on therapeutic targets* 2010;14(3): 275-288.
73. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, et al. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *British journal of haematology* 1996; 92(1): 97-103
74. Burger JA, Tsukada N, Burger M, et al. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000; 96(8): 2655-2663.
75. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, et al. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *British journal of haematology* 2008;140(5): 537-546.
76. Audrito V, Vaisitti T, Serra S, et al. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia offers novel therapeutic options. *Cancer letters* 2013; 328(1): 27-35.



77. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8: 1640–1645
78. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American Journal of Clinical Pathology* 1997;108(4): 378-382.
79. Panovská A, Doubek M. Chronická lymfocytární leukemie–diagnostika a léčba. *Onkologie* 2013; 7(3): 117-120
80. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48 (1): 198-206
81. Rai KR, Sawitski A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46(2): 219-234
82. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. In: Gale RP, Rai KR. (editors). *Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Direction*. 1st Edition. New York (NY): Alan R Liss, 1987. 432 p. ISBN 10 084512658X, s. 253-264
83. Goede V, Hallek M. Optimal pharmacotherapeutic management of chronic lymphocytic leukaemia: considerations in the elderly. *Drugs Aging* 2011;28(3):163-76
84. Eichhorst BF, Busch R, Stilgenbauer S, et al. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;114(16):3382-91.
85. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab. *Drugs* 2003; 63.8: 803-843
86. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 2004; 125(3): 294-317
87. Smolej L. Therapy of elderly/comorbid patients with chronic lymphocytic leukemia. *Curr Pharm Des.* 2012;18(23):3399-405.
88. Knauf WU, Lissitchkov T, Aldaoud A, et al. Bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia: updated results of a randomized phase III trial. *British journal of haematology* 2012;159(1): 67-77
89. Hillmen P. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25:5616-23.
90. Lin TS, Fischer B, Blum K, et al. Flavopiridol (alvocidib) in chronic lymphocytic leukemia. In *Hematology Meeting Reports*;2009; 2(5): 112-119
91. Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, et al. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 2002;12(3): 193-213
92. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* 2013;19:202–8
93. Tausch E, Mertens D, Stilgenbauer S. Advances in treating chronic lymphocytic leukemia. *F1000prime reports* 2014; 6:65
94. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, et al. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008;111:846–55
95. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:3603–12
96. Byrd JC, Castro JE, Flinn IW, et al. Lumiliximab in combination with FCR for the treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL): results from a phase I/II multicenter study. *J Clin Oncol* 2008;26(15S): 7003

97. Bello C, Sotomayor EM. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: rituximab and beyond. *ASH Education Program Book*, 2007(1), 233-242
98. Bulian P, Gaidano G, Poeta GD, et al. CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: a prognostic parameter and a therapeutic target. *Future medicine* 2008; 4(3): 355-358
99. Molica S. Immunomodulatory drugs in chronic lymphocytic leukemia: a new treatment paradigm. *Leukemia & lymphoma* 2007; 48(5): 866-869.
100. Kotla V, Goel S, Nischal S, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2009; 2(36): 36
101. Awan FT, Johnson AJ, Lapalombella R, et al. Thalidomide and lenalidomide as new therapeutics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2010;51(1): 27-38
102. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-126
103. Wherry EJ. T-cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;12(6);492-432
104. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T-cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009;10(1):29-37
105. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013;121:1612-1612
106. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, et al. PD-1/PD-1L expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia* 2009;23(2):375-382
107. Mumprecht S, Schurch C, Schwaller J, et al. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 2009;114(8):1528-1536
108. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003;77(8):4911-4927
109. Buschle M, Campana D, Carding SR et al. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1993;177(1):213-218
110. Digel W, Stefanic M, Schoniger W, et al. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1989;73(5):1242-1246
111. Ahmadzadeh M, Felipe-Silva A, Heemskerk B, et al. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood* 2008;112:4953-4960
112. Juan XL, Chen L, Li MX, et al. Elevated expression of Foxp3 in tumor-infiltrating Treg suppresses T-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a COX-2-dependent manner. *Clin Immunol* 2010;134:277-288
113. J. Wang, Ke X. The Four types of Tregs in malignant lymphomas. *Journal of Hematology & Oncology* 2011;4(50):1-10
114. Mittal S, Marshall NA, Duncan L, et al. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008;111:5359-5370
115. Ai WZ, Hou JZ, Zeiser R, et al. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Int J Cancer* 2009;124:239-244
116. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-226
117. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(14):5138-5143

118. Lopes JE, Torgerson TR, Schubert LA, et al. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol* 2006;177(5):3133–3142
119. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 2007; 446(7136):685–689
120. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *JEM* 2006;203(7): 1701-1711
121. Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, et al. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10(1):41–60.
122. Appasamy PM. Biological and clinical implications of interleukin-7 and lymphopoiesis. *Cytokines Cell Mol Ther* 1999;5(1):25–39.
123. Weiss, L., Melchardt, T., Egle, A., Grabmer, C., Greil, R. and Tinhofer, I. (2011), Regulatory T cells predict the time to initial treatment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2011; 117: 2163–2169.
124. Lad DP, Varma S, Varma N, et al. Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias *Leukemia and lymphoma* 2013; 54(5):1012-1019
125. Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, et al. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood* 2009;114:2149-2158
126. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677-704
127. Flies DB, Chen L. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity. *J Immunother* 2007;30:251-260
128. Yi KH, Chen L. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev* 2009;229:145-151
129. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007;27:111-122
130. Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, et al. The PD-1/PD-1L axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 2010;116:2286-2294
131. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006;107:3639-3646
132. Han Y, Wu J, Bi L, et al. Malignant B cells induce the conversion of CD4CD25 T cells to regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PloS One*. Publikováno elektronicky 2011;6:e28649
133. Rosenblatt J, Glotzbecker B, Mills H, et al. PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cells/myeloma fusion vaccine. *J Immunother* 2011;34:409-418
134. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies SJ, Chen L. B7-H1 is ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 2008;111:3635-3643
135. Rozali EN, Hato SV, Robinson BW, et al. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical and Developmental Immunology* Publikováno elektronicky 656340. Epub 2012 Apr 29
136. Green M, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p22.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010; 116(17):3268-3277

137. Sachdeva M, Fischl MA, Pahwa R, et al. Immune exhaustion occurs concomitantly with immune activation and decrease in regulatory T cells in viremic chronically HIV-1 infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;54(5): 447–454
138. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 2004; 103(1):4251-4258
139. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346(25):1937-1947
140. Cycon AK, Rimsza LM, Murphy SP. Alterations in CIITA constitute a common mechanism accounting for downregulation of MHC class II expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Exp Hematol* 2009;7(2):184-194
141. Steidl CH, Gascoyne R. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell. *Blood* 2011;118(10):2659-2669
142. Steidl CH, Shan SP, Woolcock BW, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 2011;471(7338):377-383
143. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007;8:239-245
144. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793-800 [Erratum, *Nat Med* 2002;8:1039]
145. Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010;116:1757-1766
146. Taube JM, Anders RA, Young JD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012;4:127-37
147. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* 2009;10:1185-1192
148. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12293-12297
149. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rohlfen RA, et al. Role of CTLA4 in the Proliferation and Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE* 2013 8(8): e70352. doi:10.1371/journal.pone.0070352
150. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4275–80
151. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11: 3887–3895
152. Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11: 141–151
153. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol.*, 2003; 33: 2706–2716
154. Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 1999; 5: 1365–1369.

155. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000;192: 1027–1034.
156. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol* 2001; 2:261–268
157. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 839–846.
158. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996; 8: 765–772.
159. Blank C, Kuball J, Voelkl S, et al. Blockade of PDL1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer* 2006;119:317–327.
160. Pen JJ, Keersmaecker BD, Heirman C, et al. Interference with PD-L1/PD-1 co-stimulation during antigen presentation enhances the multifunctionality of antigen-specific T cells *Gene Therapy* 2014;21:262–271
161. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol* 2003;170:1257–1266.
162. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793–800.
163. Brusa D, Serra S, Coscia M, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013;98(6),953-963.
164. Grzywnowicz M, Zaleska J, Mertens D, et al. Programmed Death-1 and Its Ligand Are Novel Immunotolerant Molecules Expressed on Leukemic B Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE* 2012;7(4):8p
165. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):1021-1034
166. Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72(1): S14–22.
167. <http://euroflow.org/>
168. Stovel R, Fluidics. *Curr Protocol Cytom* 2001; 1.2.1-1.2.7
169. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc. 2003
170. Dean PN, Hoffman RA. Overview of Flow Cytometry Instrumentation *Curr Protocol Cytom* 1997; 1.1.1.-1.1.8
171. Klessinger M, Michl J. *Excited States and Photo-Chemistry of Organic Molecules*, John Wiley & Sons, Inc. 1995
172. Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE. *Flow cytometry and clinical diagnosis*, ASCP Press, 1994
173. Eckschlager T, a kol. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*; Grada Publishing a.s., 1999
174. Dolezel J, Greilhuber J, Suda J. *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. John Wiley & Sons, Inc. 2007
175. Zola H, Swart B, Nicholson I, et al. *Leukocyte and stromal cell molecules: the CD markers*; John Wiley & Sons, Inc. (2007)
176. Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J, et al., (2008) *Hematologie, přehled maligních hematologických nemocí*, Grada Publishing a.s, Praha

177. Nunes CT, Wong R, Mason M, et al. Expansion of a CD8+PD-1+ replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. *Clin Cancer Res.* 2012;18(3):678–87.
178. <http://www.who.int/bulletin/archives/79%284%29373.pdf>
179. Suchánek M, Friedecký B, Kratochvíla J, et al. Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus* 2006;1: 43-53
180. Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MTS, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. In: *Seminars in cancer biology.* Academic Press, 2014. p. 43-48
181. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. In: *Seminars in cancer biology.* Academic Press, 2014. p. 71-81
182. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- $\kappa$ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117(2), 563-574
183. Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. In: *Seminars in cancer biology.* Academic Press 2013: 410-421
184. Yi KH, Chen L. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev* 2009;229:145-151
185. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 2005;65:1089–1096
186. Wong RM, Scotland RR, Lau RL, et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int. Immunol.* 2007;19, 1223–1234.
187. Curiel TJ, Wei S, Dong H, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* 2003; 9, 562–567.
188. Zhang Y, Huang S, Gong D, et al. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell. Mol. Immunol.* 2010; 7, 389–395.
189. Mangsbo SM, Sandin LC, Anger K, et al. Enhanced tumor eradication by combining CTLA-4 or PD-1 blockade with CpG therapy. *J. Immunother.* 2010; 33,225–235.
190. Jure-Kunkel M, Selby M, Lewis K, et al. Nonclinical evaluation of the combination of mouse IL-21 and anti- mouse CTLA-4 or PD-1 blocking antibodies in mouse tumor models. *ASCO Meet.* 2013; Abstr. 31, 3019.
191. Webster WS, Thompson RH, Harris KJ., et al. Targeting molecular and cellular inhibitory mechanisms for improvement of antitumor memory responses reactivated by tumor cell vaccine. *J. Immunol.* 2007;179, 2860–2869.
192. Finn L, Markovic SN, Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med.* 2012;10 (23), <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/2>.
193. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363, 711–723.
194. Swaika A, et al. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol. Immunol.* 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.02.009>
195. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369, 122–133.

196. Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser AD, et al. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer* 2011;117, 2192–2201.
197. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J. Clin. Oncol.* 2014;32, 1020–1030.
198. Wang W, Lau R, Yu D, et al. PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4 + CD25Hi regulatory T cells. *Int.Immunol.* 2009; 21, 1065–1077.
199. Brahmer JR, Horn L, Gandhi L, et al. Nivolumab (anti-PD-1, BMS-936558,ONO-4538) in patients (pts) with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC):survival and clinical activity by subgroup analysis. *ASCO Meet.* 2014; Abstr. 32, 8112.
200. Rizvi NA, Garon EB, Patnaik A, et al. Safety and clinical activity of MK-3475 as initial therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *ASCO Meet.* 2014; Abstr. 32, 8007.
201. Garon EB, Leighl NB, Rizvi NA, et al. Safety and clinical activity of MK-3475in previously treated patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC).*ASCO Meet.* 2014; Abstr. 32, 8020.
202. Gettinger SN, Shepherd FA, Antonia SJ, et al. First-line nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) monotherapy in advanced NSCLC: safety,efficacy, and correlation of outcomes with PD-L1 status. *ASCO Meet.* 2014; Abstr. 32,8024.
203. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, et al. Safety and activity of anti-PD-L1antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366, 2455–2465.
204. Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, et al. Survivin and B7-H1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2007;13, 1749–1756.
205. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101, 17174–17179.
206. Choueiri TK, Fay AP, Gray KP, et al. PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma. *Annals of Oncology*, 2014, 25.11: 2178-2184.
207. MacFarlane A, Jillab M, Plimack E, et al. PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection (TUM2P. 881). *The Journal of Immunology*, 2014; 192.1 Supplement: 71.5-71.5.
208. Eichenauer R, Vanherpe H. *Urologie klinika a praxe.* Scientia medica Praha, 1996; 597 p.
209. Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* 109, 2007; 1499–1505.
210. Xylinas E, Robinson B, Kluth LA, et al. Association of T-cell co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2014; 40, 121–127.
211. Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014; 515, 558–562.
212. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2007; 104, 3360–3365.
213. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, et al. PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19, 1363–1374.
214. Goncalves MAG, Donadi EA. Immune cellular response to HPV: current concepts. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2004, 8.1: 1-9.

215. Kong CS, Narasimhan B, Cao H, et al. The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009; 74, 553–561.)
216. Badoual C, Hans S, Merillon N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013; 73, 128–138.
217. Vasilakopoulou M, Velcheti V, Rampias T, et al. Effect of PDL-1 expression on prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *ASCO Meet. Abstr.* 2013; 31,6012.
218. Seiwert TY, Burtneess B, Weiss J, et al. A phase Ib study of MK-3475 in patients with human papillomavirus (HPV)-associated and non-HPV-associated head and neck (H/N) cancer. *ASCO Meet. Abstr.* 2014; 32, 6011.
219. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, et al. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2006; 30, 802–810.
220. Elpek KG, Lacelle C, Singh NP, et al. CD4+ CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model. *J. Immunol.* 2007; 178, 6840–6848.
221. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1–PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 111, 3220–3224.
222. Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, et al. Programmed death ligand 1 is expressed by non-Hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17, 4232–4244.
223. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19, 3462–3473.
224. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, et al. PD1 (CD279) and PD-L1 (CD274,B7H1) expression in primary central nervous system lymphomas (PCNSL). *Clin. Neuropathol.* 2014; 33, 42–49.
225. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 2007; 110, 296–304.
226. Hallett WHD, Jing W, Drobyski WR, et al. Immunosuppressive effects of multiple myeloma are overcome by PD-L1 blockade. *Biol. Blood Marrow Transpl.* 2011; 17, 1133–1145.
227. Saudemont A, Quesnel B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood* 2004; 104, 2124–2133.
228. Saudemont A, Buffenoir G, Denys A, et al. Gene transfer of CD154 and IL12cDNA induces an anti-leukemic immunity in a murine model of acute leukemia. *Leukemia* 2002; 16, 1637–1644.
229. Koestner W, Hapk, M, Herbst J, et al. PD-L1 blockade effectively restores strong graft-versus-leukemia effects without graft-versus-host disease after delayed adoptive transfer of T-cell receptor gene-engineered allogeneic CD8+T cells. *Blood* 2011; 117, 1030–1041.
230. Blazar BR, Carreno BM, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-  $\gamma$ -dependent mechanism. *J. Immunol.* 2003; 171, 1272–1277.
231. Rossille D, Gressier M, Damotte D, et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. 2014; LID, <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.137>.



232. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J. Clin.Oncol.* 2009; 27, 1470–1476.
233. Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. PD-1 expression defines two distinct T-cell subpopulations in follicular lymphoma that differentially impact patient survival. *Blood cancer journal*, 2015, 5.2: e281
234. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 zeta signalosome and downstream signaling to PKC theta. *FEBS Lett* 2004; 574: 37–41.
235. Westin JR, Chu F, Zhang M, et al. safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:69-77
236. Ascierto PA, Marincola FM. The year of anti-PD-1/PD-L1s against melanoma and beyond. *EBioMedicine*, 2015.
237. <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm436534.htm>
238. Gandhi L. MK-3475 (anti-PD-1 monoclonal antibody) for non-small cell lung cancer (NSCLC): antitumor activity and association with tumor PD-L1 expression [abstract]. *Proc. Ann. Meet. AACR* 2014; CT105.
239. Daud AI, Hamid O, Ribas A, et al., Antitumor activity of the anti-PD-1 monoclonal antibody MK-3475 in melanoma (MEL): correlation of tumor PD-L1 expression with outcome. *Proc. Ann. Meeting AACR* 2014; CT104.
240. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *The American Journal of the Medical Sciences*, 1893, 105.5: 487-510
241. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., et al., 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.*, 181–273.
242. McClanahan, F., Hanna, B., Miller, S., et al. PD-L1 Checkpoint Blockade Prevents Immune Dysfunction and Leukemia Development in a Mouse Model of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 2015, blood-2015-01-622936
243. Moskowitz CH, Ribrag V, Michotet JM, al. PD-1 Blockade with the Monoclonal Antibody Pembrolizumab (MK-3475) in Patients with Classical Hodgkin Lymphoma after Brentuximab Vedotin Failure: Preliminary Results from a Phase 1b Study (KEYNOTE-013). 2014 American Society of Hematology Annual Meeting. Abstract 290
244. Armand P, Ansell SM, Lesokhin AM, et al. Nivolumab in Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma - Preliminary Safety, Efficacy and Biomarker Results of a Phase I Study. 2014 American Society of Hematology Annual Meeting. Abstract 289
245. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, et al. Preliminary Results of a Phase I Study of Nivolumab (BMS-936558) in Patients with Relapsed or Refractory Lymphoid Malignancies 2014 American Society of Hematology Annual Meeting. Abstract 291
246. Tang Q. Pharmacokinetics of Therapeutic Tregs. *American Journal of Transplantation*, 2014;14(12): 2679-2680.
247. Catalán E, Charni S, Jaime P, et al. MHC-I modulation due to changes in tumor cell metabolism regulates tumor sensitivity to CTL and NK cells. *OncoImmunology* 2015; 4(1):
248. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; 26: 1908-1975.

249. Maher KJ, Fletcher MA. Quantitative flow cytometry in the clinical laboratory. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2005; 5(6): 353–372
250. Klabusay M, Sukova V, Coupek P. Different levels of CD52 antigen expression evaluated by quantitative fluorescence cytometry are detected on B-lymphocytes, CD 34+ cells and tumor cells of patients with chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Cytometry* 2007;72B: 363–370.
251. Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia *N Engl J Med* 2011; 365:725-733. doi: 10.1056/NEJMoa1103849
252. Davies DM, Moscosso SP, Gohil S, et al. Design and structural modification of ROR1 CAR T-cells as a treatment for CLL. In *Human gene therapy* 2014;25(5): A17-A18
253. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007; 117(5):1167–1174
254. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012;24:207-212
255. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood*;2013:138-150

## 12. Přehled obrázků

Obr.	Název	str.
1.	Mapa vztahů dráhy Programované buněčné smrti [165]	30
2.	Schéma průtokového cytometru (A) a měřicí komory (B)	33
3.	Schéma systému fluidiky průtokového cytometru [168]	34
4.	Schéma optické lavice průtokového cytometru [169]	35
5.	Schéma sortovacího modulu [170]	37
6.	Stokesův posun [171]	38
7.	Příklad překryvu emisních spekter fluorochromů [169]	39
8.	Jablonského diagram [171]	40
9.	Scattergram FSC × SSC	41
10.	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (abs. počet) Zdraví dárce krve vers. doposud neléčení pacienti s CLL	53
11.	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (abs. počet) Zdraví dárce krve vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL	53
12.	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (abs. počet) Doposud neléčení pacienti vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním	54
13.	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%) Zdraví dárce krve vers. doposud neléčení pacienti s CLL	54
14.	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%) Zdraví dárce krve vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL	55
15.	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%) Dosud neléčení pacienti s CLL vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL	55
16.	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (abs. počet) Zdraví dárce krve vers. doposud neléčení pacienti s CLL	56
17.	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (abs. počet) Zdraví dárce krve vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL	56
18.	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (abs. počet) Dosud neléčení pacienti s CLL vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním	57
19.	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%) Zdraví dárce krve vers. doposud neléčení pacienti s CLL	57
20.	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%) Zdraví dárce krve vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL	58
21.	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%) Doposud neléčení pacienti s CLL vers. pacienti s relabovaným/refrakterním onemocněním CLL	58
22.	Absolutní počet CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> buněk u pacientů s CLL ve stádiích dle Bineta a zdravých dárců krve	59
23.	Absolutní počet CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> buněk u pacientů s CLL ve stádiích dle Bineta a zdravých dárců krve	60
24.	Absolutní počet CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> a CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> T-lymfocytů ve vztahu k mutačnímu stavu IGVH genu	62

### 13. Přehled tabulek

<b>Tab. č.</b>	<b>Název</b>	<b>str.</b>
Tab. č. 1.	Přehled nejdůležitějších diferenciálně diagnostických B-markerů [35]	15
Tab. č. 2.	Modifikovaná skórovací tabulka dle Matutes [77, 78]	18
Tab. č. 3.	Stážování CLL dle Bineta [80]	19
Tab. č. 4.	Stážování CLL dle Raie [81]	19
Tab. č. 5.	Přehled aplikací průtokové cytometrie [169, 172, 174]	44
Tab. č. 6.	Základní charakteristiky kohorty nemocných v době analýzy	50
Tab. č. 7.	Interpretační rámec Spearmanova korelačního koeficientu	52
Tab. č. 8.	Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro některé prognostické faktory	61
Tab. č. 9.	Procentuální zastoupení imunokompetentních subpopulací v době analýzy	65
Tab. č. 10.	Absolutní počet imunokompetentních subpopulací v době analýzy	65
Tab. č. 11.	Absolutní počet CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> a CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> subpopulací dle Binetova stádia	66

## 14. Publikační činnost autora

### Práce související s tématem dizertace

#### Původní vědecké publikace *in extenso* v časopisech s IF

**Novák M**, Procházka V, Turcsányi P, Papajík T. Number of CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Cells in Peripheral Blood of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia is Independent of Binet stage and Is Significantly Higher Compared to Healthy Volunteers, *Acta Haematologica*, **IF 0,994**, v tisku

Faber E, Divoká M, Skoumalová I, **Novák M**, Marešová I, Mičová K, Friedecký D, Adam T, Jarošová M, Indrák K. Lower dosage of imatinib is sufficient to maintain undetectable disease in patients with chronic myeloid leukemia with long-term LOW-grade toxicity of the treatment, *Leukemia and Lymphoma*, **IF 2,605**, v recenzním řízení

#### Původní práce v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Pika T, Lochman P, Flodr P, Mičková P, **Novák M**, Jehlíková Z, Hamplová A, Minařík J, Bačovský J, Kučerová L, Jarošová M, Ščudla V. Klinické aspekty „pravé“ nesekretorické formy mnohočetného myelomu, *Transfuze Hematol. dnes*, 19, 2013, No. 1, p. 27-32

Pika T, Flodr P, **Novák M**, Lochman P, Látalová P, Minařík J, Ščudla V. Klinická problematika IgM monoklonálních gamapatií, *Klin. Biochem. Metab.*, 22 (43), 2014, No. 2, p. 61–64

#### Přehledné/souborné vědecké práce v ostatních recenzovaných časopisech

**Novák M**, Procházka V. Mechanismy navozené imunotolerance nádorových buněk u chronické lymfatické leukemie a možnosti jejich detekce metodami průtokové cytometrie, *Transfuze Hematol. dnes*, 20, 2014, No. 2, p. 75–82

#### Kapitoly v monografiích

**Novák M**. Průtoková cytometrie. In: Cibiček N, Vacek J, a kol. Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014, 159 s

#### Publikovaná abstrakta k tématu dizertační práce

**Novák M**. Cytometrická analýza markerů dráhy programované buněčné smrti u chronické lymfatické leukemie. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2015, sborník abstrakt

Procházka V, Henzlová L, Buriánková E, Prouzová Z, Obr A, **Novák M**, Minařík J, Indrák K, Papajík T. Prognostic Impact of Interim and Final PET in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma Treated with Intensive Etoposide-Based Therapy, 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, December 6, 2014; *Blood*: 124 (21)

**Novák M**, Procházka V. Expres markeru funkční inaktivity PD-1 na lymfocytech koreluje s fází onemocnění u CLL. Konference vědeckých prací studentů DSP. Olomouc 2014, sborník abstrakt

**Novák M**, Procházka V, Pikalová Z, Papajík T. Korelace exprese markeru programované buněčné smrti (PD-1) na lymfocytech s fází onemocnění u chronické lymfatické leukemie. XV. Česko-slovenská konference laboratorní hematologie. Hradec Králové 2014, sborník abstrakt

**Novák M**, Procházka V, Pikalová Z. Expres markeru funkční inaktivity cytotoxických T-lymfocytů (PD-1) u CLL koreluje s fází onemocnění. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2014, sborník abstrakt

**Novák M**, Procházka V, Pikalová Z, Papajík T. Expres znaků funkční inaktivity na T-lymfocytech s chronickou lymfocytární leukémií. Konference vědeckých prací studentů DSP. Olomouc 2013, sborník abstrakt

- Procházka V, **Novák M**, Pikalová Z, Papajík T, Indrák K, Divoký V. Number of PD-1<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Cells in Peripheral Blood of Patients with Lymphoma Reflects Tumor Burden, Lymphoma Subtype, Disease Phase and Is Significantly Higher Compared to Healthy Volunteers, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012 120: Abstract 2670
- Novák M**, Procházka V, Urbanová R, Pikalová Z, Holzerová M, Humplíková L, Prouzová Z, Lapčíková A, Indrák K. Metachronní výskyt CLL u nemocné s neléčenou hairy cell leukémií, Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2012, sborník abstrakt
- Procházka V, Papajík T, Kubová Z, **Novák M**, Pikalová Z, Rožmanová Š, Jarošová M, Indrák K. Význam polymorfismu buněčné protinádorové imunity u pacientů s B-nehodgkinským lymfomem léčeným rituximabem. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2009, sborník abstrakt
- Procházka V, **Novák M**, Pikalová Z, Papajík T, Indrák K. Rituximab enhances cellular mediated cytotoxicity in patients with B-cell lymphoma: in vivo study of NK/T-cells activity – Haematologica, 2007, 92(1)
- Novák M**, Procházka V, Pikalová Z. Sledování aktivace cytotoxických T-lymfocytů po podání Rituximabu u pacientů s B-NHL metodou vícebarevné průtokové cytometrie Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2007, sborník abstrakt

### **Seznam přednášek/posterů k tématu dizertační práce**

- Novák M**. Cytometrická analýza markerů dráhy programované buněčné smrti u chronické lymfocytární leukémie. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2015
- Novák M**. Markery dráhy programované buněčné smrti - na stopě novému paradigmatu. Seminář Základy vícebarevné cytometrie v diagnostice, Praha 2015
- Novák M**. Mechanizmy navozené imunotolerance nádorových buněk cestou dráhy programované buněčné smrti u chronické lymfocytární leukémie a možnosti jejich detekce metodami průtokové cytometrie. Celoustavní seminář FNOL, Olomouc 2015
- Novák M**. Význam imunofenotypizace v diagnostice hematologických malignit, XXI. Pařízkovy dny, Ostrava 2015
- Novák M**. Mechanizmy navozené imunotolerance nádorových buněk cestou dráhy programované buněčné smrti u chronické lymfocytární leukémie a možnosti jejich detekce metodami průtokové cytometrie. Odborný seminář průtokové cytometrie (IPVZ), Praha 2015
- Novák M**, Procházka V, Pikalová Z, Papajík T. Korelace exprese markeru programované buněčné smrti (PD-1) na T-lymfocytech s fází onemocnění u chronické lymfocytární leukémie. XV. Československá konference laboratorní hematologie. Hradec Králové 2014
- Novák M**, Procházka V, Pikalová Z. Expres markeru funkční inaktivity cytotoxických T-lymfocytů (PD-1) u CLL koreluje s fází onemocnění. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2014
- Novák M**, Procházka V. Expres markeru funkční inaktivity PD-1 na lymfocytech koreluje s fází onemocnění u CLL. Konference vědeckých prací studentů DSP, Olomouc 2014
- Novák M**, Procházka V, Pikalová Z, Papajík T. Expres znaků funkční inaktivity na T-lymfocytech s chronickou lymfocytární leukémií. Konference vědeckých prací studentů DSP, Olomouc 2013
- Novák M**. Multicolor Flow cytometry. Celoustavní seminář FNOL, Olomouc 2013
- Novák M**. T-lymfocyty nemocných s chronickou lymfocytární leukémií vykazují vyšší expresi znaků funkční inaktivity ve srovnání se zdravými probandy, Olomoucké hematologické dny 2013
- Novák M**. Vybrané aplikace průtokové cytometrie v diagnostice lymfoproliferativních chorob. 9. moravské lymfomové symposium, únor 2013

- Novák M.** Multiparametrická cytometrie u monoklonálních gamapatií po dvou letech praxe, výsledky a atypické nálezy Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematooonkologických a onkologických pracovišť Moravy a Slezska, listopad 2013
- Novák M.** Multiparametrická cytometrie v diagnostice monoklonálních gamapatií a mnohočetného myelomu. Pracovní den Laboratorní vyšetření v onkologii, únor 2013
- Novák M.** Průtoková cytometrie v komplexním hodnocení štěpu krvetvorných buněk. Celouústavní seminář FNOL, prosinec 2013
- Novák M.** Význam T-REGs a PD-1 dráhy u lymfomů – první data. Celouústavní seminář FNOL, březen 2012
- Novák M.** Metachronní výskyt CLL u nemocné s neléčenou vlasatobuněčnou leukemií. 8. moravské lymfomové symposium, únor 2012
- Novák M.** Cytometrická diagnostika monoklonálních gamapatií. Setkání spolupracujících hematooonkologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy, listopad 2011
- Novák M.** Nové přístupy v cytometrické diagnostice monoklonálních gamapatií. Postgraduální seminář 3. IK-NRE, říjen 2011
- Novák M.** Nové přístupy v cytometrické diagnostice monoklonálních gamapatií. Celouústavní seminář FNOL, říjen 2011

## Ostatní publikace

### Původní práce v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

- Minarik J, Hrbek J, Pika T, **Novak M**, Bacovsky J, et al. X-Ray in Multiple Myeloma - Not a “Golden Standard” any More: Case Series. *J Bone Marrow Res* 2014;2:149. doi: 10.4172/2329-8820.1000149
- Luzna P, Kylarova D, **Novak M**, Lichnovsky V, Hematopoietic Stem Cell Separation for Experimental Purposes – Metodic Limitations, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009; Vol.153(2):121-124
- Juráňová J, **Novák M**, Pikalová Z. Kvantitativní stanovení hematopoetických progenitorových buněk na hematologickém analyzátoru krevních buněk, *Vnitřní lékařství*, 2008, 54(5):48

### Publikovaná abstrakta

- Novák M**, Pika T, Minařík J, Ščudla V. Raritní imunofenotypy u mnohočetného myelomu, Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2015, sborník abstrakt
- Slavík L, Prochazkova J, Ulehlova J, **Novak M**, Prochazka M. The role of tissue factor in activation coagulation system at pregnancy complications, In proceeding of: 23rd Biennial International Congress on Thrombosis, At Valencia, Volume: Thrombosis Research Vol 133, Suppl. 3
- Slavík L, Prochazka M, Prochazkova J, Lubusky J, Polak J, Ulehlova J, **Novak M**, Pilka R. Postup stanovení aktivace koagulačního systému tkáňovým faktorem u těhotenských komplikací. In proceeding of: XIV. slovensko-české dni laboratornej hematologie a tranfuziologie, At Bratislava
- Slavík L, Prochazka M, Prochazkova J, Lubusky J, Polak J, Ulehlova J, **Novak M**, Pilka R. The role of tissue factor in activation of coagulation system at pregnancy complications. In proceeding of: 58th Annual Meeting Society of Thrombosis Research, At Vienna
- Skoumalová I, Horálková L, Pikalová Z, **Novák M**, Marešová I, Faber E. Indikátory kvality autologního štěpu periferních kmenových buněk – korelace laboratorních parametrů a přihojení štěpu. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2012, sborník abstrakt
- Novák M**, Pikalová Z, Horálková L. Complex Flow-cytometry Analysis of Haemopoietic Stem Cell Graft. *Analytická cytometrie* 2011: 118-119

- Pikalová Z, **Novák M**, Szotkowski T, Procházka V. Duplicate Hematological Malignancies – A Case Report. Analytická cytometrie 2011: 120
- Novák M**, Horáková L, Pikalová Z, Skoumalová I. Vliv DMSO na viabilitu štěpu krvetvorných buněk. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2011, sborník abstrakt
- Katrincsáková B, Smutná V, Szotkowski T, Divoká M, Marešová I, Holzerová M, Hubáček J, Pikalová Z, **Novák M**, Galuszková D, Mužík J, Dušek L, Indrák K, Jarošová M. Mutácie v génoch IDH1/2 u akútnych myeloidných leukémií s normálnym karyotypom: naše skúsenosti, Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2011, sborník abstrakt
- Novák M**, Pikalová Z, Procházka V, Szotkowski T, Pika T. Duplicitní hematologické malignity – nálezy průtokové cytometrie, Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2011, sborník abstrakt
- Novák M**, Pikalová Z, Indrák K. Využití průtokové cytometrie pro detekci buněčných subpopulací v likvoru. Olomoucké neuroimunologické sympozium s mezinárodní účastí, Olomouc 2010, sborník abstrakt
- Pikalová Z, **Novák M**, Turcsányi P, Indrák K. Lymfoproliferace s atypickou expresí CD znaků-kazuistiky z našeho pracoviště. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2010, sborník abstrakt
- Juráňová J, **Novák M**, Pikalová Z. Analysis of precision determination of hematopoietic progenitor cells (HPC) level. Comparative study between hematology analyzer Sysmex XE-2100 and flow-cytometer. In: Sysmex Outstanding Science Award 2009
- Novák M**, Juráňová J, Procházka V, Pikalová Z, Indrák K. Zastoupení subpopulace BB9+ v populaci CD34+ buněk u pacientů stimulovaných filgrastimem ke sběru periferních kmenových buněk. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2009, sborník abstrakt
- Juráňová J, **Novák M**, Pikalová Z. Kvantitativní stanovení hematopoetických progenitorových buněk na hematologickém analyzátoru krevních buněk. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2008, sborník abstrakt
- Pikalová Z, **Novák M**, Procházka V. Postižení CNS u nemocných s hematologickými malignitami. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2006, sborník abstrakt

### **Seznam přednášek/posterů**

- Novák M**, Pika T, Minařík J, Ščudla V. Raritní imunofenotypy u mnohočetného myelomu. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 2015
- Novák M**. Monoklonální gamapatie s aberantní expresí plazmocytárních markerů. XX. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy. Prostějov, listopad 2013
- Novák M**. Průtoková cytometrie v diagnostice PNH – nové obzory. Celoustavní seminář FNOL, duben 2013
- Novák M**. Stanovení dendritických buněk metodou průtokové cytometrie. Celoustavní seminář FNOL, leden 2012
- Novák M**. Stanovení viability krvetvorných buněk pomocí průtokové cytometrie. Celoustavní seminář FNOL, březen 2011
- Novák M**. Nález duplicitních hematologických malignit při imunofenotypizačním vyšetření průtokovou cytometrií. 7. moravské lymfomové symposium, leden 2011
- Novák M**. Homo sapiens versus Toxoplasma gondii aneb Jsme pány vlastních neuronů? XI. tradiční setkání studentů a absolventů Lékařské fakulty UP v Olomouci, Zlaté Hory, leden 2011
- Novák M**. Význam průtokové cytometrie v diagnostice postižení CNS hematologickou malignitou. Primářské kolegium Prostějov - Setkání spolupracujících pracovišť, listopad 2010



- Novák M.** Role průtokové cytometrie v detekci monoklonálních gamapatií. Celoústavní seminář FNOL, listopad 2010
- Novák M.** Využití průtokové cytometrie pro detekci buněčných subpopulací v likvoru. 6. neuroimunologický kongres s mezinárodní účastí, Olomouc, září 2010
- Novák M.** Nálezy atypických lymfoproliferací v roce 2009 – Laboratoř průtokové cytometrie. Celoústavní seminář FNOL, únor 2010
- Novák M.** Stanovení MRD u Ly+ AML metodou čtyřbarevné průtokové cytometrie. Celoústavní seminář FNOL, říjen 2009
- Novák M.** BB9 – nový marker kmenových buněk. Celoústavní seminář FNOL, červen 2009
- Novák M.** Duplicity hematologických malignit z pohledu průtokové cytometrie. Celoústavní seminář FNOL, březen 2009
- Novák M.** Analýza MRD u B-CLL metodou vícebarevné průtokové cytometrie. Moravské lymfomové symposium 2008 a Celoústavní seminář FNOL, únor 2008
- Novák M.** Přínos průtokové cytometrie pro sortování jaderných krevních elementů. Celoústavní seminář FNOL, květen 2006