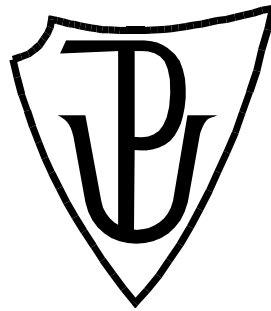


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Detekce mikropartikulí metodou průtokové cytometrie
u hematologických malignit**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jan Grohmann
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Martin Novák Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne *podpis diplomanta*

Děkuji panu RNDr. Martinu Novákovi Ph.D. za ochotu, vstřícnost, cenné rady a připomínky, které mi jako vedoucí mé diplomové práce udělil při jejím zpracování. Mé poděkování také patří kolektivu pracovníků v laboratořích Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za přátelský přístup a spolupráci při realizaci mého výzkumu. Děkuji také RNDr. Tomáši Fürstovi Ph.D. za cenné rady při statistickém vyhodnocení mé práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Jan Grohmann
Název práce:	Detekce mikropartikulí metodou průtokové cytometrie u hematologických malignit.
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a Fakultní nemocnice Olomouc
Vedoucí práce:	RNDr. Martin Novák Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2019
Abstrakt:	<p>V současné době studium mezibuněčné komunikace prostřednictvím extracelulárních vezikul odkrývá nové poznatky ve fyziologických i patologických procesech lidského organismu. Mezi tyto vezikuly řadíme i mikropartikule, jenž hrají důležitou roli v mikroprostředí malignit.</p> <p>Mikropartikule jsou částice (100–1000 nm) odvozené od plazmatické membrány mateřské buňky. Díky této vlastnosti jsme schopni pomocí povrchových antigenů tyto částice detekovat průtokovou cytometrií. Tato práce je zaměřena na vytvoření analytického protokolu pro detekci mikropartikulí metodou průtokové cytometrie u onemocnění chronická lymfatická leukemie. Zároveň byl také zkoumán vztah mezi maligními B-lymfocyty a z nich formovanými mikropartikullemi.</p> <p>Výsledky této práce demonstrují novou metodu detekce mikropartikulí pomocí průtokové cytometrie a přináší nové poznatky o vztahu populace mikropartikulí s nádorovou náloží.</p>
Klíčová slova:	Extracelulární vezikuly, mikropartikule, chronická lymfatická leukemie, průtoková cytometrie
Počet stran:	60
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Jan Grohmann

Title: The detection of microparticles in hematological malignancies by flow cytometry.

Type of thesis: Diploma

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

Supervisor: RNDr. Martin Novák Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract: In the 21st century a research study of cell to cell communication by extracellular vesicles discovered new information about physiological and pathological processes in the human organism. A subgroup of extracellular vesicles called microparticles plays an important role in the microenvironment of malignancies.

Microparticles are particles (100 – 1000 nm) derived from plasmatic membrane of the maternal cell. Due to it is property we are able to detect these particles via flow cytometry using surface antigens.

This work is focused on the development of an analytic protocol for detection of microparticles using flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia. The relationship between malignant B-lymphocytes and the microparticles formed from them was also investigated.

The results of this work demonstrate a new method of detecting microparticles using flow cytometry. It also provides new information about the relationship between the microparticles population and tumour burden.

Keyword: Extracellular vesicles, microparticles, chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry

Number of pages: 60

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah		
1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	3
2.1	Extracelulární vezikuly	3
2.1.1	Nomenklatura	4
2.2	Mikropartikule	5
2.2.1	Formování mikropartikulí	6
2.2.2	Biologické funkce mikropartikulí	11
2.2.2.1	Transport lipidů	12
2.2.2.2	Transport proteinů	13
2.2.2.3	Transport microRNA	15
2.3	Chronická lymfatická leukemie	16
2.3.1	Diagnostika chronické lymfatické leukemie	18
2.3.2	Molekulární cytogenetika	20
2.3.3	Prognostické faktory/nástroje u CLL	23
2.3.4	Funkce CLL mikropartikulí	25
3	Experimentální část	27
3.1	Cíle práce	27
4	Materiály a metodika	28
4.1	Chemikálie a protilátky	28
4.2	Přístrojové a laboratorní vybavení	28
4.3	Metodika	28
4.3.1	Krevní vzorky	28
4.3.2	Příprava vzorků	28
4.3.3	Průtoková cytometrie	29
4.3.3.1	Vnitřní kontrola kvality	29
4.3.3.2	Threshold	29
4.3.3.3	Detekce mikropartikulí, gatovací strategie	30
4.3.4	Statistické zpracování výsledků	33
5	Výsledky	34
5.1	Charakteristika měřené skupiny pacientů	34
5.2	Vizualizace dvoubarevných měření CLL MP	34
5.3	Statistická analýza naměřených dat	38
5.4	Trojbarevné experimenty CD5/CD19/CD52	42

6	Diskuze	46
7	Závěr	48
8	Literatura	50
9	Seznam použitých zkratek	59

1 Úvod

U mnohobuněčných organismů je udržování homeostázy výsledkem jemné rovnováhy mezi proliferací buněk a jejich degenerací. Buňky během své existence rostou, diferencují se, dělí se, plní své příslušné funkce v organismu, a nakonec podstupují programovanou buněčnou smrt, kdy jsou v konečném důsledku odstraněny z organismu fagocytózou. V každé fázi života je buňka podrobena řadě stimulací vedoucích k uvolnění submikronových fragmentů z plazmatické membrány. Tyto částice jsou obecně označovány jako extracelulární vezikuly (EV). Jednou z podskupin a předmětem této práce jsou tzv. mikropartikule (MP), nazývané také mikrovezikule (Hugel *et al.*, 2005; van der Pol *et al.*, 2012).

První náznak existence tohoto kompletního signálního mechanismu byl publikován v roce 1946 v práci autorů Chargaff *et West*, kteří se zabývali tromboplastickým proteinem (dnes tromboplastin). Analýzou srážecího času supernatantu (aktivovaný koagulační čas) z bezbuněčné krevní plazmy při různě nastavených centrifugačních rychlostech došlo k jeho významnému prodloužení, a to ve vysokorychlostní ultracentrifugační frakci (31 000 g). Následně byl sediment z této frakce přidán zpět do krevní plazmy, kde posléze došlo ke zkrácení srážecího času. Tento experiment poukázal na skutečnost, že bezbuněčná plazma obsahuje subcelulární faktor aktivující srážení krve.

Další posun v této oblasti byl uskutečněn o více než 20 let později vědcem Wolf P. v roce 1967, který pomocí elektronového mikroskopu demonstroval subcelulární frakci malých vezikul vzniklých z krevních destiček. Tyto vezikuly následně pojmenoval jako „platelet dust“. Z hlediska velikosti se jednalo o velmi malé částice v průměru mezi 20 až 50 nm. V následujících letech se postupně začal provádět výzkum i v této nevelmi probádané oblasti.

V roce 1994 Satta *et al.* popsala mikropartikule vzniklé původem z monocytů. Tyto MP byly generovány po stimulaci monocytů pomocí lipopolysacharidů. Následně v roce 1999 byly popsány další MP vzniklé z lidských endoteliálních buněk umbilikální žíly (Combes *et al.*, 1999).

Těmito objevy v oblasti extracelulárních vezikul začalo rozkrývání nového signálního mechanismu intracelulární buněčné komunikace. Ke známým mechanismům, jako je přímý kontakt buňky s buňkou a transfer informace pomocí

sekretovaných molekul, přibyl třetí mechanismus, intracelulární transfer pomocí extracelulárních vezikul (Raposo *et Stoorvogel*, 2013).

V současné době studium tohoto třetího mechanismu přináší nové poznatky v mnoha biologicko-chemických směrech vedoucích k pochopení signálních mechanismů v lidském těle. Funkce EV včetně MP je odkrývána nejen ve fyziologických procesech, ale také v patologických stavech. Vliv MP se objevuje u řady procesů, jako je angiogenese, poškození krevního systému (např. infarkt myokardu), krevního srážení, řízení imunity organismu nebo u nádorových onemocnění (Hugel *et al.*, 2005).

Předmětem této práce je studium a detekce MP v oblasti hematologických malignit. Základní metodou pro rychlé stanovení diagnózy u pacienta s hematologickou malignitou je průtoková cytometrie. Pomocí navázaných protilátek na povrchové antigeny na buňkách periferní krve lze díky použití laseru fenotypizovat cílenou populaci, a tím i získat informace o druhu hematologické malignity. Detekce MP, které nesou stejné povrchové antigeny/proteiny jako mateřská buňka, tak může být využita jako doplňková metoda pro stanovení diagnózy, sledování aktivity onemocnění u pacienta, stanovení minimální reziduální nemoci nebo v případech, kdy se ložisko nádoru nachází v místech, kde případná biopsie není proveditelná.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Extracelulární vezikuly

Extracelulární vezikuly (EV), jež jsou uvolňovány z prokaryotických i eukaryotických buněk jako signální částice, jsou malé fosfolipidovou dvouvrstvou obalené částice o velikosti v rozmezí 30 nm až 1 μm . Z důvodu jejich malé velikosti (až 100 \times menší než nejmenší buňky) a různorodosti jsou obtížně počítány a fenotypizovány konvenčními metodami. V současnosti se mezi nejpoužívanější metody pro detekci EV řadí: elektronová mikroskopie (EM), nanoparticle tracking analysis (NTA), dynamic light scatter (DLS), resistive pulse sensing (RPS) a konvenční a dedikovaná průtoková cytometrie (princip jednotlivých metod je shrnut v Tab. 1). Metody EM, NTA i RPS jsou schopné zjistit údaje o průměru a koncentraci EV, ale dosahují svého limitu u multi-parametrické fenotypizace (multi-parameter phenotyping) jednotlivých EV. Naopak průtoková cytometrie je schopna tuto multi-parametrickou fenotypizaci u jednotlivých EV provést. Proto se ze zmíněných metod jeví použití průtokové cytometrie s vysokým rozlišením jako nejslibnější způsob detekce těchto částic (van der Pol *et al.*, 2012; Rupert *et al.*, 2017; Welsh *et al.*, 2017).

Tab. 1 Shrnutí hlavních technik a jejich principu měření pro charakterizaci extracelulárních vezikul (EV); (Upraveno podle Rupert *et al.*, 2017)

Metoda	Princip měření	Měřitelná veličina
Elektronová mikroskopie	Vytvoření snímku částic pomocí elektronů (v řádu nanometrů)	Struktura a morfologie
Nanoparticle tracking analysis (NTA)	Sledování Brownova pohybu částic ve fluorescenčním nebo scattering modu	Velikost částic
	Měření intenzity scatteringu jedné částice a následně její korelace s velikostí determinovanou pomocí NTA	Refraktivní index
Dynamic light scatter	Analýza fluktuace intenzity scatteringu částic při Brownově pohybu	Velikost částic
Resistive pulse sensing (RPS)	Měření změny vodivosti přes snímaný pór při průchodu částice	Velikost částic
	Kvantifikace rychlosti průchodu částic přes pór v přítomnosti elektrického pole; ve spojení s měřením velikosti pomocí RPS	Zeta potenciál
Průtoková cytometrie	Měření intenzity scatteringu nebo fluorescence částic indukované pomocí laseru	Intezita fluorescence

Buňky jsou schopny uvolňovat velké množství těchto částic do svého okolí. Proto tělní tekutiny jako krev či moč obsahují obvykle 10^{10} těchto vezikul v 1 ml (Dragovic *et al.*, 2011). Funkce EV spočívá v mnoha procesech, jako je například nitrobuněčná signalizace, koagulace či vylučovací procesy. Jelikož EV mohou hrát roli i v patologických stavech, vzrůstá jejich význam pro terapii a diagnostiku různých onemocnění nebo pro hledání nových markerů k určení zdravotního stavu daného pacienta. Vzhledem k povaze EV je jejich klasifikace velmi obtížná (van der Pol *et al.*, 2010).

2.1.1 Nomenklatura

Z důvodu vysoké náročnosti detekce i různých postupů při klasifikaci neexistuje konsenzus o nomenklatuře těchto buňkou uvolňovaných vezikul. Jako příklad lze uvést pojmenovávání vezikul po buňkách nebo tkáních, ze kterých byly uvolněny [např. prostatosomy – prostatou uvolňované vezikuly (Stegmayr *et Ronquist*, 1982)]. Nicméně tento typ pojmenování neposkytuje vodítka pro klasifikaci s ohledem na typ zahrnutých vezikul (van der Pol *et al.*, 2012).

Podle dalších studií došlo u EV k rozdělení na exosomy, mikropartikule a apoptotické vezikuly. Dodatečně byly na základě fyzikálně-chemických vlastností zahrnujících velikost, hustotu, sedimentaci, složení lipidů či subcelulární původ, charakterizovány ektozomy, membránové částice a vezikuly podobné exosomům. (Théry *et al.*, 2009).

Ačkoliv je tato klasifikace prozatím nejrozsáhlejší, je velmi obtížné ji používat v každodenní praxi. Jako příklad lze uvést vezikul o velikosti 50 nm, který může být podle tohoto schématu klasifikován jako exosom, ektozom, membránová částice, vezikul podobný exosomu nebo apoptotický vezikul. Dále lze zmínit fakt, že v praxi je příprava vezikul různorodá. Existuje velké množství pracovních protokolů, které umožňují zvýšit izolaci jednoho druhu EV nad jiným (Théry *et al.*, 2009; van der Pol *et al.*, 2012).

Podle van der Pol *et al.* (2012) by se měly rozdělovat extracelulární vezikuly na čtyři základní skupiny – exosomy, mikrovezikuly (mikropartikule), membránové partikule a apoptotické vezikuly. Existence ektozomů a exosomům podobné vezikuly byla zpochybněna na základě provedených experimentů (Théry *et al.*, 2009; van der Pol *et al.*, 2012).

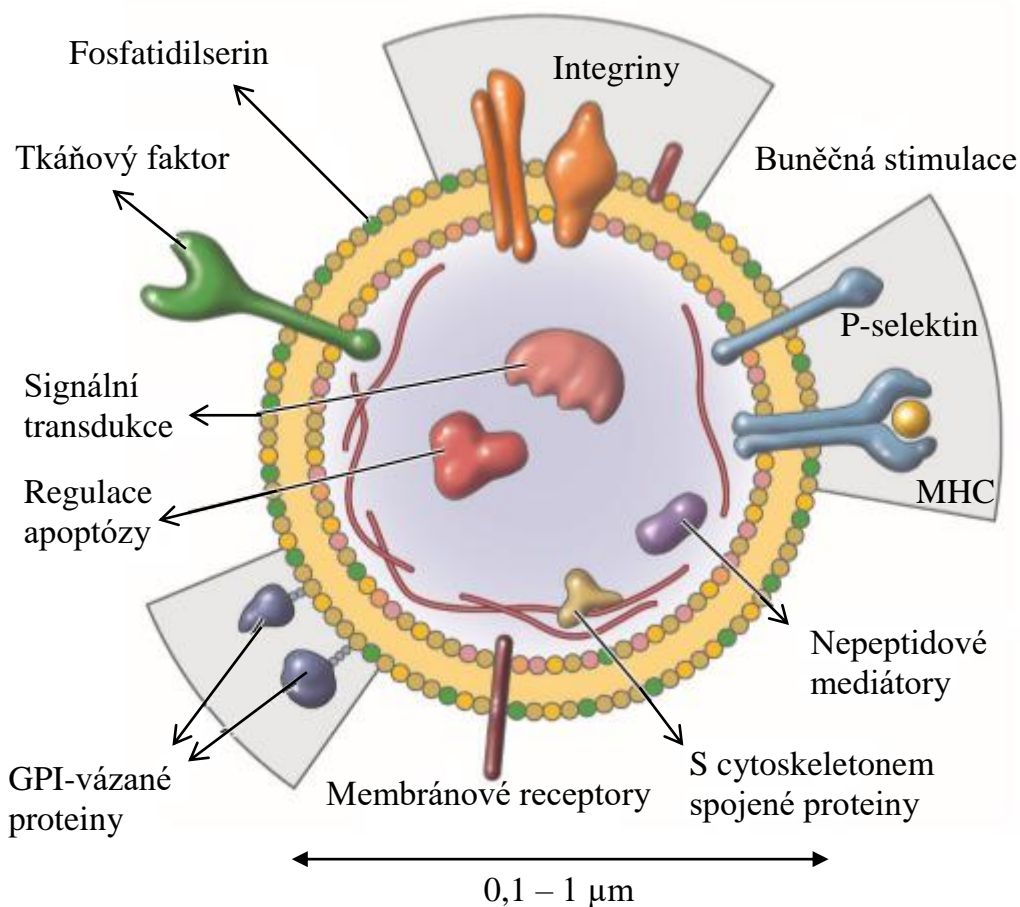
Ektosomy byly jako částice pozorovány pouze *in vitro*. Dále v době, kdy byly popsány u neutrofilů, nebylo ještě známo, že neutrofilové uvolňují i MP (Dalli *et al.*, 2008). Velikost těchto částic, jež je udávána jako 50–200 nm, byla studována metodou průtokové cytometrie za použití 200nm polystyrenových nebo křemičitanových kuliček (oxid křemičitý – SiO₂). Nicméně při srovnávání polystyrenových a křemičitanových kuliček se synteticky vyrobenými lipidovými vezikuly bylo zjištěno, že polystyrenové a křemičitanové kuličky rozptylují více světla při vlnové délce 488 nm (forward scatter mode – FSC) pro danou velikost částice než syntetické vezikuly. Ve výsledku tak došlo ke zkreslení počtu a velikosti měřených částic (Chandler *et al.*, 2011; van der Pol *et al.*, 2012).

Exosomy podobné vezikulům o velikosti 55 kDa byly prokázány u receptoru pro Tumor necrosis factor (TNF receptor). Následně bylo omylem hlášeno, že se nejvíce vyskytují ve frakci kondicionovaného média z lidských endoteliálních buněk umbilikální žíly (HUVEC) nebo u tělních tekutin získaných bronchoalveolární laváží při centrifugaci 175 000 tíhového zrychlení (g), zatímco se převážně vyskytují v 100 000g frakcích, což jsou frakce, ze kterých se obvykle izolují i exosomy (Théry *et al.*, 2009). Mikrofotografie z transmisního elektronového mikroskopu dále dokumentují poškozené a přerušené vezikuly, což ztěžuje odhad skutečné velikosti vezikul. Došlo také k prokázání výskytu exosomů v kondicionovaném médiu z lidských HUVEC i v tekutinách z bronchoalveolární laváže (Admyre *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2009).

2.2 Mikropartikule

Mikropartikule (MP) jsou vezikuly odvozené od plazmatické membrány, které jsou vylučovány ze stimulovaných nebo apoptotických buněk (Obr. 1). Jejich přítomnost je interpretována proximálními nebo vzdálenými buňkami v základních fyziologických procesech jako je mezibuněčná komunikace, hemostáza a imunita. Naproti tomu, se u patologických stavů často objevují změny počtu nebo charakteristik těchto vezikul (Hugel *et al.*, 2005).

Přestože je MP obtížné popsat přesnou definicí, často bývají definovány jako heterogenní populace sférických struktur o průměru 100 až 1000 nm. Jejich izolace se obvykle provádí centrifugací v rozmezí 10 000 až 20 000 g. Od exosomů (průměr 50



Obr. 1 Schematický obrázek mikropartikule odvozené ze stimulované nebo apoptotické buňky. Jelikož jsou mikropartikule uvolňovány z mateřské buňky jako fosfolipidové vezikuly, získávají tak i její specifické antigeny a bioaktivní efekторы. Legenda: MHC – hlavní histokompatibilní komplex; GPI – glykosilfosfatidylinositol (Upraveno podle Hugel *et al.*, 2005)

až 100 nm) se odlišují nejen velikostí, ale i vznikem. Zatímco MP jsou uvolňovány z plazmatické membrány pomocí ektocytózy jako fosfolipidové vezikuly, tudíž exprimují specifické antigeny rodičovské buňky, exosomy oproti tomu vznikají jako předformované vezikuly v intracelulárním kompartmentu a jsou následně vylučovány fúzí endosomálních oddílů s plazmatickou membránou buněk (Piccin *et al.*, 2007; Théry *et al.*, 2009; Mause *et Weber*, 2010; van der Pol *et al.*, 2012).

2.2.1 Formování mikropartikulí

Formování MP je proces, při kterém dochází ke změně asymetrie fosfolipidů v plazmatické membráně buňky. Ačkoliv přesný molekulární mechanismus není zcela objasněn, cytoskeletální reorganizace a změny v symetrii fosfolipidů ve fosfolipidové dvouvrstvě jsou klíčovými procesy vedoucími ke vzniku většiny MP. Formování je

obvykle zahájeno aktivací buňky různými agonisty nebo vyvoláním její buněčné smrti neboli apoptózy (Morel *et al.*, 2011).

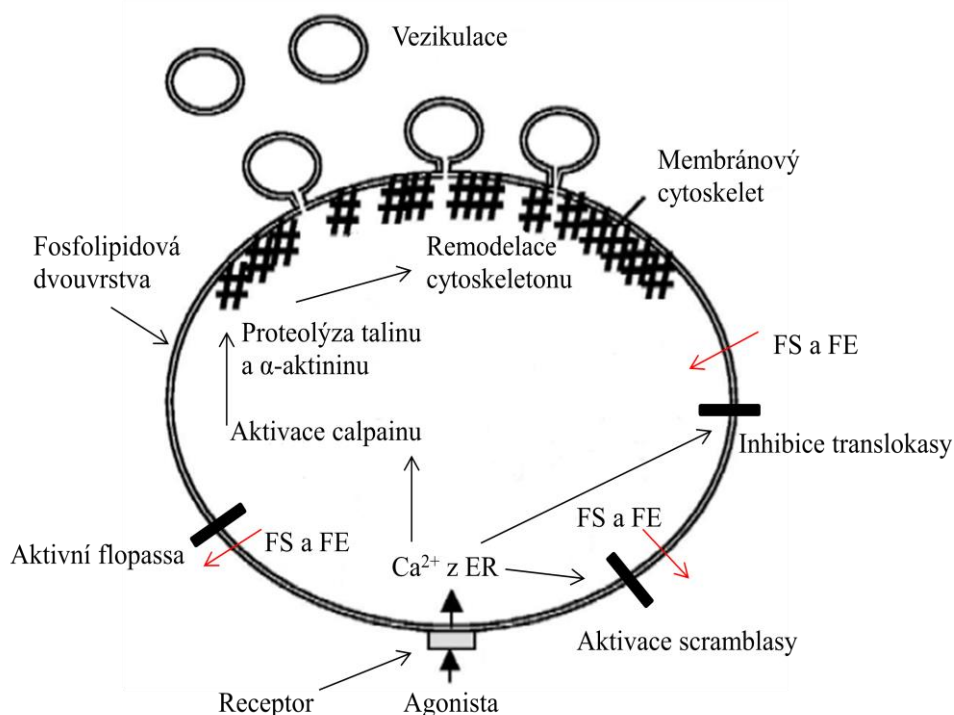
Složení a distribuce membránových fosfolipidů v cytoplazmatické membráně je velmi specifické: Zatímco cholinofosfolipidy [fosfatidilcholin (FC) a sfingomyelin (SM)] jsou lokalizovány ve vnější membránové vrstvě, aminofosfolipidy [fosfatidilserin (FS) a fosfatidylethanolamin (FE)] se vyskytují převážně na vnitřní straně plazmatické membrány. Celkem pět proteinů je zapojeno do regulace asymetrické distribuce těchto fosfolipidů, což má za následek tvorbu MP. Tyto proteiny byly popsány jako flopassa, scramblasa, aminofosfolipid translokasa (flipasa), calpain a gelsolin (Bever *et al.*, 1999; Piccin *et al.*, 2007). Pátý zmíněný protein gelsolin není přítomný ve všech buňkách, ale jeho výskyt byl potvrzen např. u krevních destiček (Lind *et al.*, 1982).

Formování MP je zahájeno aktivací buňky pomocí různých agonistů. Přitom stimul může být pro každý typ buňky jiný. Například krevní destičky mohou být aktivovány stimulací trombinem, kolagenem či Ca ionoforem A23187 (Barry *et al.*, 1997), endoteliální buňky a monocyty uvolňují MP po aktivaci bakteriálními lipopolysacharidy (Watanabe *et al.*, 2003) či cytokiny TNF a interleukinem-1 (Leeuwenberg *et al.*, 1992). Po aktivaci buňky následuje influx iontů Ca^{2+} z endoplazmatického retikula do cytosolu. Zvýšená koncentrace iontů Ca^{2+} v konečném důsledku aktivuje proteiny scramblasy (Williamson *et al.*, 1992), gelsolin (Gremm *et Wegner*, 1999) a calpain (Pasquet *et al.*, 1996). Naopak inaktivuje flipasu (Bitbol *et al.*, 1987).

Za fyziologického stavu je v buňkách aktivní protein flipasa (EC 7.6.2.1; Obr. 2). Jedná se o ATP dependentní kontinuálně exprimovanou translokasu, která je velmi specifická pro aminofosfolipidový transport (FS a FE) z vnější strany membrány do vnitřní proti jejich elektrochemickému gradientu. Na každý přenos molekuly FS nebo FE je spotřebována jedna molekula ATP. Aktivita translokasy je inhibována zvýšenou koncentrací cytosolických iontů Ca^{2+} uvolněných z endoplazmatického retikula (Bitbol *et al.*, 1987; Belezny *et al.*, 1993; Burger *et al.*, 2013). Druhý aktivní lipidový transporter flopassa (Obr. 2), který je zahrnut do proteinové rodiny ABC transportérů (ATP vazebný kazetový transporter), naopak působí opačným směrem oproti translokase. Tento obrácený transport je méně specifický než u translokasy, jelikož dochází k transportu cholin- i aminofosfolipidů. Rychlost přenosu fosfolipidů směrem na vnější stranu membrány je velmi malá s poločasem kolem 1,5 h na rozdíl od přenosu směrem dovnitř, který má poločas kolem 5 až 10 minut. Inhibice flopassy

i translokasy nastává také v důsledku deplece ATP, modifikace histonů nebo sulfhydrylové oxidace (Bever *et al.*, 1999; Burger *et al.*, 2013).

Buněčná aktivace



Obr. 2 Schematický obrázek znázorňující formování mikroparticulí při buněčné aktivaci. Při aktivaci buňky dochází k influxu iontů Ca^{2+} z endoplazmatického retikula, což má za následek změny asymetrie membrány a změny v submembránovém cytoskeletu. Červené šipky znázorňují směr, kterým dochází k transportu fosfatidilserinu (FS) a fosfatidylethanolaminu (FE) ve fosfolipidové dvouvrstvě v případě aktivního lipidového transporteru (Upraveno podle VanWijk *et al.*, 2003).

Třetí lipidový transporter v pořadí, fosfolipidová scramblasa (nejznámější PLSCR1, 37 kDa; Obr. 2), je skupina homologních proteinů, jež se vyskytují u všech eukaryotických organismů. Scramblasy jsou aktivovány při různých buněčných událostech, jako je apoptóza či poškození buňky nebo buněčná aktivace. V plazmatické membráně fungují jako obousměrný nesespecifický lipidový transportér nezávislý na spotřebě ATP, který je aktivovaný influxem Ca^{2+} . Po aktivaci způsobují ztrátu asymetrie fosfolipidové dvouvrstvy, která se vyznačuje vysokým obsahem FS na vnější straně membrány. FS je typický fosfolipid přítomný na povrchu MP (Bever *et al.*, 1999; Zwall *et al.*, 2004; Sahu *et al.*, 2007).

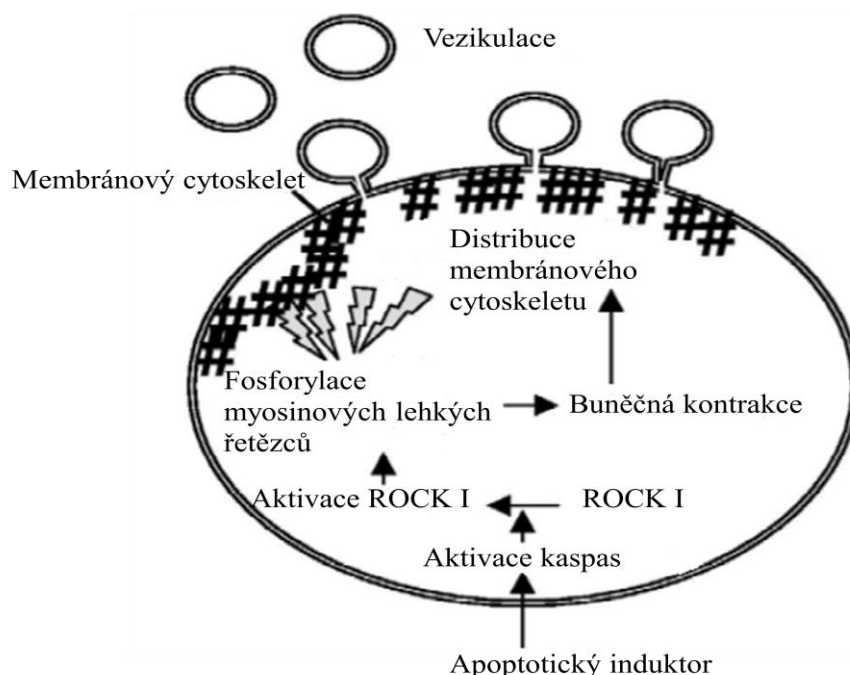
Kromě změny asymetrie membrány jsou nutné i změny v submembránovém cytoskeletu. V této úloze hrají důležitou roli proteiny calpain (Obr. 2) a gelsolin. Calpain (EC 3.4.22.52) je cytosolický cystein proteasový enzym, který je při aktivaci influxem iontů Ca^{2+} z endoplazmatického retikula a zároveň i transportem přes plazmatickou membránu do cytosolu translokován do membrány cytoskeletu (Wencel-Drake *et al.*, 1991; Pasquet *et al.*, 1996). V této rodině proteinů jsou zahrnuty dva nejprostudovanější izoenzymy μ a m calpain, které mají identickou 30 kDa malou podjednotku, ale rozdílnou velkou 80 kDa podjednotku. V závislosti na nárůstu koncentrace intracelulárních iontů Ca^{2+} dochází postupně k autolýze velké 80 kDa katalytické podjednotky tohoto enzymu na aktivní proteasu (76–78 kDa) (Samis *et al.*, 1987; Suzuki, 1987). Hlavní funkce calpainu při tvorbě MP je proteolýza cytoskeletálních filament, zejména talinu a α -aktininu, což má za následek remodelaci submembránového cytoskeletu (Fox *et al.*, 1990; Miyoshi *et al.*, 1996). V případě onemocnění trombotickou trombocytopenickou purpurou byla zjištěna velká tvorba MP v přítomnosti aktivovaného calpainu (Kelton *et al.*, 1992).

Druhý protein gelsolin je specifický pro tvorbu MP v krevních destičkách (spolupracuje s calpainem). Aktivací cytosolickým influxem Ca^{2+} [obsahuje více vazebných domén pro ionty Ca^{2+} ; obvykle váže 2 ionty Ca^{2+} (Gremm *et Wegner*, 1999)] se gelsolin připojí na aktinové filamenta (F-actin), která následně rozdělí. Při tomto procesu zůstává navázán na tzv. ostrém konci (barbed end) jako čepička. Výsledkem je vznik krátkých aktinových filament, která se nemohou k sobě opět připojit nebo se prodlužovat na ostrých koncích. Tímto způsobem se celá síť rozvolní (Hartwig, 1992; McGough *et al.*, 1998).

K uvolňování MP dochází také v raných fázích apoptózy (Obr. 3) (Piccin *et al.*, 2007). Zde je vznik MP spojován zejména s tzv. membránovým blebbingem. Jedná se o vznik nepravidelných plazmatických výčnělků neboli blebů (až 2 μm), které vznikají součinností Rho-guanosin trifosfátové activity a rozvolněním cytoskeletu. Blebbing je charakteristický pro programovanou buněčnou smrt, nicméně se objevuje i u buněčného pohybu a cytokineze (Fackler *et Grosse*, 2008).

Proces uvolnění MP je zprostředkováván fosforylací myosinových lehkých řetězců (MLC) pomocí aktivované serin/treonin Rho-associated protein kinasy I (ROCK I; EC 2.7.11.1), jedné z efektorů malé GTPasy Rho (Amano *et al.*, 1996). Aby došlo k aktivaci ROCK I, musí být kinasa nejprve štěpena na jejím C-konci (na rezidui Asp 1113) apoptotickým enzymem kaspasou-3 (EC 3.4.22.56) (Sebbagh *et al.*, 2001).

Apoptóza



Obr. 3 Formování mikroparticulí v raných fázích apoptózy. Vnik MP při apoptóze je spojen s aktivací kinasy ROCK I štěpením pomocí kaspas. ROCK I následně způsobí změny v membránovém cytoskeletu. Legenda: ROCK I – Rho-associated protein kinasa I (Upraveno podle VanWijk *et al.*, 2003)

Tato signalizace byla prokázána aktivací ROCK I u neapoptotické Jurkat buněčné linie (T linie), kde v konečném důsledku došlo k blebbing u více jak 80 % buněk. Výsledky tak naznačují velkou úlohu kinasy ROCK I v procesech programované buněčné smrti a s tím i spojenou tvorbu MP. U apoptotických MP z Jurkat buněk byl dále prokázán přenos těchto MP na makrofágy, kde v některých případech došlo až k aktivaci apoptózy. Tento jev nebyl u jiných buněčných linií prokázán (Distler *et al.*, 2005). Důležitá úloha kaspasy-3 ve štěpení ROCK I byla prokázána *in vitro* sledováním průběhu apoptózy u buněčné linie rakoviny prsu MCL-7. Při vyvolání apoptózy u této linie, jež je defektní v *CASP-3* genu, sice dojde k buněčné smrti, ale nedochází k fragmentaci DNA ani k morfologickým změnám čili blebbing plazmatické membrány (Jänicke *et al.*, 1998).

Po zformování MP je možno sledovat jejich původ pomocí specifických povrchových proteinových markerů mateřské buňky. Této skutečnosti se využívá zejména u metody průtokové cytometrie nebo ELISA. Například určení přítomnosti imunotypových znaků cluster of differentiation (CD) 3, CD4 nebo CD8 značí

T-lymfocytární původ (Kammer *et al.*, 1988), MP z krevních destiček (platelet derived MP – PDMP) exprimují glykoproteiny IIb-IIIa (Salanova *et al.*, 2007) nebo glykoprotein IX (CD42a) (Hickey *et al.*, 1989). Podobně detekujeme na povrchu endoteliálních MP (EMP) znaky CD 31, CD34, CD51, CD54, CD62E (E-selektin), CD62P (P-selektin) a CD146. (Mutin *et al.*, 1997).

Díky negativnímu náboji FS na povrchu MP, lze tyto struktury specificky detekovat také antikoagulantem Anexinem V. (Koopman *et al.*, 1994). Nicméně přesnost detekce může záviset na složení plazmatické membrány mateřské buňky. U některých druhů MP proto dochází ke zkreslení výsledků. Jako příklad lze uvést EMP, kde výsledná detekce Anexinem V vykazuje až 35× nižší koncentraci než při použití typického povrchového znaku na EMP (CD31 nebo CD62E) (Horstman *et al.*, 2004).

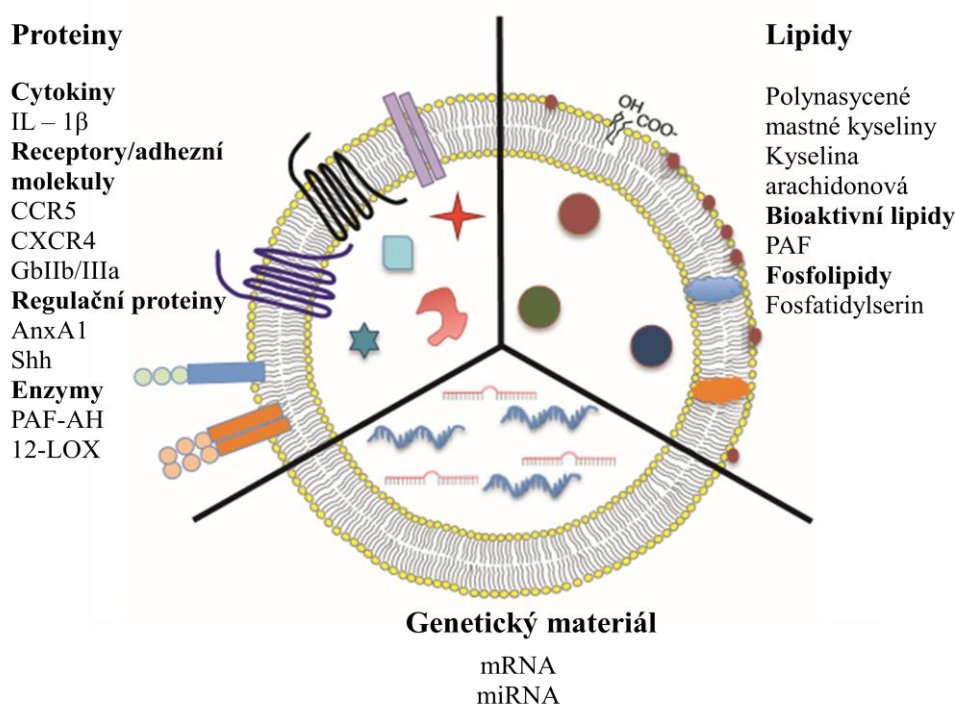
2.2.2 Biologické funkce mikropartikulí

Během formování získávají MP velkou řadu komponent pocházejících z mateřské buňky. Tato skupina zahrnuje proteiny, lipidy i genetický materiál (DNA, RNA i microRNA – miRNA) (Obr. 4). Přitom proces, při kterém jsou inkorporovány do MP, není náhodný (Norling *et Dalli*, 2013).

Například při proteomické analýze EMP metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) byla zjištěna rozdílná distribuce proteinů u porovnávaných skupin MP. Při srovnání tří rozdílných populací EMP [nestimulované, stimulované plasminogenem aktivátorem inhibítorem typu I (PAI-1) nebo TNF- α] uvolněných z buněčné linie HUVEC bylo identifikováno 231 unikátních proteinů pro EMP, 104 proteinů po stimulaci PAI-1 a 70 proteinů pro TNF- α , přičemž společných proteinů pro všechny tři skupiny bylo nalezeno 432. Tyto výsledky ukazují, že obsah MP se mění v závislosti na jejich vnějším stimulu (Peterson *et al.*, 2008).

Jelikož formování MP je velmi regulovaný a selektivní proces, můžeme předpokládat, že MP hrají důležitou roli v mezibuněčné komunikaci. Za fyziologických podmínek lze naměřit malé množství MP cirkulujících v periferní krvi (Toth *et al.*, 2007; Barteneva *et al.*, 2013). Z tohoto množství mají podle fenotypu největší zastoupení PDMP (až 80 %), které doplňuje 10 % leukocytárních MP a 10 % EMP (George *et al.*, 1982; Ghosh *et al.*, 2010). U patologických stavů naopak dochází ke zvýšení koncentrace i změně fenotypu MP, což naznačuje určitou roli těchto částic

u různých druhů onemocnění zahrnující malignity či autoimunitní a kardiovaskulární onemocnění (Ghosh *et al.*, 2010; Barteneva *et al.*, 2013).



Obr. 4 Schematické znázornění obsahu mikroparticulí využívajících pro mezibuněčnou komunikaci. Legenda: (IL-1 β) – interleukin-1 β ; CCR5 – C-C chemokinový receptor typu 5; CXCR4 – C-X-C chemokinový receptor typu 4; (GPIIb/GPIIIa) – glykoproteinový receptor IIb/IIIa; AnxA1 – Annexin A1; Shh – morfogen Sonic hedgehog; PAF – faktor aktivující krevní destičky; PAF-AH – PAF acetylhydrolasa; 12-LOX – 12-lipoxygenasa. (Upraveno podle Norling *et Dalli*, 2013)

2.2.2.1 Transport lipidů

Předmětem výzkumu transportu lipidů prostřednictvím MP se stávají zejména polynenasycené mastné kyseliny a kyselina arachidonová (Ak). Přenos Ak pomocí MP byl prokázán z krevních destiček do sousedních endotheliálních buněk. Tento proces způsobí expresi enzymu cyklooxygenasa-2 (COX-2; COX-1 zůstává inaktivní; EC 1.14.99.1), která následně metabolizuje Ak na prostaglandiny a tromboxan (Barry *et al.*, 1997). Přenos Ak se zdá být důležitý také v případě onemocnění revmatoidní artritidou. Při zkoumání vlivu MP na fibroblastoidní synoviální buňky byla zjištěna silná exprese COX-2, mikrosomální prostaglandin E synthasy 1 (EC 5.3.99.3) a prostaglandinu E₂ (PGE₂) za opětovné inaktivity COX-1. Pomocí izotopového značení (³H Ak) byl zjištěn přenos Ak z leukocytů do fibroblastů prostřednictvím MP, kde

posléze došlo k metabolizaci Ak na PGE₂. Případný přenos PGE₂ mikropartikulemi nebyl prokázán (Jünger *et al.*, 2007).

MP jsou také schopny přenášet bioaktivní lipidy. PAF (platelet-activating factor neboli faktor aktivující krevní destičky) je biologicky aktivní cholin fosfoglycerid moderující primárně aktivaci krevních destiček, ale také polymorfonukleárních leukocytů (PMN), monocytů a makrofágů. Funguje dále jako zprostředkovatel patologické reakce zejména u zánětů a alergií (Prescott *et al.*, 1990). Endotoxinová stimulace lipopolysacharidy a triacyl-cystein-modifikovanými proteiny gramnegativních i pozitivních mikroorganismů způsobuje u PMN syntézu PAF jako odezvu proti patogenu. Syntetizovaný PAF je následně uvolněn prostřednictvím MP. Při inhibici enzymu calpainu během formování MP nedochází k uvolnění PAF z leukocytů, což indikuje, že tento proces je nutný pro PAF transcelulární aktivitu (Watanabe *et al.*, 2003).

2.2.2.2 Transport proteinů

MP jsou schopny přenášet řadu funkčních proteinů s různými regulačními funkcemi. Mezi takto transportované proteiny patří cytokiny, receptory, adhezní molekuly, regulační proteiny, enzymy a další molekuly. (Norling *et Dalli*, 2013).

Cytokiny jsou klíčové mediátory regulace zánětlivé odpovědi. Jedním z důležitých prozánětlivých cytokinů je interleukin-1 β (IL-1 β). Hladina tohoto cytokinu roste v reakci na bakteriální infekci a lipopolysacharidovou stimulaci. IL-1 β je syntetizován jako velký prekurzorový protein, který musí být sestřižen na aktivní cytokin. Sestřih je řízen aktivovaným inflamasomem skládajícím se z kaspasy 1 (EC 3.4.22.36), apoptosis associated speck-like protein containing a CARD (ASC) a leucine rich repeat containing protein – NLRP3 (Schroder *et Tschopp*, 2010). Při analýze MP vzniklých z monocytů, indukovaných lipopolysacharidy, dochází k aktivaci endoteliálních buněk (HUVEC). Nejenže byl v izolovaných MP detekován IL-1 β , ale i komponenty z inflamazomu nutné k jeho sestřihu (ASC, NLRP3 a kaspasa 1). Tato skutečnost naznačuje, že MP jsou schopny zesílit prozánětlivé reakce aktivací endoteliálních buněk (Wang *et al.*, 2011).

MP jsou schopny přenášet i funkční enzymy. U MP z krevních destiček byl prokázán přenos enzymu 12-lipoxygenasa (EC 1.13.11.31), který se účastní biosyntézy lipoxinu A₄, což je významný protizánětlivý mediátor (Tang *et al.*, 2010). Žírné buňky,

jež obsahují velké množství prekurzoru leukotrienu A_4 (Murakami *et al.*, 1995), byly inkubovány s PDMP, což v konečném důsledku zvýšilo biosyntézu lipoxinu A_4 . Zároveň byl během tohoto přenosu prokázán protizánětlivý efekt produktu. To, zda jsou schopny přenášet enzym 12-lipoxygenasu MP i z jiných buněčných linií, bylo prokazováno na MP z leukocytů. Přenos a ani samotný enzym se nepodařilo detekovat (Tang *et al.*, 2010).

Poté co byl v PDMP zjištěn biolipid PAF, byl detekován také enzym PAF acetylhydrolasa (PAF-AH; EC 3.1.1.47), který moderuje aktivitu Ca^{2+} independentní fosfolipasy A_2 (EC 3.1.1.4). Ta degraduje PAF na inaktivní metabolit lyso-PAF a hydrolyzuje oxidované fosfolipidy (Tselepis *et* Champman, 2002; Mitsios *et al.*, 2006). Tyto PAF-AH PDMP byly nalezeny ve vyšším počtu u pacientů podstupujících koronární angioplastiku, což naznačuje, že hrají roli při juxtakrinní signalizaci u kardiovaskulárních onemocnění (Mitsios *et al.*, 2006).

MP jsou rovněž schopny přenášet receptory, které jsou původem z mateřské buňky a přenáší se na MP během jejich formování. PDMP jsou schopny přenášet glykoproteinový receptor IIb/IIIa (GPIIb/GPIIIa) do plazmatické membrány neutrofilů, které se účastní neinfekčních zánětlivých procesů. Přenesený receptor společně s $\beta 2$ -integriny aktivuje nukleární faktor κB (NF- κB), jehož aktivita je u neutrofilů důležitá pro jejich přežití a tvorbu dalších mediátorů zánětu (Choi *et al.*, 2003; Salanova *et al.*, 2007). Přenos receptorů byl prokázán i u patologických stavů. C-C chemokinový receptor typu 5 (CCR5), koreceptor pro přenos makrofágového tropismu viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV)-1, je schopen se přenášet pomocí MP z CCR5⁺ mononukleárních buněk periferní krve na CCR5⁻ endoteliální buňky (32 pb delece zvyšuje rezistenci buňky vůči viru), a umožňuje tak pravděpodobně infekci deficientních CCR5⁻ buněk (Mack *et al.*, 2000). Stejný princip se uplatňuje při přenosu C-X-C chemokinového receptoru typu 4 (CXCR4) z PDMP a MP uvolněných z megakaryocytů na buňky, které tento receptor postrádají. CXCR4 receptor funguje stejně jako koreceptor CCR5, tentokrát však pro přenos T-tropismu HIV a umožňuje tak infekci původně imunních buněk (Rozmyslowicz *et al.*, 2003).

Přenos bioaktivních proteinů může ovlivňovat další signální dráhy v lidském organismu. Například morfogen Sonic hedgedog (Shh) je důležitý zejména pro normální růst. Kromě jeho role při embryotickém vývoji se v dospělém organismu Shh signální dráha účastní buněčné diferenciaci, proliferace a angiogeneze (Bailey *et al.*, 2007). Schopnost akumulovat a přenášet Shh protein byla prokázána

u T-lymfocytárních MP. Shh pozitivní MP jsou schopny spustit diferenciaci lidských K562 pluripotentních erytroleukemických buněk směrem k megakaryotické linii (Martínez *et al.*, 2006). V případě inkubace ShhMP s endoteliálními buňkami došlo ke zvýšení jejich adheze a expresi mRNA proangiogenních faktorů jako je hepatocytový růstový faktor, IL-1 β , metaloproteinasa 1 (EC 3.4.24.7) nebo vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGF A). Všechny zmíněné proangiogenní faktory se přitom účastní tvorby nových cév u nádorem indukované angiogeneze (Soleti *et al.*, 2009).

Kromě cytokinů mohou být zánětlivé reakce vyvolávány i proteiny. Například přenos protizánětlivého 37 kDa proteinu annexin 1 (AnxA1) byl prokázán u MP původem z polymorfonukleárních leukocytů (PMN; lze také uvádět jako granulocyty). PMN-MP s AnxA1 byly detekovány při adhesi granulocytů na monovrstvu buněk HUVEC. Ovšem při intravenózním podání PMN-MP došlo ke snížení samotného náboru (recruitment) a adheze PMN. Výsledky tak ukazují na pro- i protizánětlivé účinky PMN-MP v místě zánětu (Dalli *et al.*, 2008).

2.2.2.3 Transport microRNA

MiRNAs jsou skupina malých 22 pb nekódujících RNA, které se vážou na messenger RNA (mRNA); působí jako endogenní post-translační regulátory genové exprese (Cai *et al.*, 2004). Interakce miRNA s mRNA je velmi komplexní a není dosud přesně pochopena. Přesto bylo popsáno více jak 1000 rozdílných lidských miRNA. Rovněž se udává, že přibližně 1/3 genů kódující lidské proteiny je regulována právě miRNA (Lewis *et al.*, 2005). Vzhledem k tomu, že v krevním séru jsou zastoupeny RNasy, které urychleně degradují RNA, bylo dalším předmětem zkoumání, jakým způsobem jsou miRNA chráněny před degradací (Diehl *et al.*, 2012).

Porovnáním různých miRNA v periferní krvi bez nebo s PDMP u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (ICHS) metodou real-time PCR byl prokázán predominantní výskyt miRNA v MP (Diehl *et al.*, 2012).

Srovnáváním obsahu miRNA metodou nové generace sekvenování (NGS) u stimulovaných a nestimulovaných THP-1 (monocyty) a HUVEC buněk, a za stejných podmínek i jejich uvolněných MP, pak byly získány další důležité informace. Z porovnávaných profilů miRNA vyplynul rozdíl v obsahu rozdílných miRNA mezi MP a buňkami, ze kterých vznikly (podobně jako tomu bylo u proteinů). Odlišnosti v obsahu rozdílných miRNA nalezneme také v MP uvolněných z buněk stimulovaných

i nestimulovaných. Získané poznatky naznačují existenci specifického transportního mechanismu jednotlivých miRNAs z mateřské buňky do MP (Diehl *et al.*, 2012).

Rozdíl v obsahu i množství miRNA je viditelný také u PDMP izolovaných z pacientů s odlišnou diagnózou (pozorováno na pacientech se stabilní a akutní ICHS). Rovněž byly v MP zjištěny specifické miRNA, které jsou spojeny s různými kardiovaskulárními onemocněními, MP miRNA se tak jeví jako potenciální biomarkery [např. miRNA-133 v MP z krevních destiček – infarkt myokardu (Villar *et al.*, 2011)] (Diehl *et al.*, 2012).

Za fyziologického stavu se v MP z periferní krve (zejména PDMP) vyskytují různé miRNA (miRNA-223, miRNA-484, miRNA-191, miRNA-016, miRNA-024 a další) (Hunter *et al.*, 2008). Předpokládá se, že jejich úloha je zejména v diferenciaci buněk a hematopoezi. Ze zmíněných miRNA je nejabundantnější miRNA-223 (Hunter *et al.*, 2008), která hraje úlohu v proliferaci myeloidního progenitoru, v diferenciaci a aktivaci granulocytů (Johnnidis *et al.*, 2008) a osteoklastů (Sugatani *et Hruska*, 2007).

Přenos genetického materiálu pomocí MP může vést k významné modulaci chování recipientní buňky. Deregibus *et al.* (2007) prokázal, že MP z endoteliálních progenitorových buněk mohou modulovat chování zralých klidových endoteliálních buněk pomocí horizontálního transferu miRNA, přičemž došlo k jejich re-programování na angiogenní fenotyp. Absorpce a začlenění MP závisela na expresi α_4 a β_1 integrinů na povrchu MP, zatímco jejich funkce byla potlačena inkubací MP s RNAsami.

2.3 Chronická lymfatická leukemie

Chronická lymfatická leukemie (CLL) je nejčastější forma leukemie v západním světě. CLL je charakterizována klonální proliferací a akumulací neoplastických B-lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a slezině. Onemocnění je diagnostikováno zejména u starších pacientů kolem 65 let života. Ovšem existují i případy pacientů s diagnózou CLL pod 55 let. Z hlediska pohlaví je četnost onemocnění u mužů a žen v poměru 2 : 1. Průběh onemocnění může být velmi variabilní. Zatímco někteří pacienti vedou relativně normální život až do výrazné progresy onemocnění, jiní umírají v rozmezí 1 až 5 let od stanovení diagnózy (Rozman *et al.*, 1995, Parikh *et al.*, 2013). Celosvětová incidence je v rozmezí 1 až 5.5 případů na 100 000 obyvatel. Do roku 2004 se za země s nejvyšším výskytem onemocnění CLL považovaly Austrálie, USA, Irsko a Itálie (Redaelli *et al.*, 2004).

V současnosti se ke stanovení prognózy a klinického stádia onemocnění používají dvě klasifikace – stanovení dle Bineta (Binet *et al.*, 1981) a stanovení dle Raie (Rai *et al.*, 1975). Zatímco klasifikace dle Raie (Tab. 2) rozděluje pacienty podle úrovně lymfocytózy (lymfocytóza zároveň nesmí být spojena s jiným jevem např. infekcí),

Tab. 2 Klasifikace dle Raie (Upraveno podle Hallek *et al.*, 2008)

Modifikovaný Rai	Tradiční Rai	Klinické stádium
Nízké riziko (LR)	0	Lymfocytóza v krvi nebo kostní dřeni; lymfoidní buňky pod 30 %
Střední riziko (IR)	I a II	Lymfocytóza; zvětšené uzliny; splenomegalie a/nebo hepatomegalie
Vysoké riziko (HR)	III	Anémie (hemoglobin pod 110 g/l),
	IV	Trombocytopenie (krevní destičky pod $100 \times 10^9/l$)

klasifikace dle Bineta (Tab. 3) se provádí podle počtu postižených oblastí lymfatické tkáňové skupiny (lymfatické uzliny krku, třísel a v podpaží; játra a slezina) a výskytu anémie a trombocytopenie u pacienta (Rai *et al.*, 1975; Binet *et al.*, 1981).

Až u 95 % pacientů je u maligních B-lymfocytů zjištěna zvýšená exprese antiapoptotického proteinu B cell lymphoma-2 (Bcl-2) ve srovnání s normálními lymfocyty. Tato nadexprese je jen velmi zřídka způsobena translokací t(14,18), typičtější pro non-Hodgkingské lymfomy. Spíše se může jednat o demetylaci na alelách genu Bcl-2 nacházejícím se na chromozomu 18 v kombinaci s dalšími mechanismy regulující Bcl-2 expresi (Hanada *et al.*, 1993).

Tab. 3 Klasifikace dle Bineta (Upraveno podle Hallek *et al.*, 2008)

Stupeň	Klinické stádium
A	Hemoglobin ≥ 100 g/l; krevní destičky $\geq 100 \times 10^9/l$; postižené oblasti ≤ 2
B	Hemoglobin ≥ 100 g/l; krevní destičky $\geq 100 \times 10^9/l$; postižené oblasti ≥ 3
C	Hemoglobin ≤ 100 g/l; krevní destičky $\leq 100 \times 10^9/l$; postižené oblasti ≥ 3 ; Anémie a/nebo trombocytopenie
Postižené oblasti	Hlava a krk zahrnující Waldeyerův kruh; Axily; Třísla včetně povrchové femorální oblasti; hmatná slezina; hmatná játra

2.3.1 Diagnostika chronické lymfatické leukemie

Diagnostika tohoto onemocnění se provádí na základě návodu vytvořeného v roce 1988 a 1996 pracovní skupinou National Cancer Institute – sponsored Working Group on CLL. Na základě International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia je každoročně tento návod aktualizován (Hallek *et al.*, 2008).

Obvykle se CLL detekuje u asymptomatických pacientů z normálního krevního vyšetření periferní krve, kde je potřeba přítomnost 5×10^9 klonálních B-lymfocytů/l (5000/ μ l) po dobu minimálně 3 měsíců. Klonalita cirkulujících B-lymfocytů musí být následně potvrzena průtokovou cytometrií. Leukemické buňky identifikované z krevního nátěru jsou morfologicky malé, zralé lymfocyty s úzkým lemlem cytoplazmy a hustým (denzním) jádrem s nerozlišitelným jádérkem a částečně agregovaným chromatinem. Za další charakteristické znaky CLL jsou považovány Gumprechtovy jaderné stíny a tzv. rozmazané buňky (smudge cells) (Hallek *et al.*, 2008; Swerdlow *et al.*, 2017).

Ke specifitější detekci se následně používá screening povrchových antigenů na B-lymfocytech průtokovou cytometrií. Typický imunofenotyp CLL nese pozitivní B-lymfocytární antigeny CD19 a CD23 a vykazuje významnou koexpresi T-lymfocytárního antigenu CD5. Naopak negativní jsou antigeny FMC7, CD10 a slabá nebo žádná exprese je u antigenu CD22 (Matutes *et al.*, 1994). Slabou expresi oproti fyziologickým lymfocytům vykazují dále znaky CD20, již zmíněný CD19 (Ginaldi *et al.*, 1998), CD79b (Moreau *et al.*, 1997) a povrchové lehké a těžké řetězce imunoglobulinů IgM/IgD (Geisler *et al.*, 1991). Antigen CD200 je ve velké míře také pozitivní a lze ho použít pro odlišení CLL od onemocnění lymfomem z pláštěvých buněk, kde je exprese CD200 pouze na malé populaci CD5⁺ buněk nebo úplně chybí (Palumbo *et al.*, 2009). Stručný popis zmíněných antigenů je uveden v Tab. 4.

Na základě známého imunofenotypu CLL B-lymfocytů byl vytvořen hodnotící systém (Tab. 5), který každému znaku (CD5⁺, CD22^{+/-}, CD23⁺, FMC7⁻ a povrchové imunoglobuliny) přiřadí hodnotu 1 nebo 0 podle toho, zda se jedná o typickou nebo atypickou CLL. Výsledné skóre nabývá hodnot od 5 „typické“ pro CLL po 0 značící „atypické“ pro CLL (Matutes *et al.*, 1994). Od roku 1998 lze nahradit znak CD22 za CD79b (Moreau *et al.*, 1997), který zpřesňuje výsledné skóre. Celé hodnocení lze používat k odlišení typické CLL od ostatních B-buněčných malignit.

Tab. 4 Stručný přehled antigenů využívaných pro diagnostiku CLL průtokovou cytometrií. (Převzato a upraveno podle: Starostka *et Mikula*, 2014)

Antigen	Struktura	kDa	Funkce
CD5	Transmembránový glykoprotein	67	CD72 ligand
CD10	Integrální membránový protein	100	Neutrální endopeptidasa
CD19	Membránový glykoprotein	95	Regulace, aktivace a diferenciaci B-lymfocytu
CD20	Membránový protein	33 – 37	Regulace, aktivace a diferenciaci B-lymfocytu
CD22	Transmembránový glykoprotein, izoformy	130/140	Aktivace a diferenciaci B-lymfocytu
CD23	Transmembránový protein; asociace s MHC. II třídy	45	Nízkoafinitní receptor pro IgE
CD79b	Glykoprotein; asociace s SmIg	33 – 45	Struktura BCR komplexu
CD200	Membránový glykoprotein*	41 – 47*	Exprimován ve více buněčných liniích (B linie, v podmnožině T linie, endoteliální buňky,...)†; Interakce s CD200R (imunoglobulinový inhibitorový receptor)‡; Supresivní efekt na imunitní odpověď zprostředkovanou T linií‡
FMC7	Glykoprotein	105	Regulace, aktivace a diferenciaci B-lymfocytu

*Zdroj: Yi *et al.*, 2012;

†Zdroj: Wright *et al.*, 2001

‡Zdroj: Hoek *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2003

Tab. 5 Hodnotící systém pro určení B-CLL nabývají v celkovém součtu hodnot 0 (atypická CLL) až 5 (typická CLL). (Upraveno podle Matutes *et al.*, 1994)

Membránový marker	Body	
	1	0
Povrchové imunoglobuliny (SmIG)	Slabě pozitivní	Středně/silně pozitivní
CD5	Pozitivní	Negativní
CD23	Pozitivní	Negativní
CD22/CD79d*	Slabě pozitivní/ negativní	Středně/silně pozitivní
FMC7	Negativní	Positivní

*Od roku 1998 lze marker CD22 nahradit za CD79d pro zpřesnění výsledku (Moreau *et al.*, 1997)

2.3.2 Molekulární cytogenetika

Analýza molekulární cytogenetiky B-CLL byla v počátcích ze dvou důvodů poměrně obtížná. Za prvé B-CLL buňky velmi pomalu proliferují. To potvrzuje analýza buněčného cyklu CLL B-lymfocytů v periferní krvi, kde bylo zjištěno, že většina populace (99 %) se nachází v G^0/G^1 fázi buněčného cyklu (Andreeff *et al.*, 1980). Za druhé mitogen fytohemaglutinin používaný v 60. a 70. letech byl stimulant T-lymfocytů na úkor B-lymfocytů. Použitím B-buněčných aktivátorů lipopolysacharidů a obzvláště 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátu došlo ke zlepšení cytogenetické definice CLL (Caligaris-Cappio *et Hamblin*, 1999). V 70. letech došlo k vývoji různých barvicích technik řadících se do tzv. konvenční cytogenetiky. Mezi tyto metody barvení kondenzovaných chromozomů zejména v metafázi buněčného cyklu patří např.: nefluorescenční barvení Giemsa banding (Drets *et Shaw*, 1971; Dutrillaux *et Lejeune*, 1971; Speicher *et Carter*, 2005), fluorescenční barvení Quinacrine banding (Caspersson *et al.*, 1968) nebo Reverse banding (Dutrillaux *et Lejeune*, 1971). Reverse banding funguje na principu obráceného barvení Geimsa díky kontrolovanému zahřívání chromozomů před samotným barvením (Dutrillaux *et Lejeune*, 1971). Použití Giemsa banding a Quinacrine banding bylo významné například při objevu nejznámější translokace 9/22 Filadelfského chromozomu u onemocnění chronické myeloidní leukémie, kde se původně uvažovalo, že se jedná pouze o delecii 22q (Rowley, 1973).

Nejvýraznější přínos je připisován metodě fluorescenční in situ hybridizace (FISH), která využívá chromozomálně specifické centromerické próby pro detekci numerických chromozomových abnormalit (odchylky od normálního počtu chromozomů) v dělících se i v nedělících se (interfázových) buňkách (Que *et al.*, 1993).

Nejčastější chromozomální abnormalitou je delecce chromozomu 13q14 vyskytující se u poloviny (až 55 %) diagnostikovaných pacientů (Döhner *et al.*, 2000). V deletované oblasti CLL-MDR (minimální deletovaný úsek) o velikosti méně než 300 kb bylo identifikováno snížení exprese nebo úplná ztráta funkčnosti u miRNA genů miR15 a miR16 (Calin *et al.*, 2002). Ztráta funkčnosti klastru *DLEU2* (deleted in leukemia 2 gene)/miR-15a/16-1 urychluje proliferaci B-lymfocytů modulací exprese genů kontrolující průběh buněčného cyklu zejména v přechodech G^0/G^1 a G^1/S fáze. Jedná se o zvýšenou expresi genů pro cykliny (*CCNE1*, *CCND2*, *CCND3*) a cyklin dependentní kinasy CDK4/CDK6 (EC 2.7.11.22). V důsledku také dochází k nárůstu fosforylace retinoblastomového proteinu – Rb (Klein *et al.*, 2010). Samotný gen pro Rb, důležitý

regulátor buněčného cyklu, bývá deletován na jedné z alel v 30 % případů. Pokud však zároveň nedojde na druhé alele ke ztrátě funkčnosti proteinu, není tato delece tak významná jako u genů miRNA (Liu *et al.*, 1993).

Delece 11q je pozorována jako druhá nejčastější aberace až u 18 % procent případů (Döhner *et al.*, 2000). V úseku 11q22.3-22.1 dochází k delecí genů RDX (Radixin), FDX1 (Ferredoxin 1) a nejvýznamnějšího ATM (Ataxia telangiectasia mutated) (Döhner *et al.*, 1997). ATM je serin/treonin protein kinasa (EC 2.7.11.1), jejíž hlavní úloha spočívá v buněčné odpovědi na poškození DNA zejména u dvouvláknových zlomů (Shiloh *et Ziv*, 2013). Proto je delece 11q spojována s horší prognózou a je také charakteristická pro mladší pacienty v pokročilejším stádiu onemocnění (Döhner *et al.*, 1997).

Trisomie 12 (12^+) se vyskytuje kolem 16 % případů (Döhner *et al.*, 2000). Zvýšená exprese genů nacházejících se na chromozomu 12 byla mapována pomocí metody microarray. Touto metodou bylo nalezeno sedmáct genů nacházejících se přímo na chromozomu 12, které měly rozdílnou expresi (některé geny zobrazeny v Tab. 6) (Haslinger *et al.*, 2004). V další studii byly pomocí reverzně-transkriptasové PCR nalezeny jiné geny s vyšší expresí. Jednalo se o geny regulující buněčný cyklus exprimující CDK4, cyklin dependentní kinasový inhibitor 1B ($p27^{kip1}$) a transkripční faktor E2F. Zvýšená exprese E2F však může být také způsobena v důsledku nadexprese CDK4. Jako hlavní mechanismus patogeneze u 12^+ lze tedy považovat zvýšenou expresi určitých genů (Kienle *et al.*, 2005). Následně se Winkler *et al.* (2005) snažil nahlédnout na expresi těchto genů přímo na proteinové úrovni. Westernblottingem porovnával expresi genů (p27, CDK4, CDK2, STAT6, Smac/DIABLO a další) mezi zdravými jedinci, CLL pacienty bez 12^+ , CLL s 12^+ a maligními buněčnými liniemi (Jurkat, JVM-2, EHEB). Protein p27 byl sice nadexprimován u 12^+ , nicméně stejná úroveň exprese byla pozorována i u pacientů bez 12^+ . Protein CDK4 vykazoval u obou skupin velmi slabou expresi. V obou případech nebyla u zdravých jedinců zaznamenána žádná exprese p27 i CDK4. Z hlediska proteinové úrovně se tedy zdá, že žádný z výše zkoumaných proteinů není v důsledku exprimován právě trisomii 12. Nicméně jak autoři zároveň uvádí: zvýšená exprese genů pro CDK4 a p27 se na RNA úrovni může ve výsledku nacházet pod limitem kvantifikace imunoblottingem (Winkler *et al.*, 2005).

Tab. 6 Ukázka některých rozdílně exprimovaných genů nacházejících se na chromozomu 12 u onemocnění CLL s chromozomální abnormalitou trisomie 12⁺ (Upraveno podle Haslinger *et al.*, 2004)

Aberace	Název genu	Locus
ANAPC5, PDL-108	Anafázi zprostředkující komplex podjednotka 5	12q24
GIT2	G proteinem spojený receptor kinasový-interaktor 2	12q24.1
SNRPF	Malý nukleární ribonukleoproteinový polypeptid F	12q23
M6PR	Manosa-6-fosfátový receptor (Ca ²⁺ dependentní)	12q13
MYF6	Myogenický faktor 6 (Herculin)	12q21
SFRS9	Splicing faktor, arginin/serich-rich 9	12q24

I když se delece 17q objevuje u nízkého procenta případů (7 %), je často spojována s nejhůrší prognózou (Döhner *et al.*, 2000). Důvodem je delece v úseku 17q13, která významně omezuje funkčnost genu *TP53* (Zenz *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2009). Tzv. nádorový supresor p53 funguje jako transkripční faktor pro exprimování velkého množství proteinů, jehož hlavní úloha spočívá v dějích jako je navození apoptózy nebo regulace buněčného cyklu (Levine *et Oren*, 2009). Mezi známé proteiny exprimované aktivovaným proteinem p53 patří například cyklin dependentní kinázový inhibitor p21(El-Deiry *et al.*, 1993) nebo proapoptotický BAX (Miyashita *et Reed*, 1995). U některých pacientů dochází kromě monoalelické delece *TP53* také k bodovým mutacím tohoto genu na alele druhé. Byly nalezeny také případy, kdy došlo pouze k mutaci genu bez případné delece. Nicméně špatná prognóza je přibližně stejná pro všechny tři varianty (pouze 17q; 17q a mutace *TP53* na druhé alele; mutace *TP53* bez 17q). Při diagnostice by se tak měly sledovat kromě 17q i jednotlivé změny v oblasti genu kódující *TP53* na obou alelách (Zenz *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2009).

Nejméně častá aberace, vyskytující se do 6 %, se nachází na chromozomu 6. Jedná se o delecí úseků 6q21 a 6q27 (Stilgenbauer *et al.*, 1999; Döhner *et al.*, 2000). Z těchto dvou úseků je častější 6q21. Předmětem zkoumání je nalézt v deletovaných oblastech klíčový tumor supresorový gen, který by byl zahrnut v patogenezi onemocnění (Stilgenbauer *et al.*, 1999). Sledováním exprese genů na chromozomu 6 metodou microarray byla nalezena zvýšená exprese genů v oblasti 6q21.3. Jednalo se zejména o geny kódující členy histonové rodiny H2A a H2B (Haslinger *et al.*, 2004). Jako možnou kandidátku pro tumor supresorový gen lze brát E3 ligasu HACE1 (EC 2.3.2.26) v oblasti 6q21. Tato ligasa je downregulována u velkého počtu malignit. Zejména u onemocnění ledvin neboli Wilmsova tumoru (epigeneticky hypermetylací ostrůvků CpG – CpG-177) a dále u lymfomů, nádorů prsu a plic nebo u osteosarkomu. Možná

hlavní úloha HACE1 ligasy spočívá v regulaci buněčného cyklu při buněčném stresu redukcí proteinu cyklinu D1 (Zhang *et al.*, 2007).

2.3.3 Prognostické faktory/nástroje u CLL

Jako klasický přístup stanovení prognózy pacienta, vedle klasifikace dle Raie (1975) nebo Bineta (1981), se pro určení délky přežití pacienta používá tzv. zdvojovací čas lymfocytů (lymphocyte doubling time – LDT). Vědecký tým Montserrat *et al.* (1986) jako první porovnával LDT v závislosti na Binetově stupnici, analýze kostní dřeně, časovém období, kdy pacientovi není aplikována léčba a přežití. LDT je tedy čas, za který dojde ke zdvojnásobení počtu lymfocytů v periferní krvi od diagnostikování onemocnění. Pokud uvažujeme pouze o samotném stanovení LDT, je pacientům s hodnotou 12 a méně měsíců predikována horší prognóza oproti pacientům s více než 12 měsíci, kteří se dožívají významně déle. Porovnáním LDT s Binetovou stupnicí bylo zjištěno, že u pacientů s nižším LDT ve stadiu A nebo B dochází rychleji ke zhoršení prognózy (tedy ze stupně A na B nebo B na C). LDT se tedy dá využít jako dobrý nástroj pro predikci zhoršení prognózy daného pacienta a k včasnému zahájení léčby (Montserrat *et al.*, 1986; Molica *et al.*, 1987).

Jako další stanovení lze do klasického přístupu zahrnout sérové markery. Jedná se o sérovou tymidin kinasu – sTk (EC 2.7.1.21) (Hallek *et al.*, 1992; Matthews *et al.*, 2006), rozpustný β_2 -mikroglobulin – β_2 -m (Di Giovanni *et al.*, 1989; Molica *et al.*, 1999) a rozpustnou CD23 (Reinisch *et al.*, 1994; Molica *et al.*, 1999). Jejich zvýšené hodnoty v krevním séru mohou samostatně nebo v kombinaci mezi sebou či s dalšími klinickými faktory (např. Binetova stupnice, LDT, CD38⁺ nebo mutační stav IgV_H genu) pomoci předpovědět délku přežití pro daného pacienta. (Molica *et al.*, 1999; Matthews *et al.*, 2006). Mezi hlavní výhody prognostických sérových markerů řadíme jejich jednoduchost získávání z periferní krve a spolehlivost v určení prognózy pacienta nezávisle nebo v závislosti na ostatních faktorech. Problém je ovšem v jejich cut off hodnotách, které se mohou v různých laboratořích lišit. V ideálním případě tak musí dojít ještě k vylepšení standardizace těchto sérových markerů. Další limit spočívá v ovlivnění hladiny jednotlivých markerů v periferní krvi jinými faktory nezávislými na CLL (Cramer *et al.*, 2011). Například pro sTk dochází ke zvýšení její koncentrace v krvi vlivem virové infekce nebo deficitem vitamínu B₁₂ (Hallek *et al.*, 1992). Hladinu β_2 -m ovlivňují infekce a velmi významně glomerulární filtrace

(glomerular filtration rate). Proto lze pro přesnější analýzu $s\beta_2$ -m spojit stanovení $s\beta_2$ -m v periferní krvi se stanovením glomerulární filtrace (Delgado *et al.*, 2009).

Novější prognostické faktory již byly částečně zmíněny v předchozí kapitole 2.3.2, kde bylo stanovení spojeno s detekcí chromozomálních aberací. Podle výskytu aberací se dá predikovat délka přežití daného pacienta (v případě ne zahájení léčby). Jedná se tedy o jedny z nejdůležitějších faktorů pro předvídání přežití. Pacienti se 17q delecí mají obvykle nejhorší prognózu (medián přežití 9 měsíců). S mediánem 13 měsíců je následuje druhá tzv. horší prognóza a to delecce 11q. Trisomie 12q se udává jako střední délka přežití (medián 33 měsíců). Pacienti s normálním karyotypem mají medián 49 měsíců a nejdéší doba přežití připadá na pacienty pouze s delecí 13q (medián 92 měsíců). U pacientů s delecí 17q nebo 11q byla ve větší míře případů diagnostikována CLL již v pokročilejším stádiu onemocnění (Döhner *et al.*, 2000).

Vedle špatné prognózy u pacientů s delecí nebo mutací genů p53 (Zenz *et al.*, 2008. Rossi *et al.*, 2009) nebo ATM (Döhner *et al.*, 1997) byly zjištěny i další důležité mutace zhoršující prognózu pacienta v genech *NOTCH1* a *BIRC3* (lze uvádět také jako *cIAP2*). Mutace *NOTCH1* (kolem 15 % případů) je pravděpodobně velmi významně spojena s agresivnějším průběhem trisomie 12 (až 40 % pacientů s 12⁺). U genu *NOTCH1* dochází na posledním exonu k posunu čtecího rámce 2 bp delecí úseku označeného jako P2515f. Výsledkem této delecce je zkrácený protein (Balatti *et al.*, 2012). Jiná mutace se může objevit v nekódující sekvenci zahrnující 3' region způsobující změnu splicingu u posledního exonu vedoucí rovněž ke krácení proteinu (158 pb delecce) (Puente *et al.*, 2015). Protein *NOTCH1* hraje důležitou roli jako transkripční faktor různých genů účastnících se buněčné diferenciaci, proliferace a apoptózy. Mezi tyto geny patří například protoonkogen *c-myc* (Palomero *et al.*, 2006). Druhý gen *BIRC3* exprimuje aktivní protein, který spolu s dalšími proteiny potlačuje nekanonickou signální dráhu NF- κ B. Mutace tohoto genu způsobuje nefunkčnost RING domény proteinu vedoucí ke ztrátě E3 ligasové aktivity. Neregulovaná nekanonická dráha NF- κ B zvyšuje proliferaci i délku přežití u B-lymfocytů (Zarnegal *et al.*, 2008). Mutace *BIRC3* se vyskytuje přibližně u 4 % diagnostikovaných případů CLL. Ovšem u fludarabin-refrakterních a relabujících pacientů se výskyt pohybuje okolo 25 % (Rossi *et al.*, 2012).

Analýzou mutací *IgV_H* genu (gen pro variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu – V_H) lze pacienty rozdělit na dvě skupiny CLL s odlišným klinickým průběhem onemocnění. Skupina s nemutovaným *IgV_H* genem se od skupiny

s mutovaným IgV_H genem odlišuje atypickou morfologií, izolovanou trisomií 12 a rychlejší progresí onemocnění (medián přežití 95 měsíců oproti 293 měsícům; poměr nemutovaný/mutovaný gen se pohybuje kolem hodnoty 50 : 50). Z hlediska původu CLL z určitého stádia vývoje B-lymfocytů je nemutovaný IgV_H gen spojen s naivními B-lymfocyty, a naopak mutovaný s paměťovými lymfocyty (Damle *et al.*, 1999; Hamblin *et al.*, 1999). Cut off hodnota pro odlišení mutovaného a nemutovaného IgV_H genu byla stanovena pro nemutovaný gen jako $\geq 98\%$ homologie s genem zárodečné linie (Damle *et al.*, 1999; Kröber *et al.*, 2002), i když jiná studie naznačuje použití cut off hodnoty $\geq 97\%$ jako lepší ukazatel ve stanovení prognózy (Kröber *et al.*, 2002).

Mezi další markery, které lze sledovat, se řadí trans-membránový glykoprotein typu 2, CD38, měřený pomocí průtokové cytometrie. Vysoká exprese tohoto znaku do jisté míry koreluje s nemutovaným IgV_H genem. Proto analýza pozitivitu CD38 (cut off hodnota $30\% \leq$) byla zpočátku brána jako jednodušší metoda pro určení nemutovaného IgV_H genu pro některé klinické laboratoře (Damle *et al.*, 1999). Další studie však prokázaly, že až u 30% případů analýza exprese antigenu CD38 může selhat v určení statusu mutovaného V_H genu. Při těchto studiích byly používány cut off hodnoty pro pozitivitu CD38 7% (Kröber *et al.*, 2002), 20% a 30% (Hamblin *et al.*, 2002). Pozitivita CD38 je tedy brána jako nezávislý prognostický faktor na mutaci V_H genu i Binetově stupnici. Nicméně dohromady mohou být tyto faktory použity k selekci pacientů s nejhorší prognózou (medián přežití CD38⁺/nemutovaný IgV_H je 8 let, oproti 26 letům CD38⁻/mutovaném IgV_H) (Hamblin *et al.*, 2002).

2.3.4 Funkce CLL mikropartikulí

Jak už bylo dříve v této práci zmíněno, MP neovlivňují pouze normální biologické funkce, ale uplatňují se i v patologických stavech. V případě CLL jsou vzniklé mikropartikule/mikrovezikule uvolňovány z nádorově transformovaných B-lymfocytů. Přitom počet těchto částic v periferní krvi při progresi onemocnění neustále narůstá a stává se tak dominantním fenotypem. Bylo také prokázáno, že tyto částice jsou schopny interagovat s maligními i normálními buňkami kostní dřeně (bone marrow stroma cells – BMSC) (Ghosh *et al.*, 2010).

Při studiu signálních drah metodou western blot u BMSC bylo zjištěno, že CLL MP jsou schopny aktivovat signální dráhy pro protein kinasu B (AKT, EC 2.7.11.1). CLL MP tuto dráhu aktivují díky přenosu receptoru Axl do plazmatické membrány buněk.

Následně aktivací signální dráhy AKT/mTOR/p70S6K/HIF-1 α dojde u takto ovlivněných buněk k nadexpresi VEGF, jenž je významný při angiogenezi a je brán jako tzv. faktor přežití pro CLL buňky. Další dva proteiny byly exprimovány přes signální dráhu AKT/GSK3 β / β -katenin. Jedná se o významné regulátory buněčného cyklu c-myc a cyklin D1. Vše tedy nasvědčuje tomu, že CLL MP působí jako faktor přežití pro CLL buňky a následně se spolupodílejí na zhoršení prognózy pacienta i větší odolnosti proti v současné době používaným léčivům (Ghosh *et al.*, 2010).

CLL MP mohou také ovlivnit progresi onemocnění a rezistenci vůči léčivům vlivem svých povrchových antigenů. Antigen CD52 (cíl alemtuzumabu), a CD20 (cíl rituximabu) byly detekovány také na povrchu CLL MP (Ghosh *et al.*, 2010). V případě CD52 dokonce došlo při *in vitro* stimulaci k poklesu exprese tohoto antigenu u CLL B-lymfocytů a naopak k nárůstu přímo na CLL MP. Rozdíl exprese CD52 byl nalezen také mezi normálními a CLL B-lymfocyty (zdravé buňky exprimují na svém povrchu až 3x více CD52). Výsledky tak naznačují, že dochází ke snížení exprese CD52 v důsledku uvolňování tohoto antigenu na povrchu MP (Boysen *et al.*, 2017). Akumulace CD52 a CD20 na povrchu CLL MP může potencionálně vázat specifické monoklonální protilátky, v důsledku čehož může dojít ke snížení léčebných účinků alemtuzumabu a rituximabu (Ghosh *et al.*, 2010; Boysen *et al.*, 2017).

3 Experimentální část

3.1 Cíle práce

Hlavní náplň praktické části spočívá ve vytvoření vhodné metodiky detekce a kvantifikace mikroparticulí u chronické lymfocytární leukemie. Jelikož se jedná o extrémně malé částice, je nutno modifikovat tovární nastavení cytometru pro oddělení šumu signálu přístroje od signálu tvořeného těmito částicemi.

4 Materiály a metodika

4.1 Chemikálie a protilátky

Karboxyfluorescein diacetát – CFDA; Sigma – Aldrich s.r.o., USA

anti-Hu CD5 PerCP – Cy5.5; Klon: L17F12; Becton-Dickinson Bioscience, USA

anti-Hu CD19 PE – CyTm7; Klon: 4G7; EXBIO Praha a.s., ČR

anti-Hu CD52 Pacific BlueTm; Klon: HI186; EXBIO Praha a.s., ČR

BD FACSDivaTm CS&T IVD Beads; Becton-Dickinson Bioscience, USA

Roztok PBS s albuminem:

80,0 g NaCl, 2,0 g KCl, 36,4 g Na₂HPO₄*12H₂O, 2,4 g KH₂PO₄, do objemu 1000 ml destilované vody; K roztoku PBS přidáme 22% Bovinní sérový albumin (BSA; Sanquin Reagents B.V.; Nizozemsko) poměr 100 ml PBS ku 10 ml 22% BSA

4.2 Přístrojové a laboratorní vybavení

Vortex Mixer 230V EU; Labnet International Incorporation, USA

Pipety s rozsahem 0,1 µl až 1 ml; Eppendorf, Německo

BD FACSCantoTM II Flow Cytometer; Becton-Dickinson Bioscience, USA

4.3 Metodika

4.3.1 Krevní vzorky

Krevní vzorky byly získány z odběrů periferní krve při rutinním vyšetření ve Fakultní nemocnici Olomouc v časovém období od září 2018 do března 2019. Aby se zabránilo koagulaci, byla krev odebírána do antikoagulačních zkumavek s ethylendiamintetraacetátem tridraselným (K₃EDTA). Celkově bylo na analýzu dvoubarevných experimentů (CD5⁺/CD19⁺) měřeno 76 vzorků pacientů ve věkovém rozmezí 42 až 86 let v různém stádiu onemocnění CLL. Na trojbarevné experimenty (CD5⁺/CD19⁺/CD52⁺) bylo měřeno dalších 11 vzorků.

Pro stanovení kontrolních měření byly použity vzorky zdravých dárců krve z transfúzního oddělení Fakultní nemocnice Olomouc.

4.3.2 Příprava vzorků

Do plastové zkumavky (5 ml polystyrenová zkumavka s kulatým dnem o velikosti 12*75 mm) bylo napipetováno 50 µl nesrážlivé periferní krve pacientů s diagnózou chronické lymfatické leukemie. Následně bylo přidáno 1 µl CFDA, 5 µl protilátky anti-

Hu CD5 PerCP – Cy5.5 a 5 μ l anti-Hu CD19 PE – Cy7. Vzorek byl následně vortexován a inkubován ve tmě při laboratorní teplotě (25 °C) po dobu 30 minut. Po uplynutí doby inkubace byl vzorek naředěn 0,5 ml roztokem PBS s albuminem a analyzován na průtokovém cytometru. V případě, že byl vzorek příliš koncentrovaný, byl přidán další alikvotní podíl roztoku PBS s albuminem.

Ke vzorkům nebyl, oproti běžným metodikám, přidán lyzační roztok pro odstranění erytrocytů z důvodu navýšení kvantity signálu přijímaného analyzátozem.

4.3.3 Průtoková cytometrie

4.3.3.1 Vnitřní kontrola kvality

Z důvodu náročnosti měření MP a získání co nejpřesnějších výsledků pro následné statistické zpracování dat, podléhal průtokový cytometr BD FACSCanto™ II po celou dobu práce vnitřní kontrole kvality. Přístroj byl v pravidelných časových intervalech kalibrován pomocí mikrosfér BD FACSDiva™ CS&T IVD Beads.

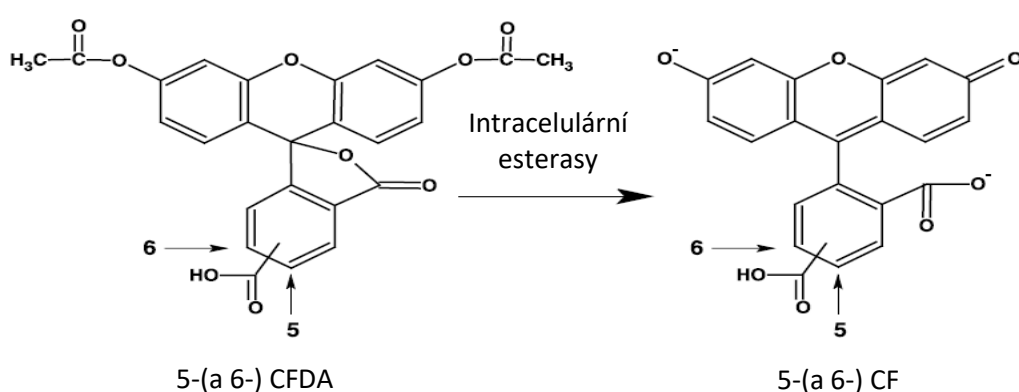
4.3.3.2 Threshold

Jak už bylo v textu zmíněno (kapitola 2.2), MP jsou heterogenní skupina sférických částic o velikosti 100 nm až 1 μ l (Théry *et al.*, 2009). Jejich velikost (zejména pod 500 nm) se nachází pod limitem rozlišení světelné mikroskopie (400–700 nm). Dalším problémem je determinace refraktivního indexu (RI) v side scatter/forward scatter (SSC/FSC) modu, jelikož obvykle používané polystyrenové nebo křemičitanové kalibrační kuličky mají rozdílný RI oproti RI heterogenní skupiny EV. (Chandler *et al.*, 2011, Gardiner *et al.*, 2014). Fluorescenční signál také nemusí být dostatečný k detekci pro menší EV (nadřazená skupina pro MP). Buněčné proteiny, které jsou exprimovány na rodičovské buňce, mohou být přítomny v méně než 100 kopiích na od nich odvozených vezikulách. Expze proteínů je tak limitována velikostí povrchu samotných EV (Nolan, 2015).

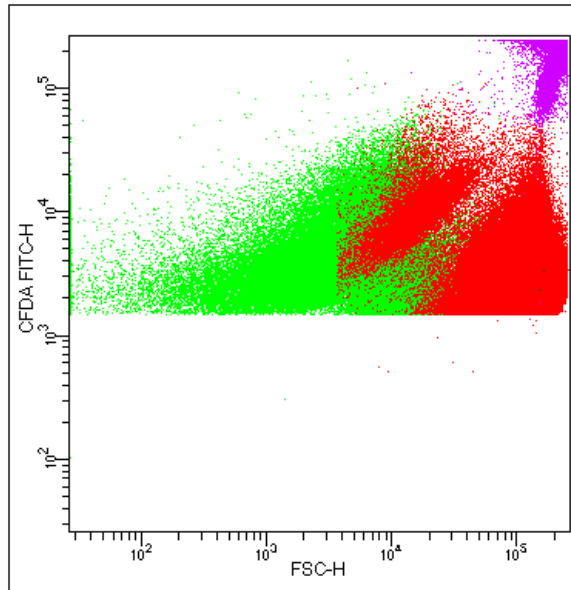
Během měření MP byl vypnutý tzv. treshold, který je za normálních okolností většinou nastaven na úroveň, která se nachází nad slabým signálem/výkonem laseru na FSC i SSC a tzv. šumem pozadí (Welsh *et al.*, 2017). Z důvodu vypnutému tresholdu nebyly vzorky lyzovány (více kapitola 4.3.2).

4.3.3.3 Detekce mikropartikulí, gatovací strategie

K označení buněk bílé krevní řady a dále nezlyzovaných buněk červené krevní řady a krevních destiček byl použit fluorescenční marker karboxyfluorescein diacetát (CFDA). CFDA prochází přes cytoplazmatickou membránu buněk, kde následně dojde k hydrolyze diacetátových skupin pomocí intracelulárních nespecifických esteraz (Obr. 5). Po odštěpení vzniká negativně nabitá molekula fluoresceinu, která je, v případě jejich nepoškozené membrány, díky svému náboji zadržována uvnitř buněk (Hoefel *et al.*, 2003). Vzhledem k povaze cytoplazmatické membrány MP je CFDA schopna označit i samotné MP. CFDA odlišuje MP od nesférických fragmentů cytoplazmatické membrány. Měření bylo prováděno také v FSC/CFDA(FITC) modu (Obr. 6).

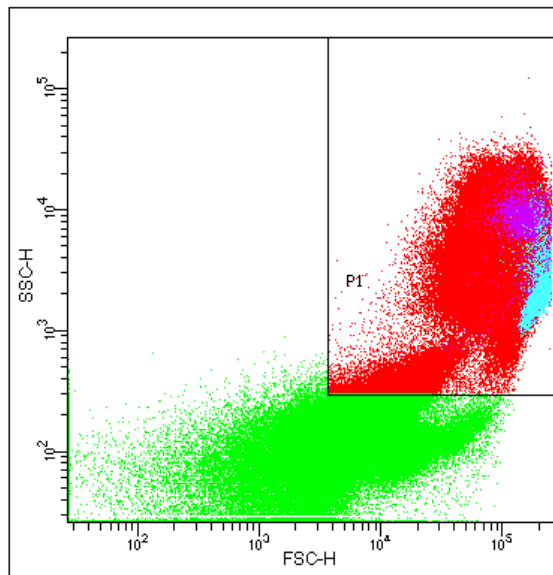


Obr. 5 Mechanismus účinku fluorescenční značky karboxyfluorescein diacetátu, která je po průchodu přes cytoplazmatickou membránu buňky štěpena intracelulárními esterazami na molekulu karboxyfluoresceinu. Účinkem esteraz dochází k hydrolyze diacetátových skupin. Vzniklá negativně nabitá molekula karboxyfluoresceinu obtížně prochází zpět přes membránu. Po ozáření laserem emituje příslušný signál. (Převzato a upraveno podle Hoefel *et al.*, 2003)



Obr. 6 Výsledek měření CFDA proti forward scatter u pacienta s nově diagnostikovaným onemocněním CLL (Binet B); Zelené a červené signály patří buňkám červené a bílé krevní řady, krevním destičkám a dalším fragmentům, nečistotám nebo nenavázaným protilátkám. Fialově označená oblast přísluší MP s pozitivním signálem na antigen CD5⁺.

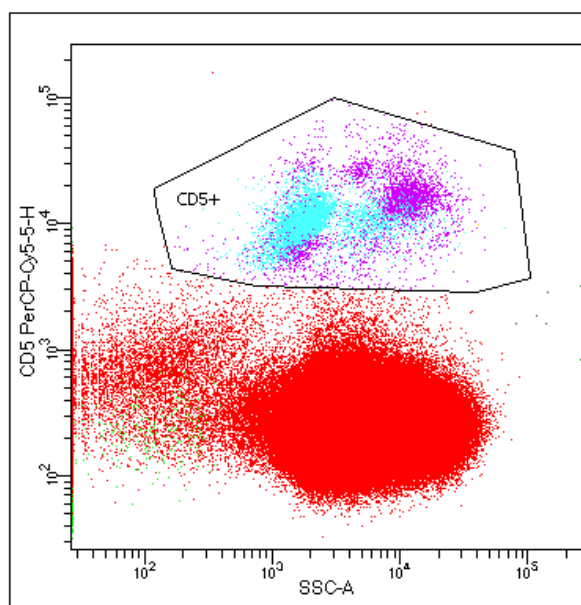
Následně byla v FSC/SSC modu, spolu v závislosti na FSC/CFDA(FITC) modu, vyselektovaná oblast pravděpodobného výskytu MP označená v našem případě jako P1 (Obr. 7).



Obr. 7 Výsledek měření MP zaznamenaný analyzátozem v side scatter vs forward scatter modu; Celková suma signálu periferní krve u pacienta s nově diagnostikovaným onemocněním CLL (Binet B); P1 je vyselektovaná oblast předpokládaného vyskytu CLL MP; Modré a fialové signály přísluší pozitivě znaku CD5

Z oblasti P1 byly zaznamenávány veškeré signály. Jako pozitivní populace CLL MP byla sledována dvojitá pozitivita antigenů CD5⁺/CD19⁺. Pro statistické zpracování výsledků měřené populace CLL MP byl nastaven gate pro 10 000 signálů pozitivních na antigen CD5 (Obr. 8). Stejný gate byl použit i pro trojbarevné experimenty CD5⁺/CD19⁺/CD52⁺. Po stanovení míry positivity CD5⁺/CD19⁺ MP byla pro změření vzorků nastavena kompenzace fluorochrom – % fluorochrom (PE – Cy7 – % PerCP – Cy5.5) v rozmezí 40 až 70 % podle rozlišení dvojitě pozitivní/negativní. Relativní % zastoupení CLL MP bylo následně stanoveno z celkové sumy všech změřených signálů.

V Tab. 7 je ukázka nastavení velikosti napětí jednotlivých laserů u průtokového cytometru BD FACSCanto™ II, které bylo používáno po celou dobu měření vzorků a kontrol. Nastavené napětí se může lišit mezi přístroji od různých výrobců i přístroj od přístroje v rámci sumace tolerancí při výrobě.



Obr. 8 Ukázka gatovací strategie pro detekci CLL MP; Ve vyznačené oblasti je napočítáno 10 000 signálů, které přísluší fyziologickým i CLL MP pozitivním na antigen CD5. Měření přísluší pacientovi s nově diagnostickým onemocněním CLL ve stádiu Binet B.

Tab. 7 Ukázka nastaveného napětí na jednotlivých laserech u průtokového cytometru BD FACSCanto™ II pro prokol na měření CLL MP.

	FSC	SSC	FITC	Pacific Blue	PerCP-Cy5-5	PE-Cy7
Napětí (V)	370	205	380	450	500	680

4.3.4 Statistické zpracování výsledků

Pro porovnání vztahu mezi maligními B-lymfocyty a z nich uvolněných CLL mikropartikulí byl jako nejvhodnější zobrazení zvolen lineární vztah relativního % zastoupení maligních B-lymfocytů proti přirozenému logaritmu relativního % zastoupení CLL MP v periferní krvi pacientů. Pro výpočet korelace, zda existuje vztah mezi nádorovou náloží a populací CLL MP, byl použit Spearmanův korelační koeficient. P – hodnota byla vždy počítána pro hladinu významnosti $p < 0,05$. Veškeré statistické zpracování výsledků bylo provedeno ve statistickém programu Statistica verze 13.4.0, TIBCO software, USA.

5 Výsledky

5.1 Charakteristika měřené skupiny pacientů

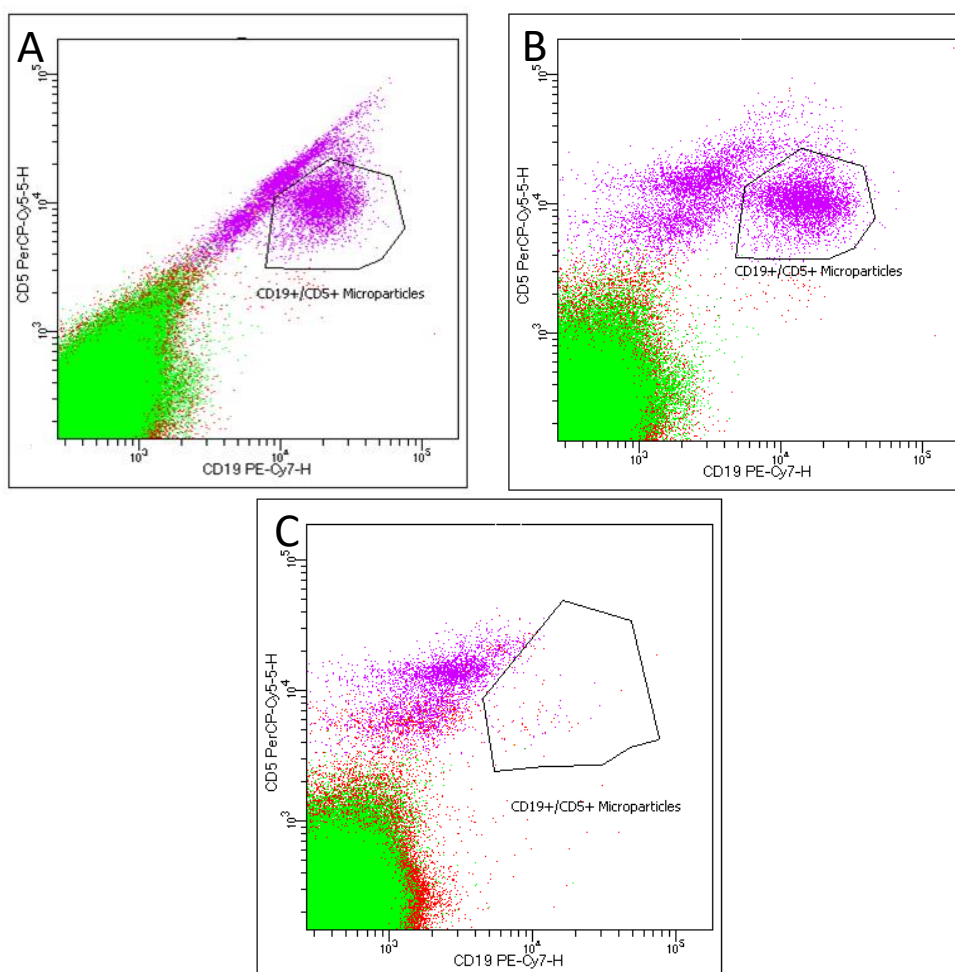
Analýza MP byla prováděna na pacientech ($n = 76$) v různých fázích onemocnění CLL. Z toho bylo 45 mužů a 31 žen (poměr M/Ž = 1,45/1). Pacienty lze rozdělit do několika skupin, a to na pacienty s novou diagnózou ($n = 10$), aktivním onemocněním před nebo v první linii používaných terapeutik ($n = 26$) i neaktivním onemocněním ($n = 6$) ve stádiu sledování progresu s případnou nutností zahájení aktivní léčby, dále v remisi ($n = 7$) nebo v opětovném relapsu onemocnění ($n = 24$). U tří pacientů nebylo možné zjistit aktuální stav onemocnění ani případná aplikovaná léčiva.

Z této množiny neprobíhala u 38 pacientů během analýzy vzorků léčba. Druhá skupina pacientů ($n = 35$) byla v době analýzy MP léčena různými chemo- a imonuterapeutiky. Největší zastoupení v této skupině mělo léčivo Ibrutinib ($n = 21$), což je inhibitor B-buněčné receptorové signalizace (B-buněčný receptor = BCR) působící prostřednictvím inhibice Bruton tyrosin kinasy (EC 2.7.10.2) (Honigberg *et al.*, 2010.), používá se zejména u pacientů s relabujícím onemocněním. Druhou častěji používanou variantou byla kombinace léčiv Rituximab-idelalisib ($n = 8$), kde Idelalisib funguje jako inhibitor δ izoformy fosfatidylinositol-3 kinasi (PI3K; EC 2.7.1.137), čímž způsobuje pro-apoptotickou aktivitu maligních B-lymfocytů (Wu *et al.*, 2013). Oproti tomu Rituximab má jiný mechanismus účinku: Toto léčivo působí jako anti-CD20 chimerická monoklonální protilátka, která zabíjí B-buňky různými mechanismy, jako je aktivace komplementu tzv. complement-dependent cytotoxicity (CDC), indukce apoptozy nebo po vazbě na nádorový antigen dojde k aktivaci imunitního systému tzv. antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (Johnson *et al.*, 2003).

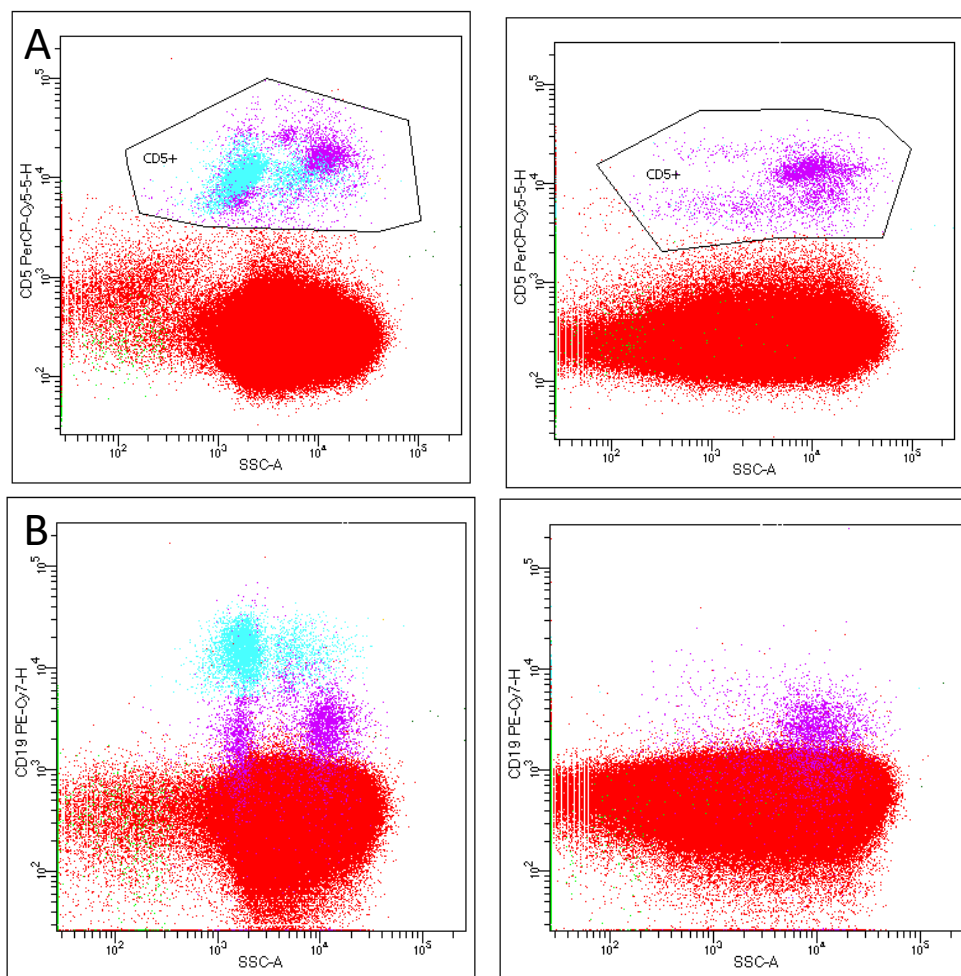
5.2 Vizualizace dvoubarevných měření CLL MP

Použitím dvoubarevného experimentu CD5⁺/CD19⁺ jsme detekovali dvojité pozitivní CLL MP (Obr. 9A). Jedná se o MP, u kterých byl detekován B-lymfocytární znak CD19 a T-lymfocytární znak CD5. Pozitivita obou znaků je pro onemocnění CLL typická. Pro lepší rozlišení výsledku došlo po analýze k následné kompenzaci (Obr. 9B) fluorescenčního přesvitu.

Výsledek měření, zda se jedná o mikropartikelu uvolňované z maligních B-lymfocytů, byl srovnáván s kontrolními vzorky zdravých dárců krve měřením znaků CD5⁺/CD19⁺ (Obr. 9C), ale také samostatně proti side scatteru (Obr. 10). V případě měření kontrolních vzorků nebyly CLL MP podle předpokladu detekovány. Jelikož za fyziologického stavu se antigen CD5 vyskytuje na T-lymfocytech a na B-lymfocytech je exprimován výhradně při maligních stavech. Ostatní zaznamenané signály u kontrolních vzorků dvojité pozitivních antigenů CD5⁺/CD19⁺ lze přičíst fluorescenčnímu přesvitu, nečistotám nebo volným nenavázaným protilátkám.



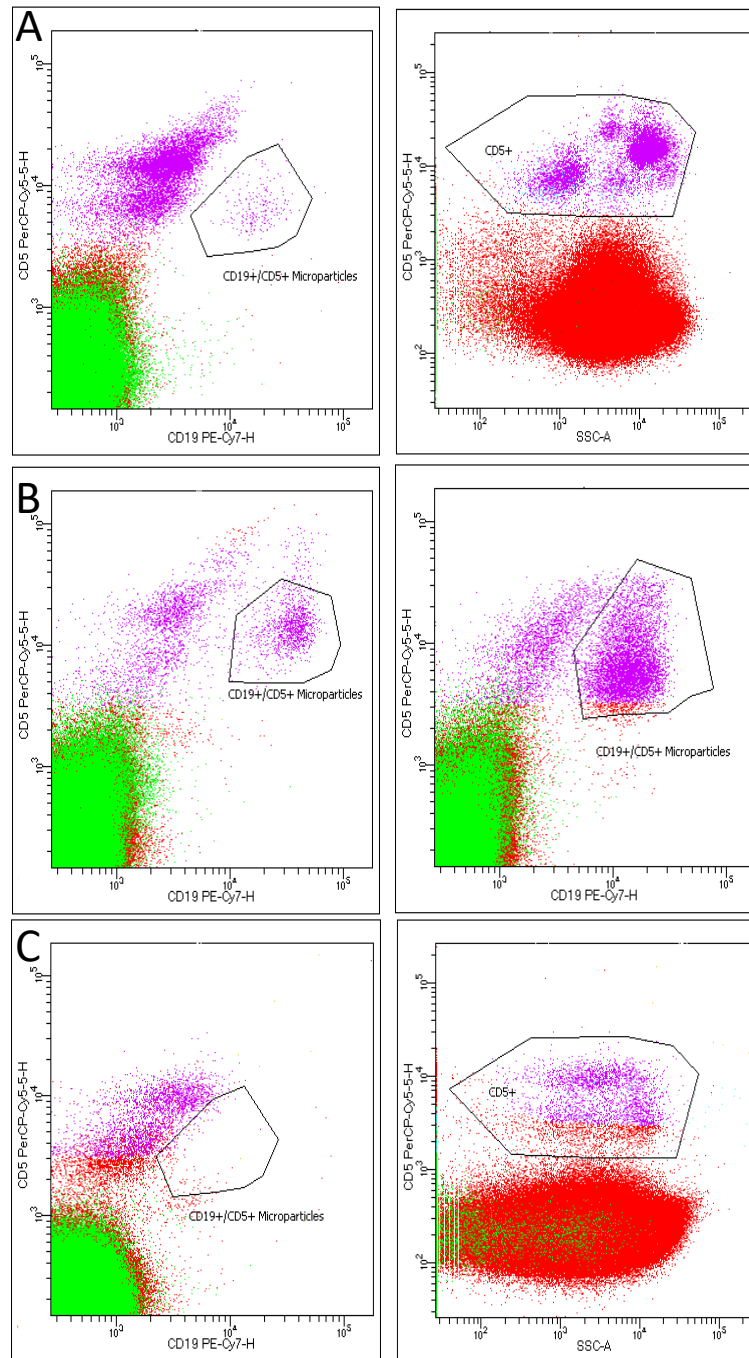
Obr. 9 A) Detekované mikropartikelu u pacienta s nově diagnostikovaným onemocněním CLL (Binet B), CLL mikropartikelu jsou dvojité pozitivní na B-lymfocytární antigen CD19 a T-lymfocytární antigen CD5. Detekované byly také MP pozitivní pouze na antigen CD5. Pro lepší rozlišení dvojité pozitivních CLL MP od případných fyziologických MP byl výsledek rozkompenzován ve formátu fluorochrom – % fluorochrom (PE – Cy7 – % PerCP – Cy5.5) v rozmezí 40–70 %; C) Kontrolní vzorek zdravého dárce krve. Pozitivně zachyceny mikropartikelu se znakem CD5 bez pozitivitu na CD19. MP pozitivní pouze na znak CD5 jsou pravděpodobně uvolňovány z T-lymfocytů.



Obr. 10 A) Porovnání výsledků měření pozitivitu antigenu CD5 u pacienta s diagnózou CLL a kontrolního vzorku zdravého jedince. Fialový signál patří pouze pozitivě antigenu CD5. Jako světle modrý signál jsou označeny CLL MP, které jsou zároveň pozitivní i na znak CD19; B) Stejné porovnání výsledků pro antigen CD19. Modře značené jsou CLL MP. Fialové signály jsou naopak pozitivní pouze antigen CD19; Červené signály patří červeným a bílým buňkám krevní řady, krevní destičkám a nečistotám.

Ve vzorcích i kontrolách byla také zaznamenána $CD5^+$ skupina MP bez pozitivitu na antigen CD19 naznačující tak, že tyto MP byly uvolněny z fyziologických T-lymfocytů.

Na Obr. 11 jsou vizualizovány CLL MP u pacientů v různém stádiu onemocnění. Demonstrují tak, v jakých případech je možné sledovat průběh onemocnění nejenom pomocí sledování počtu maligních B-lymfocytů. Populaci CLL MP lze například sledovat u pacientů ve stavu neaktivního onemocnění (Obr. 11A) nebo v průběhu léčby po relapsu onemocnění (Obr. 11B). Využití sledování populace CLL MP lze také aplikovat na sledování minimální reziduální nemoci (MRN) a získat tak informace u úspěšnosti aplikované léčby (Obr. 11C).

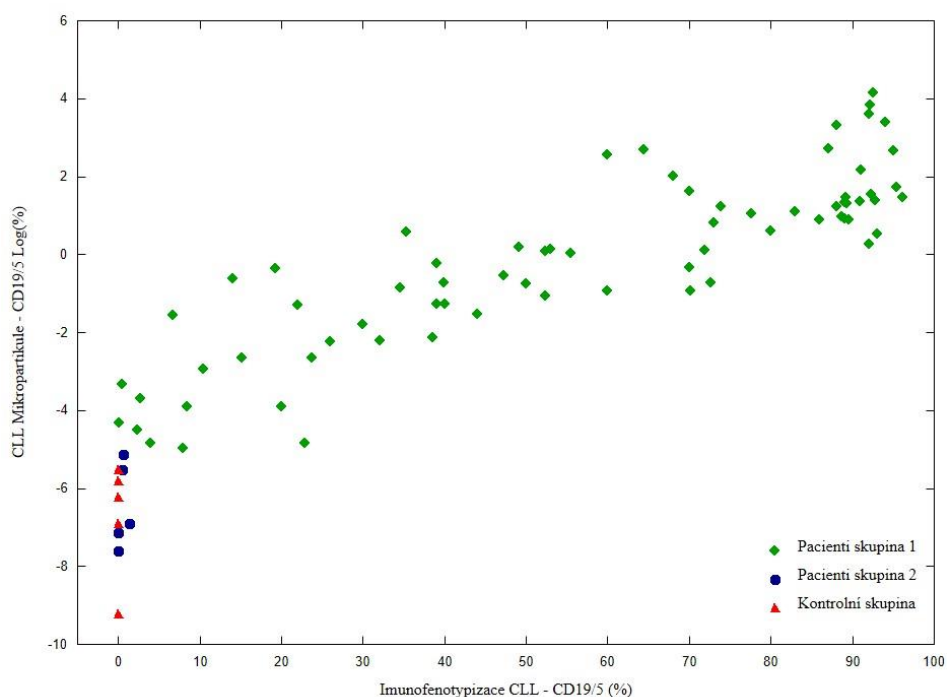


Obr. 11 Vizualizované ukázky detekovaných CLL MP v různých fázích onemocnění. A) Pacient ve stadiu sledování před nasazením první linie léčiv (Binet A) B) Pacient změřený v odstupu 30 dní u relabujícího onemocnění. C) Měření CLL MP u pacienta v remisi, analyzováno v rámci sledování minimální reziduální nemoci (MRN).

5.3 Statistická analýza naměřených dat

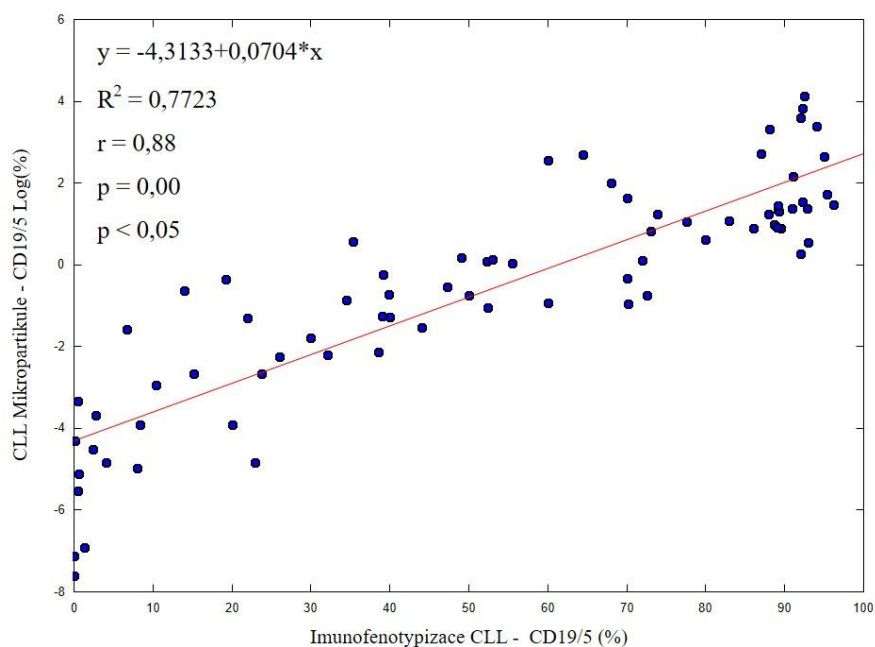
Pro statistickou analýzu byly využity data pacientů o pohlaví, % zastoupení CLL B-lymfocytů (CD19/CD5), CLL MP (CD19/CD5) v periferní krvi a nasazenou léčbou imunoterapeutiky nebo inhibitory BCR signalizace.

Výsledky % zastoupení CLL B-lymfocytů byly získány při rutinním vyšetření periferní krve. Na Obr. 12 je model lineárního vztahu CLL B-lymfocytů proti logaritmu MP, na kterém chceme ukázat v jaké části grafu se nachází kontrolní vzorky dárců krve, u kterých se předpokládá, že dvojitá pozitivita znaků CD19/CD5 bude velmi nízká až žádná. U pěti pacientů byly výsledky velmi blízké kontrolním vzorkům. V další části práce již nebude tento typ vyhodnocení kontrolní měření obsahovat.



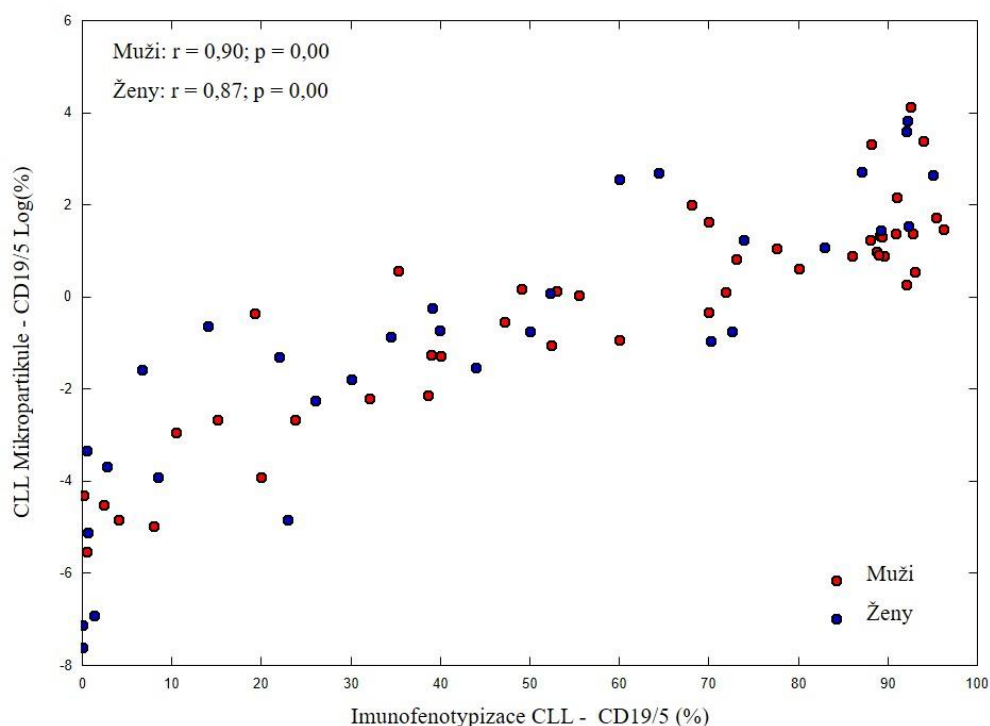
Obr. 12 Graf lineární závislosti % zastoupení CLL B-lymfocytů proti logaritmu % zastoupení CLL MP v periferní krvi. Červeně označené body přísluší kontrolním vzorkům od zdravých dárců krve (n = 10). Modře vyznačené body (n = 5) přísluší pacientům s diagnózou CLL, kteří byli v době odebrání vzorků po léčbě ve fázi MRN. Jejich výsledky % zastoupení B-lymfocytů i MP jsou tedy velmi blízké kontrolním vzorkům. Poslední skupina (zelená) přísluší pacientům v různém stádiu onemocnění CLL.

Cílem analýzy bylo stanovení vztahu mezi CLL B-lymfocyty a jimi uvolňovanými MP. Pro tyto analýzy byl zvolen model lineárního vztahu CLL B-lymfocytů proti logaritmu MP. Z výsledné analýzy (Obr. 13) jsme získali rovnici přímky [$y = -4,3133 + 0,0704 * x$ neboli $\text{Log} (\% \text{ CLL MP}) = -4,3133 + 0,0704 * (\% \text{ CLL B-lymfocyty})$]. Dále byl určen Pearsonův korelační koeficient ($r = 0,88$), který určil, že počet MP je přímo závislý na počtu B-lymfocytů. Zároveň se P hodnota rovná 0,00. Pro výpočet P-hodnot byla použita hladina významnosti $p < 0,05$.



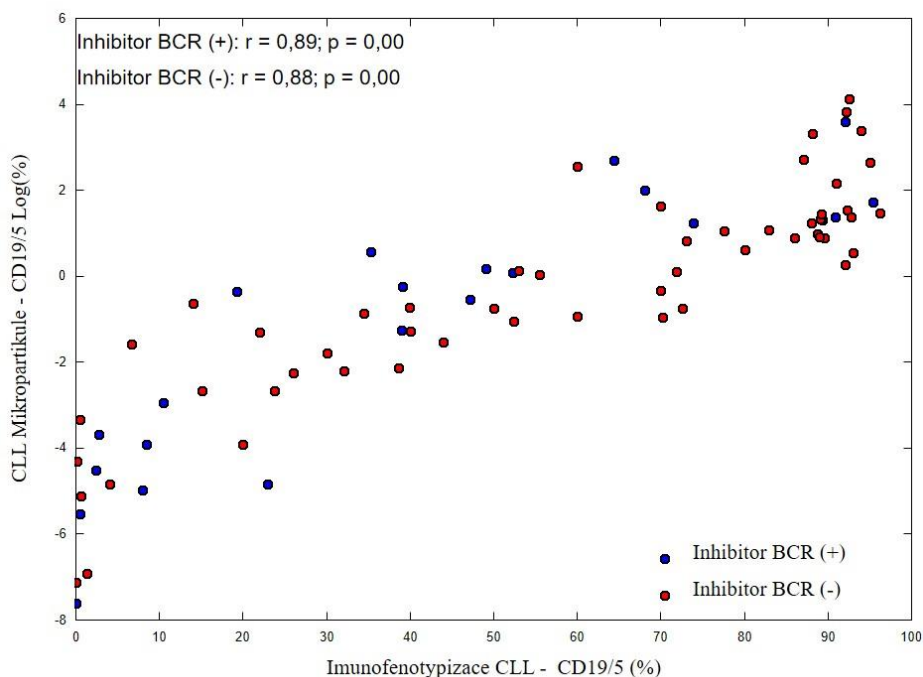
Obr. 13 Graf lineární závislosti % zastoupení CLL B-lymfocytů proti logaritmu % zastoupení CLL MP v periferní krvi. Korelační koeficient $r = 0,88$ ukazuje na přímou závislost vzniklých MP na počtu maligních B-lymfocytů. P hodnota se rovná 0,00 při hladině významnosti $p < 0,05$.

Dále jsme sledovali, jestli je námi zjištěný vztah ovlivněn pohlavím a použitím určitého typu léčiva. V analýze byl porovnáván vliv pohlaví u 45 mužů a 31 žen na vztah CLL-B-lymfocytů a CLL MP. Z Obr. 14 vyplývá, že pohlaví na náš stanovený vztah nemá příliš velký vliv.

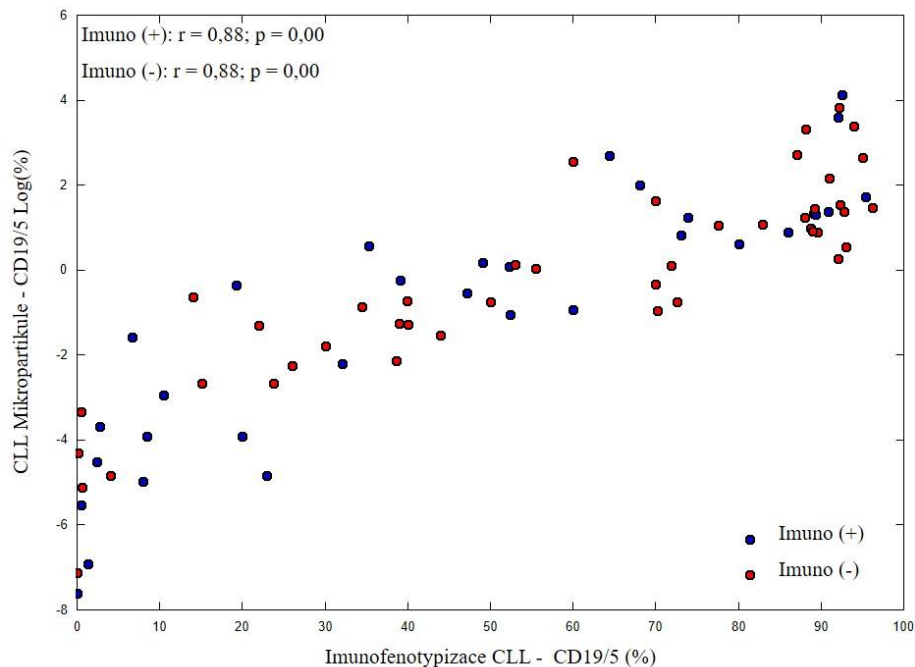


Obr 14. Graf lineární závislosti % zastoupení CLL B-lymfocytů proti logaritmu % zastoupení CLL MP v periferní krvi s ohledem na pohlaví pacientů. Z grafu vyplývá, že pohlaví nemá příliš velký vliv na tvorbu CLL MP.

To, zda i typ léčby dokáže ovlivnit náš vztah pro tvorbu CLL MP bylo dokazováno u pacientů léčených léčivou BCR signalizace ($n = 22$) a imunoterapeutiky ($n = 32$). V obou případech nebyl prokázán vliv použití léčiv inhibitorů BCR signalizace (Obr. 15) nebo imunoterapeutik (Obr. 16) na vztah tvorby CLL MP a počtu CLL B-lymfocytů. Zároveň je k tomu potřeba dodat, že u obou skupin byl zahrnut lék Ibrutinib, který byl zastoupen u skupiny inhibitorů BCR signalizace 21 z 22 vzorků a u skupiny imunoterapeutik 21 z 32 vzorků. Pro zjištění vlivu imunoterapeutik na formování CLL MP je tedy do budoucna potřeba získat více vzorků pacientů léčených jiným léčivem než Ibrutinibem.

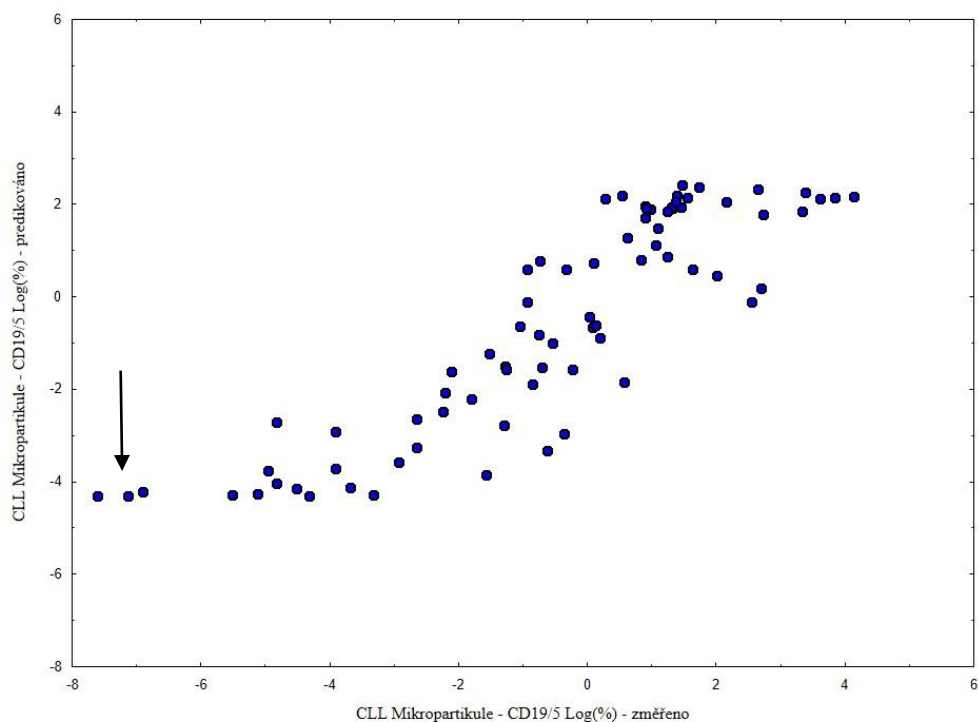


Obr. 15 Graf lineární závislosti % zastoupení CLL B-lymfocytů proti logaritmu % zastoupení CLL MP v periferní krvi při v závislosti na léčbě pomocí inhibitorů BCR signalizace. Mezi sebou je porovnáváno 22 pacientů léčených (z toho 21× léčivo Ibrutinib) a 54 pacientů nelegčených inhibitory BCR signalizace.



Obr. 16 Graf lineární závislosti % zastoupení CLL B-lymfocytů proti logaritmu % zastoupení CLL MP v periferní krvi v závislosti léčbě pomocí imunoterapeutik. 32 z 76 pacientů bylo v době analýzy léčeno pomocí imunoterapeutik. Z toho u 21 pacientů bylo použito léčivo Ibrutinib (zahrnut i do inhibitorů BCR signalizace). Pro lepší interpretaci výsledků je tak potřeba získání většího množství dat.

Ze získané rovnice přímky $\text{Log} (\% \text{ CLL MP}) = -4,3133 + 0,0704 * (\% \text{ CLL B-lymfocyty})$ (Obr. 13) jsme vytvořili predikci počtu CLL MP (Obr. 17). Tato predikce je vztažená na % obsah CLL B-lymfocytů v periferní krvi. Z rovnice přímky vyplývá, že každý 10% nárůst CLL B-lymfocytů zvýší počet vytvořených MP na dvojnásobek.



Obr. 17 Model počtu MP měřených proti predikovaným hodnotám získaných z rovnice přímky vztažených pouze na % zastoupení CLL B-lymfocytů. Šipka ukazuje skupinu výsledků pacientů, pro které predikce selhává. Jedná se o pacienty, u kterých byly odebrány vzorky periferní krve po léčbě ve fázi minimálního reziduálního onemocnění (MRN).

5.4 Trojbarevné experimenty CD5/CD19/CD52

Po analýze mikropartikulí pomocí antigenů CD5/CD19 byl následně také zkoumán výskyt antigenu CD52 na povrchu CLL MP.

Podle práce Boysen *et al.*, 2017 totiž dochází při *in vitro* stimulaci k poklesu exprese antigenu CD52 u CLL B-lymfocytů, a naopak k nárůstu přímo na CLL MP. Antigen CD52 by tak měl být lepší diagnostický marker než CD19 na povrchu mikropartikulí. V rámci dalších experimentů byla realizována trojbarevná měření CD5/CD19/CD52 s cílem prozkoumat vzájemné zastoupení antigenů na povrchu CLL MP.

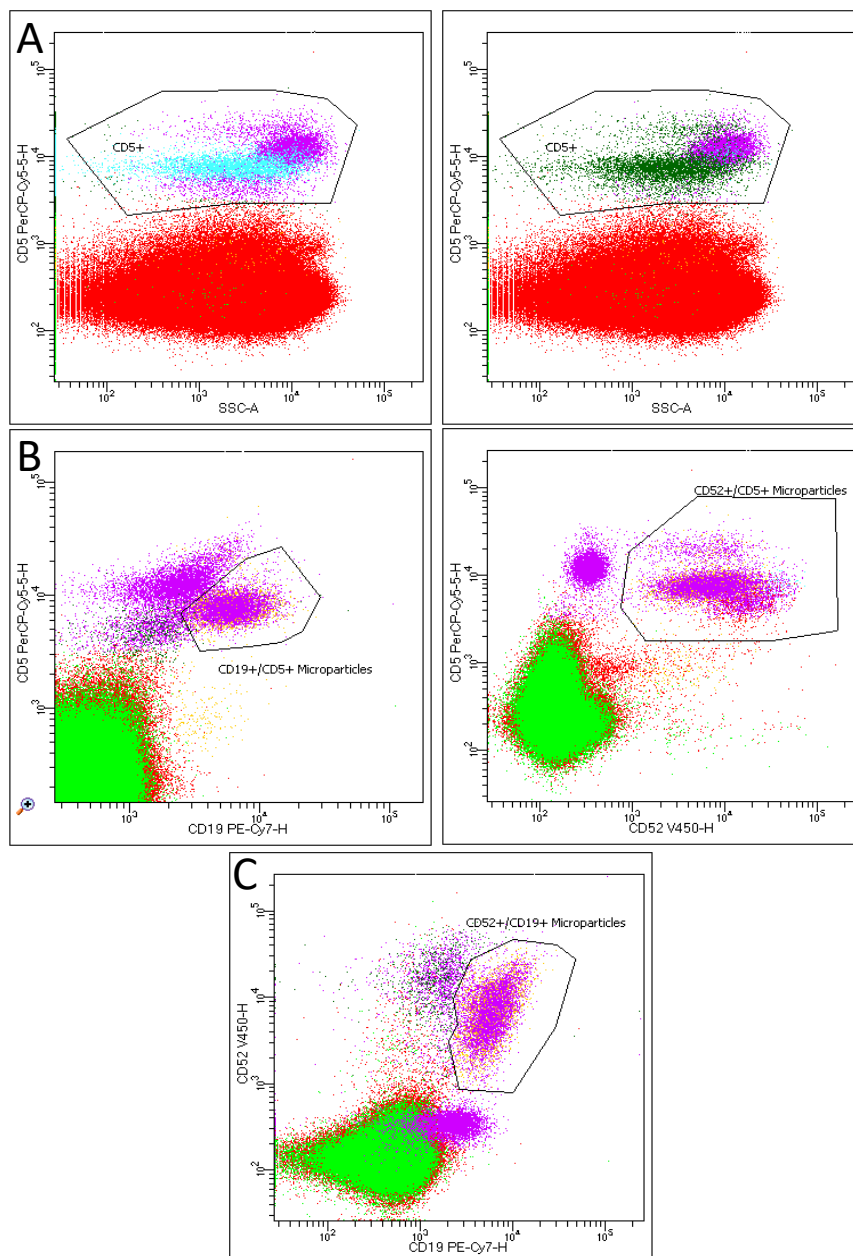
Z prvních výsledků měření (Tab. 8) lze vidět narůst počtu CLL MP v závislosti na měření relativního % zastoupení dvojitě pozitivních znaků CD5/CD19, CD5/CD52 a CD19/CD52. Z uvedených dat vyplývá, že největší zastoupení má pozitivita znaků CD52/CD5, následuje CD52/CD19 a nejmenší množství signálů je přiřazeno znakům CD19/CD5. V kontrolních vzorcích (Tab. 8) ovšem byly také detekovány pravděpodobně fyziologicky uvolněné MP nesoucí znaky CD52/CD19 a CD52/CD5. Zejména dvojitá pozitivita znaků CD52/CD5 může u zdravých jedinců dosáhnout srovnatelných hodnot jako u pacientů. Dvojitá pozitivita znaků CD19/CD5 by měla být tak jako u předchozích kontrol velmi nízká. Detekované signály jsou opět způsobeny fluorescenčním přsvitem, nečistotami nebo volnými nenavázanými protilátkami.

Stejný závěr lze demonstrovat na scattergramech pacientů (Obr. 18), kde můžeme vidět větší intenzitu signálu pro CLL MP se znaky CD52/CD5 a CD52/CD19 než pro CD19/CD5. U měření antigenu CD52 také není potřeba ve zvolené sestavě protilátek CD19/CD5 provádět kompenzaci. V tomto případě, tedy dochází k menší chybě při gatování cílové oblasti výskytu MP. U kontrolních vzorků (Obr. 19) je také ukázán výskyt signálů MP se znaky CD52/CD19 a CD52/CD5, který může být přiřazen k fyziologickým MP uvolněných z B- i T-lymfocytů.

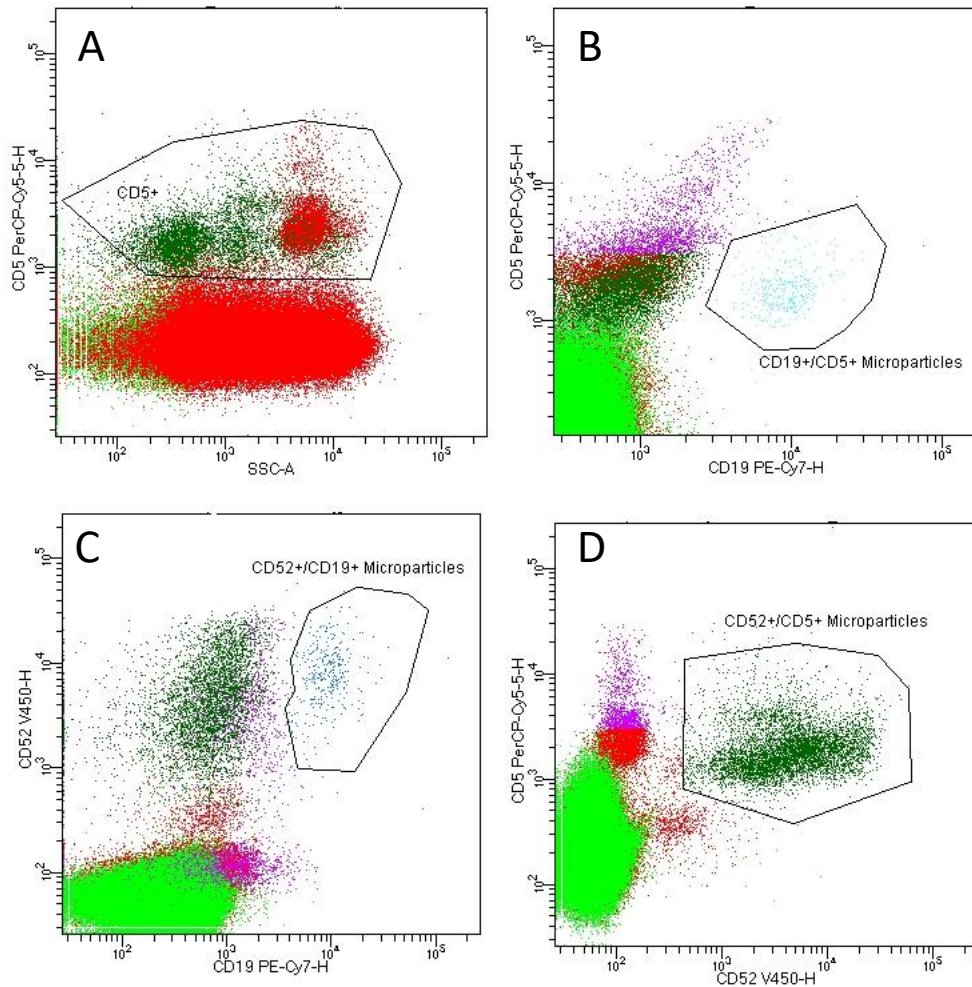
Pro ověření, zda a jakou měrou dochází k ovlivnění výsledků vlivem exprese antigenu CD52, je potřeba větší počet měření a následné statistické zpracování dat, což přesahuje rozsah této práce.

Tab. 8 Ukázka výsledků relativního zastoupení (%) MP v periferní krvi u pacientů s diagnózou CLL a u zdravých jedinců. Sledována byla dvojitá pozitivita znaků CD19/5, CD52/5 a CD52/19.

Pacient	Imunotypizace B-lymfocytů (%)	Imunotypizace CLL MP (%)		
		CD 19+/5+	CD 19+/52+	CD 52+/5+
1.	39,1	0,80	0,86	1,11
2.	34,5	0,42	0,40	0,99
3.	6,7	0,21	0,26	1,01
4.	71,9	1,11	1,31	1,48
5.	0,07	0,01	0,10	0,23
Kontrolní skupina				
1.	–	0,07	0,09	1,05
2.	–	0,05	0,08	1,13
3.	–	0,08	0,12	1,50



Obr. 18 Vizualizované výsledky trojbarevného měření CD5/CD19/CD52 u CLL MP
 A) Porovnání výsledků měření pozitivitu antigenu CD5. Modré signály jsou přiřazeny MP s pozitivitou CD19/CD5. Tmavě zelené signály patří pro MP s CD52/CD5. Z obrázku A je patrný vyšší výskyt MP s antigenem CD52. B) Vizualizace CD19/CD5 MP po kompenzaci a CD52/CD5 MP bez kompenzace. C) Vizualizace pozitivitu MP s antigenem CD52/CD19 bez kompenzace.



Obr. 19 Vizualizované výsledky trojbarevného měření CD5/CD19/CD52 u kontrolních vzorků zdravých dárců krve. A) Gatovací strategie pro pozitivitu antigenu CD5. Napočítáno 10 000 signálů. Zeleně zvýrazněný signál přísluší zároveň pozitivitě znaku CD52. B) Dvojitá pozitivita CD19/CD5. Pravděpodobně způsobena nečistotami, nenávanými protilátkami či fluorescenčním přesvitem. C) Dvojitá pozitivita znaků CD52/CD19 příslušící fyziologickým MP z B – lymfocytů. D) Dvojitá pozitivita znaků CD52/CD5. Přísluší fyziologickým MP uvolněných z T – lymfocytů.

6 Diskuze

V této práci jsme prokazovali antigeny CD19, CD5 a CD52 na povrchu CLL mikropartikulí. Expres antigenů CD19 a CD52 u CLL MP byla publikována ve více vědeckých pracích např. Ghosh *et al.*, 2010 (CD19), De Luca *et al.*, 2017 (CD19/CD52) nebo Boysen *et al.*, 2017 (CD19/CD52). Antigen CD5 byl detekován na povrchu CLL EV v práci Belov *et al.*, 2016. V žádné ze zmíněných prací nebyla pro detekce MP/EV použita CFDA.

Hlavním výstupem práce je zjištění, že se vzrůstající náloží maligních B-lymfocytů v periferní krvi pacienta stoupá také počet z nich uvolněných CLL mikropartikulí. Ghosh *et al.*, 2010 uvádí, že počet CLL MP stoupá v závislosti na Raiově škále, která se mimo jiné stanovuje podle hodnoty lymfocytózy. Spojitost mezi absolutním počtem B-lymfocytů a počtem CLL MP výše citovaní autoři nevyvrátili ani nepotvrdili. Rozdílný je také způsob analýzy: CLL MP byly dle Ghosh *et al.* napřed separovány centrifugací a následně analyzovány pomocí protilátek CD20, CD19, Anexinu V a přidáním kuliček pro kalibraci v oblasti výskytu MP.

V naší práci jsme MP detekovali přímo z nezlyzované krve pacientů pomocí barviva CFDA, které selektivně značí mikropartikule a protilátek proti antigenům CD5 a CD19 pro charakterizaci CLL MP.

Náš analytický protokol byl také navržen pro rychlou laboratorní odezvu, která se pohybuje včetně inkubace v časovém rozmezí několika desítek minut díky vynechání pracovního úkonu centrifugace, která v práci autorů Ghosh *et al.*, 2010 prodlužuje celkový čas analýzy do řádu hodin. Na druhou stranu nelze vyloučit vyšší variační koeficient výsledků z důvodu možné přítomnosti nečistot a nenavázaných protilátek, jelikož MP nebyly před analýzou separovány z periferní krve. K porovnání obou způsobů detekce CLL MP by bylo v rámci dalšího výzkumu potřeba zpracovat simultánní analýzu CLL MP oběma způsoby.

Nárůst počtu MP na Raiově škále byl také potvrzen De Luca *et al.*, 2017. MP byly opět centrifugovány a značeny pomocí Anexinu V a CD19, proběhla také vnitřní standardizace pomocí kalibračních kuliček. Autoři rovněž nenašli asociaci mezi absolutním počtem B-lymfocytů a z nich vzniklých CLL MP. Zároveň ale udávají, že úroveň MP v periferní krvi je spojená s vysokou nádorovou náloží.

U obou skupin léčiv (inhibitory BCR signalizace a imunoterapeutika) nebyl prokázán vliv na populaci CLL MP: Stejného závěru dosáhla práce autorů Boysen

et al., 2017, kde bylo zjištěno, že léčivo Ibrutinib nemá vliv na spontánní tvorbu CLL MP v *in vitro* podmínkách. Jelikož jako hlavní inhibítor BCR signalizace byl u pacientů naší kohorty aplikován právě lék Ibrutinib, který jsme zároveň v analýze zařadili také do skupiny imunoterapeutik, získané poznatky naznačují, že tento lék nemá žádný vliv na populaci CLL MP. Nicméně podle Yeh *et al.*, 2015 je léčivo Ibrutinib schopno blokováním BCR signalizace významně snížit populaci další podskupiny extracelulární vezikul, a to exosomů. Funkčnost BCR signalizace u CLL B-lymfocytů je tak pravděpodobně významnější pro sekreci exosomů než pro mikropartikule/mikrovesikule.

Podle Boysen *et al.*, 2017 je pro detekci CLL MP vhodnější povrchový antigen CD52, který se nachází ve větším množství na povrchu CLL B-lymfocytů a následně i MP, než antigen CD19. Naopak De Luca *et al.*, 2017 dosáhli při analýze opačného výsledků. Rozdíl může být způsoben zařazením heterogenní kohorty pacientů, která byla analyzována. Boysen *et al.* měl v kohortě pacientů větší množství případů s kratší dobou přežití a horší prognózou, což dokládají výsledky cytogenetických vyšetření. Albirat *et al.* už v roce 2004 ukázal, že vyšší hladiny antigenu CD52 jsou detekovány u nemocných pacientů s kratší dobou přežití a horší cytogenetickou prognózou a podporují obě verze zmíněných autorů. V této práci nebyl získán dostatečný počet výsledků pro zhodnocení využití tohoto antigenu pro analýzu. Při měření byl prokázán vyšší výskyt CLL MP s dvojitou pozitivitou antigenů CD52/CD5 nebo CD19/CD5 než pro CD19/CD5.

Problém ale může spočívat v samotném výskytu antigenu CD52. CD52, též známý jako CAMPATH-1H, což je 21 – 28 kDa velký glykopeptid připojený k membráně přes glykosilfosfatidylinositolovou kotvu. Tento glykopeptid se nachází na B-lymfocytech, ale zároveň i na T-lymfocytech (Rowan *et al.*, 1998). Tato skutečnost se ukázala v kontrolních vzorcích, kde došlo k detekci MP s fenotypem CD52/CD19 řadícím se pod fyziologicky sekretovaným MP z B-lymfocytů a fenotypem CD52/CD5 patřícím k MP z T-lymfocytů. Obě tyto skupiny tak mohou při analýze ovlivnit výsledek měření a způsobit nepřesnost.

7 Závěr

Tato práce byla zaměřena na metodiku detekce mikropartikulí a jejich využití pro diagnostiku a sledování odpovědi na léčbu u nemocných s chronickou lymfatickou leukemií.

Jedná se o uzavřené membránové struktury velmi malých rozměrů, konstitutivně vytvářené mnoha typy buněk, hrající roli ve fyziologických i patologických procesech, např. v mezibuněčné komunikaci, v regulaci hematopoézy, udržování mikroprostředí včetně mikroprostředí tumoru, v regulaci apoptózy a podobně. Jsou rovněž schopny cíleně transportovat široké spektrum proteinů a RNA k akceptorovým buňkám, čímž doplňují „klasickou“ cestu mezibuněčné komunikace, založenou na interakcích mezi ligandem a receptorem, která je zprostředkována cytokiny, chemokiny, atd. a jejich receptory.

V rámci teoretické části byla popsána nadřazená skupina mikropartikulí, a to extracelulární vezikuly. Následně jsme se věnovali popisu formování mikropartikulí z mateřské buňky a biologické a patologické funkci mikropartikulí. Teoretická část se také zabývala systematickým popisem chronické lymfatické leukemie z hlediska diagnostiky, cytogenetiky a prognostických faktorů.

V praktické části byly metodou průtokové cytometrie detekovány CLL mikropartikule. Pomocí statistické analýzy se podařilo prokázat závislost počtu mikropartikulí na velikosti nádorové nálože. Ovlivnění populace MP v periferní krvi bylo rovněž zkoumáno u terapeutik inhibitorů BCR signalizace a imunoterapie.

Byl vytvořen a úspěšně otestován nový postup analýzy nádorových mikropartikulí pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie. Oproti stávajícím postupům bylo použito značení pomocí CFDA, což umožnilo vynechat separaci předpokládaných mikropartikulí pomocí centrifugace. Ve výsledku tak došlo k významnému zkrácení laboratorní odezvy, což by v konečném důsledku mohlo zrychlit detekci mikropartikulí u hematologických malignit obecně a nejen u chronické lymfocytární leukemie. Zároveň byl také demonstrován způsob, jak lze metodu vylepšit a zpřesnit, a to použitím antigenu CD52 místo CD19. Nicméně pro tyto účely je potřeba analýza většího množství pacientů.

Mikropatikule jsou novým a doposud jen velmi málo probádaným kompartmentem tvořeným produkty různých typů buněk. Jejich významný biologický efekt, rychlý transport krevním řečištěm a specificita, se kterou lze identifikovat jejich původ,

z nich činí potenciální diagnostický cíl, navíc dosažitelný s minimální invazivitou odběrem periferní krve. Jedná se zejména o časnou detekci hematologických i solidních tumorů, sledování minimální reziduální nemoci, popř. o identifikaci tumorů, které nelze z různých důvodů biopsovat.

Od nové metodiky očekáváme mimo výše uvedeného i nový pohled do problematiky interakcí mezi nádorem a hostitelem, zvýšení kvality stávajících vyšetření směrem k vyšší sensitivitě a specifitě cestou aplikace technických vylepšení získaných při rozvoji nové metodiky a v neposlední řadě, vzhledem k aktuálnosti problematiky, hodnotný zdroj dat pro publikaci a pokračující výzkum.

Veškeré získané poznatky z této práce mohou otevřít nové možnosti v oblasti studia a diagnostiky patologických i fyziologických mikropartikulí a zpřístupnit tuto diagnostiku i pro diagnostické laboratoře v nemocničních zařízeních.

8 Literatura

- Admyre C., Grunewald J., Thyberg J., Gripenbäck S., Thornling S., Eklund A., Scheynius A., Gabrielsson S. (2003): Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *European Respiratory Journal* **22**, 578-583.
- Albirat M., Do K. A., Johnson M. M., Giles J. F., Jilani I., O'Brien S., Cortes J., Thomas D. (2004): Free circulating CD52 as a tumor marker in chronic lymphocytic leukemia and its implication in therapy with anti-CD52 antibodies. *Cancer* **101**, 999-1008.
- Amano M., Ito M., Kimura K., Fukata Y., Chihara K., Nakano T., Matsuura Y., Kaibuchi K. (1996): Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *The Journal of Biological Chemistry* **271** (34), 20246-20249.
- Andreeff M., Darzynkiewicz Z., Sharpless K. T., Clarkson D. B., Melamed R. M. (1980): Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood* **55** (2), 282-293.
- Bailey M. J., Singh K. P., Hollingsworth A. M. (2007): Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch and bone morphogenic proteins. *Journal of Cellular Biochemistry* **102**, 829-839.
- Balatti V., Bottoni A., Palamarchuk A., Alder H., Rassenti Z. L., Kipps J. T., Pekarsky Y., Croce M. C. (2012): NOTCH1 mutations associated with trisomy 12. *Blood* **119** (2), 329-331.
- Barry P. O., Praticó D., Lawson A. J., FitzGerald A. G. (1997): Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *Journal of Clinical Investigation* **99** (9), 2118-2127.
- Barteneva S. N., Fasler-Kan E., Bernimoulin M., Stern N. H. J., Ponomarev D. E., Duckett L., Vorobjev A. I. (2013): Circulating microparticles: Square the circle. *BMC Cell Biology* **14** (1), 23
- Beleznay Z., Zachowski A., Devaux F. P., Navazo P. M., Ott P. (1993): ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochemistry* **32**, 3146-3152.
- Belov L., Matic J. K., Hallal S., Giles Best O., Mulligan P. S., Christopherson I. Richard (2016): Extensive surface protein profiles of extracellular vesicles from cancer cells may provide diagnostic signatures from blood samples. *Journal of Extracellular Vesicles* **5** (1), 25355.
- Bevers M. E., Comfurius P., Dekkers C. W. D., Zwaal A. F. R. (1999): Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids* **1439**, 317-330.
- Binet L. J., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguet H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault T. M., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F. (1981): A New prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198-206.
- Bitbol M., Fellman P., Zachowski A., Devaux F. P. (1987): Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **904** (2), 268-282.
- Boysen J., Nelson M., Magzoub G., Maiti P. G., Sinha S., Goswami M., Vesely K. S., Shanafelt D. T., Kay E. N., Ghosh K. A. (2017): Dynamic of microvesicles generation in B cell chronic lymphocytic leukemia: implication in disease progression. *Leukemia* **31** (2), 350-360.
- Burger D., Schock S., Thompson S. C., Montezano C. A., Hakim M. A., Touyz M. R. (2013): Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical Science* **124**, 423-441.
- Cai X., Hagedorn C. H., Cullen B. R. (2004): Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10** (12), 1957-1966.
- Caligaris-Cappio F., Hamblin J. T. (1999): B-Cell chronic lymphocytic leukemia: A Bird of a different feather. *Journal of Clinical Oncology* **17**, 399-408.

- Calin A. G., Dumitru D. C., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce M. C. (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **99** (24), 15524-15529.
- Caspersson T., Farber S., Foley E. G., Kudynowski J., Modest J. E., Simonsson E., Wagh U., Zech L. (1968): Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research* **49** (1), 219-222.
- Chandler W. L., Yeung W., Tait F. J. (2011): A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **9**, 1216-1224.
- Chargaff E., West R. (1946): The Biological significance of the thromboplastic protein of blood. *Journal of Biological Chemistry* **166**, 189-197.
- Choi M., Rolle S., Wellner M., Cardoso C. M., Schneidereit C., Luft C. F., Kettritz R. (2003): Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* **102**, 2259-2267.
- Combes V., Simon A.-C., Grau G.-E., Arnoux D., Camoin L., Sabatier F., Mutin M., Sanmarco M., Sampol J., Dignat-George F. (1999): *In vitro* generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *The Journal of Clinical Investigation* **104** (1), 93-102.
- Cramer P., Hallek M., (2011): Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nature Reviews Clinical Oncology* **8** (1), 38-47.
- Dalli J., Norling V. L., Renshaw D., Cooper D., Leung K., Perretti M. (2008): Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* **112**, 2512-2519.
- Damle N. R., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen L. S., Buchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman M. S., Schulman P., Vinciguerra O. V., Rai R. K., Ferrarini M., Chiorazzi N. (1999): Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94** (6), 1840-1847.
- Delgado J., Pratt G., Phillips N., Briones J., Fegan C., Nomdedeu J., Pepper C., Aventin A., Ayats R., Brunet S., Martino R., Valcarcel D., Milligan D., Sierra J. (2009): Beta₂-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *British Journal of Haematology* **145** (6), 801-805.
- De Luca L., D'Arena G., Simeon V., Trino S., Laurenzana I., Caivano A., La Rocca F., Villani O., Mansueto G., Deaglio S., Innocenti I., Laurenti L., Molica S., Pietrantonio G., De Stradis A., Del Vecchio L., Musto P. (2017): Characterization and prognostic relevance of circulating microvesicles in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma* **58**, 1424-1432.
- Deregibus M. C., Cantaluppi V., Calogero R., Lo Lacono M., Tetta C., Biancone L., Bruno S., Bussolati B., Camussi G. (2007): Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* **110**, 2440-2448.
- Diehl P., Fricke A., Sander L., Stamm J., Bassler N., Htun N., Ziemann M., Helbing T., El-Osta A., Jowett M. B. J., Peter K. (2012): Microparticles: major transport vehicle for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovascular Research* **93**, 633-644.
- Di Giovanni S., Valentini G., Carducci P., Giallonardo P. (1989): Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematologica* **81** (4), 181-185.
- Distler W. H. J., Huber L. C., Hueber J. A., Reich III F. C., Gay S., Distler O., Pisetsky S. D. (2005): The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis* **10**, 731-741.
- Döhner H., Stilgenbauer S., James R. M., Benner A., Weilguni T., Bentz M., Fischer K., Hunstein W., Lichter P. (1997): 11q Deletions identify a new subset of B-cell chronic

- lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* **89** (7), 2516-2522.
- Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine* **343** (26), 1910-1916.
- Dragovic A. R., Gardiner C., Brooks S. A., Tannetta S. D., Ferguson P. J. D., Hole P., Carr B., Redman G. W. C., Harris L. A., Dobson J. P., Harrison P., Sargent L. I. (2011): Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticles tracking analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **7**, 780-788.
- Drets E. M., Shaw W. M. (1971): Specific banding patterns of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68** (9), 2073-2077.
- Dutrillaux B., Lejeune J. (1971): Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **272**, 2638-2640.
- El-Deiry S. W., Tokino T., Velculescu E. V., Levy B. D., Parsons R., Trent N. J., Lin D., Mercer E., Kinzler W. K., Vogelstein B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75** (4), 817-825.
- Fackler T. O., Grosse R. (2008): Cell motility through plasma membrane blebbing. *Journal of Cell Biology* **181** (6), 879-884.
- Fox B. E. J., Austin D. C., Boyles K. J., Steffen K. P. (1990): Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from platelet plasma membrane. *The Journal of the Cell Biology* **111**, 483-493.
- Gardiner C., Shaw M., Hole P., Smith J., Tannetta D., Redman W. C., Sargent L. I. (2014): Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* **3** (1), 25361
- Geisler H. C., Larsen J., Hansen E. N., Hansen M. M., Christensen E. B., Lund B., Nielsen H., Plesner T., Thorling K., Andersen E., Andersen K. P. (1991): Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **78** (7), 1795-1802.
- George N. J., Thoi L. L., McManus M. L., Reiman A. T. (1982): Isolation of human platelets membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* **60** (4), 834-840.
- Ghosh K. A., Secreto R. C., Knox R. T., Ding W., Mukhopadhyay D., Kay E. N. (2010): Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood* **115**, 1755-1764.
- Ginaldi L., De Martinis M., Matutes E., Farahat N., Morilla R., Catovsky D. (1998): Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of Clinical Pathology* **51**, 364-369.
- Gremm D., Wegner A. (1999): Co-operative binding of Ca²⁺ ions to the regulatory binding sites of gelsolin. *European Journal of Biochemistry* **262**, 330-334.
- Hallek M., Wanders L., Strohmeyer S., Emmerich B. (1992): Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Annals of Hematology* **65** (1), 1-5.
- Hallek M., Cheson D. B., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., Hillmen P., Keating J. M., Montserrat E., Rai R. K., Kipps J. T. (2008): Guidelines for the diagnosis and treatment on chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working group 1996 guidelines. *Blood* **11** (12), 5446-5456.
- Hamblin J. T., Davis Z., Gardiner A., Oscier G. D., Stevenson K. F. (1999): Unmutated Ig V_H genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94** (6), 1848-1854.
- Hamblin J. T., Orchard A. J., Ibbotson E. R., Davis Z., Thomas W. P., Stevenson K. F., Oscier G. D. (2002): CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* **99** (3), 1023-1029.

- Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmauer E., Reed C. J. (1993): Bcl-2 Gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **82** (6), 1820-1828.
- Hartwig H. J. (1992): Mechanism of actin rearrangements mediating platelet activation. *Journal of Cell Biology* **118** (6), 1421-1441.
- Haslinger C., Schweifer N., Stilgenbauer S., Döhner H., Lichter P., Kraut N., Stratowa C., Abseher R. (2004): Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *Journal of Clinical Oncology* **22** (19), 3937-3949.
- Hickey J. M., Williams A. S., Roth J. G. (1989): Human platelet glycoprotein IX: An Adhesive prototype of leucine-rich glycoproteins with flank-center-flank structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** (17), 6773-6777.
- Hoefel D., Grooby L. W., Monis T. P., Andrews S., Saint P. C. (2003): A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *Journal of Microbiological Methods* **52**, 379-388.
- Hoek R. M., Ruuls S. R., Murphy C. A., Wright G. J., Goddard R., Zurawski S. M., Blom B., Homola M. E., Streit W. J., Barclay A. N., Sedgwick J.D. (2000): Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX-2 (CD200). *Science* **290**, 1768-1771.
- Honigberg A. L., Smith M. A., Sirisawad M., Verner E., Loury D., Chang B., Li S., Pan Z., Thamm H. D., Miller A. R., Buggy J. J. (2010): The Bruton tyrosin kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107** (29), 13075-13080.
- Horstman L. L., Jy W., Jimenez J. J., Ahn S. Y. (2004): Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Frontiers in Bioscience* **9**, 1118-1135.
- Hugel B., Martínez C. M., Kunzelmann C., Freyssinet M. J. (2005): Membrane microparticles: Two sides of coin. *Physiology* **20** (1), 22-27.
- Hunter P. M., Ismail N., Zhang X., Aguda D. B., Lee J. E., Yu L., Xiao T., Schafer J., Lee T. M. L., Schmittgen D. T., Nana-Sinkam P. S., Jarjoura D., Marchs B. C. (2008): Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE* **3** (11), e3694.
- Jänicke U. R., Sprengart L. M., Wati R. M., Porter G. A. (1998): Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **273** (16), 9357-9360.
- Johnnidis B. J., Harris H. M., Wheeler T. R., Stehling-Sun S., Lam H. M., Kirak O., Brummelkamp R. T., Fleming D. M., Camargo D. F. (2008): Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* **451** (7182), 1125-1129.
- Johnson P., Glennie M. (2003): The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Seminars in Oncology* **30** (1 SUPPL. 2), 3-8.
- Jüngel A., Distler O., Schulze-Horsel U., Huber C. L., Ha R. H., Simmen B., Kalden R. J., Pisetsky S. D., Gay S., Distler W. H. J. (2007): Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E₂ via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1. *Arthritis and Rheumatism*. **56** (11), 3564-3574.
- Kammer M. G., Boehm A. C., Rudolph A. S., Schultz A. L. (1988): Mobility of the human T lymphocyte surface molecules CD3, CD4 and CD8: Regulation by a cAMP-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85** (3), 792-796.
- Kelton G. J., Warkentin E. T., Hayward M. P. C., Murphy G. W., Moore C. J. (1992): Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenia purpura is associated with platelet microparticles. *Blood* **80**, 2246-2251.
- Kienle L. D., Korz C., Hosch B., Benner A., Mertens D., Habermann A., Kröber A., Jüger U., Lichter P., Döhner H., Stilgenbauer S. (2005): Evidence of distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *Journal of Clinical Oncology* **23** (16), 3780-3792.
- Klein U., Lia M., Crespo M., Siegel R., Shen Q., Mo T., Ambesi-Impiombato A., Califano A., Migliazza A., Bhagat G., Dalla-Favera R. (2010): The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls

- B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* **17** (1), 28-40.
- Koopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T., van Oers M. H. (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84** (5), 1415-1420.
- Kröber A., Seiler T., Benner A., Bullinger L., Brückle E., Lichter P., Döhner H., Stilgenbauer S. (2002): VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100** (4), 1410-1416.
- Leeuwenberg M. F. J., Smeets F. E., Neefjes J. J., Shaffer A. M., Cinek T., Jeunhomme A. A. M. T., Ahern J. T., Buurman A. W. (1992): E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells *in vitro*. *Immunology* **77**, 543-549.
- Levine J. A., Oren M. (2009): The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer* **9** (10), 749-758.
- Lewis P. B., Burge B. C., Bartel P. D. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15-20.
- Lind E. S., Yin L. J. H., Stossel P. T. (1982): Human platelets contain gelsolin: A regulator of actin filament length. *Journal of Clinical Investigation* **69** (6), 1384-1387.
- Liu Y., Szekely L., Grandér D., Söderhäll S., Juliusson G., Gahrton G., Linder S., Einhorn S. (1993): Chronic lymphocytic leukemia cells with allelic deletions at 13q14 commonly have one intact RB1 gene: evidence for a role of an adjacent locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90** (18), 8697-8701.
- Mack M., Kleinschmidt A., Brühl H., Klier C., Nelson J. P., Cihak J., Plachý J., Stangassinger M., Erfle V., Schlöndorf D. (2000): Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature Medicine* **6** (7), 769-775.
- Martínez C. M., Larbret F., Zobalri F., Coulombe J., Debili N., Vainchenker W., Ruat M., Freyssinet M. J. (2006): Transfer of differentiation signal membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* **108**, 3012-3020.
- Matthews C., Cartherwood M. A., Morris T. C. M., Kettle P. J., Drake M. B., Gilmore W. S., Alexander H. D. (2006): Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *European Journal of Haematology* **77** (4), 309-317.
- Matutes E., Owusu-Ankomah K., Morilla R., Marco G. J., Houlihan A., Que H. T., Catovsky D. (1994): The Immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* **8** (10), 1640-1645.
- Mause F. S., Weber Ch. (2010): Microparticles: protagonist of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation Research* **107**, 1047-1057.
- McGough A., Chiu W., Way M. (1998): Determination of the gelsolin binding site on F-actin: Implications for severing and capping. *Biophysical Journal* **74**, 764-772.
- Mitsios V. J., Vini P. M., Stengel D., Ninio E., Tselepis D. A. (2006): Human platelets secrete the plasma type of platelet-activating factor acetylhydrolase primarily associated with microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular biology* **26** (8), 1907-1913.
- Miyashita T., Reed C. J. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80** (2), 293-299.
- Miyoshi H., Umeshita K., Sakon M., Imajoh-Ohmi S., Fujitani K., Gotoh M., Oiki E., Kambayashi J. I., Monden M. (1996): Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* **110**, 1897-1904.
- Molica S., Alberti A. (1987): Prognostic value of lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **60** (11), 2712-2716.
- Molica S., Levato D., Cascavilla N., Levato L., Musto P. (1999): Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and β_2 -microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Haematology* **62**, 117-122.

- Montserrat E., Sanchez-Bisono J., Viñolas N., Rozman C. (1986): Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of its prognostic significance. *British Journal of Haematology* **62** (3), 567-575.
- Moreau J. E., Matutes E., A'Hern P. R., Morilla M. A., Morilla M. R., Owusu-Ankomah A. K., Seon K. B., Catovsky D. (1997): Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American Journal of Clinical Pathology* **108** (4), 378-382.
- Morel O., Jesel L., Freyssinet M. J., Toti F. (2011): Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **31** (1), 15-26.
- Murakami M., Austen K. F., Arm J. P. (1995): The immediate phase of c-kit ligand stimulation of mouse bone marrow-derived mast cells elicit rapid leukotriene C4 generation through posttranslational activation of cytosolic phospholipase A2 and 5-lipoxygenase. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 197-206.
- Mutin M., Dignat-George F., Sampol J. (1997): Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens* **50** (5), 449-458.
- Nolan P. J. (2015): Flow cytometry of extracellular vesicles: Potential, pitfalls and prospects. *Current Protocols in Cytometry* **73** (1), 13.14.1-13.14.16.
- Norling V. L., Dalli J. (2013): Microparticles are novel effectors of immunity. *Current Opinion in Pharmacology* **13** (4), 570-575.
- Palomero T., Keat Lim W., Odom T. D., Luisa Sullis M., Real J. P., Margolin A., Barnes C. K., O'Neil J., Neubergh D., Weng P. A., Aster A. J., Sigaux F., Soulier J., Look T. A., Young A. R., Califano A., Ferrando A. A. (2006): NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **103** (48), 18261-18266.
- Palumbo A. G., Parrinello N., Fargione G., Cardillo K., Chiarenza A., Berretta S., Conticello C., Villari L., Di Raimondo F. (2009): CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* **33** (9), 1212-1216.
- Parikh A. S., Rabe G. K., Kay E. N., Call G. T., Ding W., Schwager M. S., Bowen A. D., Conte M., Jelinek F. D., Slager L. S., Shanafelt D. T. (2013): Chronic lymphocytic leukemia in young (≤ 55 years) patients: a comprehensive analysis of prognostic factors and outcomes. *Haematologica* **99** (1), 140-147.
- Pasquet M. J., Dachary-Prigent J., Nurden T. A. (1996): Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *European Journal of Biochemistry* **293**, 647-654.
- Peterson B. D., Sander T., Kaul S., Wakim T. B., Halligan B., Twigger S., Pritchard Jr. A. K., Oldham T. K., Ou J. S. (2008): Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics* **8** (12), 2430-2446.
- Piccin A., Murphy G. W., Smith P. O. (2007): Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews* **21** (3), 157-171.
- Prescott M. S., Zimmerman A. G., McIntyre M. T. (1990): Platelet-activating factor. *The Journal of Biological Chemistry* **265** (29), 17381-17384.
- Puente X. S., Beá S., Valdés-Mas R., Villamor N., Gutiérrez-Abril J., Martín-Subero J., Munar M., Rubio-Pérez C., Jares P., Aymerich M., Baumann T., Beekman R., Belver L., Carrio A., Castellano G., Clot G., Colado E., Colomer D., Costa D., Delgado J., Enjuanes A., Estivill X., Ferrando A. A., Gelpí L. J., Gonzáles B., Gonzáles S., Gonzáles M., Gut M., Hernández-Rivas M. J., López-Guerra M., Martín-García D., Navarro A., Nicolás P., Orozco M., Payer R. Á., Pinyol M., Pisano G. D., Puente A. D., Queirós C. A., Quesada V., Romeo-Casabona M. C., Royo C., Royo R., Rozman M., Russiñol N., Salaverría I., Stamatopoulos K., Stunnenberg G. H., Tamborero D., Terol J. M., Valencia A., López-Bigas N., Torrents D., Gut I., López-Gillermo A., López-Otín C., Campo E. (2015): Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **526** (7574), 519-524.

- Que H. T., Marco G. J., Ellis J., Matutes E., Babapulle B. V., Boyle S., Catovsky D. (1993): Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* **82** (2), 571-575.
- Rai R. K., Sawitsky A., Cronkite P. E., Chanana D. A., Levy N. R., Pasternack S. B. (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46** (2), 219-234.
- Raposo G., Stoorvogel W. (2013): Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles and friend. *The Journal of Cell Biology* **200** (4), 373-383.
- Redaelli A., Laskin B. L., Stephens J. M., Botteman M. F., Pashos C. L. (2004): The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *European Journal of Cancer Care* **13** (3), 279-287.
- Reinisch W., Willheim M., Hilgarth M., Gasché C., Mader R., Szepfalusi S., Steger G., Berger R., Lechner K., Boltz-Nitulescu G., Schwarzmeier J. D. (1994): Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **12** (10), 2146-2152.
- Rossi D., Cerri M., Deambrogi C., Sozzi E., Cresta S., Rasi S., De Paoli L., Spina V., Gattei V., Capello D., Forconi F., Lauria F., Gaidano G. (2009): The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: Implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clinical Cancer Research* **15** (3), 995-1004.
- Rossi D., Fangazio M., Rasi S., Vaisitti T., Monti S., Cresta S., Chiaretti S., Del Giudice I., Fabbri G., Brusca G., Spina V., Deambrogi C., Marinelli M., Fama R., Greco M., Diniele G., Forconi F., Gattei V., Bertoni F., Deaglio S., Pasqualucci L., Guarini A., Dalla-Favera R., Foa R., Gaidano G. (2012): Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **119** (12), 2854-2862.
- Rowan W., Tite J., Topley P., Brett J. S. (1998): Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) mediates growth inhibition in human B- and T-lymphoma cell lines, and subsequent emergence of CD52-deficient cells. *Immunology* **95**, 427-436.
- Rowley D. J. (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243** (5405), 290-293.
- Rozman C., Montserrat (1995): Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* **333** (16), 1052-1057.
- Rozmyslowicz T., Majka M., Kijowski J., Murphy L. S., Conover O. D., Poncz M., Ratajczak J., Gaulton N. G., Ratajczak Z. M. (2003): Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS* **17**, 33-42.
- Rupert L. M. D., Claudio V., Lässer C., Bally M. (2017): Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* **1861** (1), 3164-3179.
- Sahu K. S., Gummadi N. S., Manoj N., Aradhyam K. G. (2007): Phospholipid scramblases: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **462**, 103-114.
- Salanova B., Choi M., Rolle S., Wellner M., Luft C. F., Kettritz R. (2007): β 2-Integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF- κ B activation of human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* **282** (38), 27960-27969.
- Samis A. J., Zboril G., Elce S. J. (1987): Calpain I remain intact and intracellular during platelet activation. Immunochemical measurements with monoclonal and polyclonal antibodies. *Biochemical Journal* **246** (2), 481-488.
- Satta N., Toti F., Feugeas O., Bohbot A., Dachary-Prigent J., Eschwege V., Hedman H., Freyssinet J. M. (1994): Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology* **153**, 3245-3255.
- Schroder K., Tschopp J. (2010): The inflammasomes. *Cell* **140**(6), 821-832.
- Sebbagh M., Renvoizé C., Hamelin J., Riché N., Bertoglio J., Bréard J. (2001): Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induce MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology* **3** (4), 346-352.

- Shilov Y., Ziv Y. (2013): The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14** (4), 197-210.
- Soleti R., Benameur T., Porro C., Panaro A. M., Andriantsitohaina R., Martín C. M. (2009): Microparticle harboring sonic hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* **30** (4), 580-588.
- Speicher M. R., Carter N. P. (2005): The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews. Genetics.* **6** (10), 782-792.
- Starostka D., Mikula P. (2014): Možnosti diagnostiky CD5-pozitivních B-lymfoproliferací. *Onkologie* **8** (3), 102-106.
- Stegmayr B., Ronquist G. (1982): Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urological Research* **10**, 253-257.
- Stilgenbauer S., Bullinger L., Benner A., Wildenberger K., Bentz M., Döhner K., Ho D. A., Lichter P., Döhner H. (1999): Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **13** (9), 1331-1334.
- Sugatani T., Hruska K. A. (2007): MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* **101** (4), 996-999.
- Suzuki K. (1987): Calcium activated neutral protease: domain structure and activity regulation. *Trends in Biochemical Sciences* **12**, 103-105.
- Swerdlow S. H., Campo E., Lee Harris N., Jaffe S. E., Pileri A. S., Stein H., Thiele J., Arber A. D., Hasserjian P. R., Le Beau M. M., Orazi A., Siebert R. (2017): Mature B-cell neoplasm. In: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised Fourth Edition, (Swerdlow S. H. ed., Campo E. ed., Lee Harris N. ed., Jaffe S. E. ed., Pileri A. S. ed., Stein H. ed., Thiele J. ed.), International Agency for Research on Cancer, Lyon, 216-221.
- Tang K., Liu J., Yang Z., Zhang B., Zhang H., Huang Ch., Ma J., Shen X-G., Ye D., Huang Bo. (2010): Microparticles mediate enzyme transfer from platelets to mast cells, A new pathway for lipoxin A₄ biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **400** (3), 432-436.
- Théry C., Ostrowski M., Segura E. (2009): Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology* **9**, 581-593.
- Toth B., Nikolajek K., Rank A., Nieuwland R., Lohse P., Pihusch V., Friese K., Thaler J. C. (2007): Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles *Platelets* **18** (7), 515-521.
- Tselepis D. A., Chapman J. M. (2002): Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet activating factor-acetylhydrolasa. *Atherosclerosis Supplements* **3**, 57-68.
- van der Pol E., Hoekstra G. A., Struk A., Otto C., Leeuwen V. G., Nieuwland (2010): Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **8**, 2596-2607.
- van der Pol E., Böing N. A., Harrison P., Sturk A., Nieuwland R. (2012): Classification, functions and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews* **64** (3), 676-705.
- VanWijk M. J., VanBavel E., Sturk A., Nieuwland R. (2003): Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Researcher* **59** (2), 277-287.
- Villar V. A., Merino D., Wenner M., Llano M., Cobo M., Montalvo C., García R., Martín-Durán R., Hurlé A. M., Nistal F. J. (2011): Myocardial gene expression of microRNA-133a and myosin heavy and light chains, in conjunction with clinical parameters, predict regression of left ventricular hypertrophy after valve replacement in patients with aortic stenosis. *Heart* **97**, 1132-1137.
- Walker D. J., Maier L. C., Pober S. J. (2009): Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4⁺ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *The Journal of Immunology* **182**, 1548-1559.
- Wang J. G., Williams J. C., Davis B. K., Jacobson K., Doerschunk C. M., Ting J. P. Y., Mackman N. (2011): Monocytic microparticles active endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood* **118** (8), 2366-2374.

- Watanabe J., Marathe K. G., Neilsen O. P., Weyrich S. A., Harrison A. K., Murphy C. R., Zimmerman A. G., McIntyre M. T. (2003): Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *The Journal of Biological Chemistry* **278** (35), 33161-33168.
- Welsh A. J., Holloway A. J., Wilkinson S. J., Englyst A. N. (2017): Extracellular vesicles flow cytometry analysis and standardization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **5**, 78.
- Wencel-Drake D. J., Okina R. J., Annis S. D., Kunicki J. T. (1991): Activation of calpain I and hydrolysis of calpain substrates (Actin-binding protein, glykoprotein Ib, and talin) are not a function of thrombin-induced platelet aggregation. *Arteriosclerosis and Thrombosis* **11**, 882-891.
- Williamson P., Kulick A., Zachowski A., Schlegel A. R., Devaux F. P. (1992): Calcium induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* **31** (27), 6355-6360.
- Winkler D., Schneider C., Kröber A., Pasqualucci L., Lichner P., Döhner H., Stilgenbauer S. (2005): Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* **19** (7), 1211-1215.
- Wolf P. (1967): The nature and significance of platelets products in human plasma. *British Journal of Haematology* **13** (3), 269-288.
- Wright G. J., Cherwinski H., Foster-Cuevas M., Brooke G., Puklavec M. J., Bigner M., Song Y., Jenmalm M., Gorman D., McClanahan T., Liu M. R., Brown M. H., Sedgwick J. D., Phillips J. H., Barclay A. N. (2003): Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *Journal of Immunology* **171**, 3034-3046.
- Wright G. J., Jones M., Puklavec M. J., Brown M. H., Barclay A. N. (2001): The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans *Immunology* **102**, 17-179.
- Wu M., Akinleye A., Zhu X. (2013): Novels agents for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Hematology and Oncology* **6** (1), 36.
- Yeh Y. Y., Ozer G. H., Lehman M. A., Maddocks K., Yu L., Johnson J. A., Byrd C. J. (2015): Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signalling. *Blood* **125** (21), 3297-3305.
- Yi H. M., Zhang E., Kang W. J., Shin N. Y., Byun Y. J., Oh S. H., Seo H. J., Lee H. Y., Kim W. D. (2012): Expression of CD200 in alternative activation of microglia following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Brain Research* **1481**, 90-96.
- Zarnegar J. B., Wang Y., Mahoney J. D., Dempsey W. P., Cheung H. H., He J., Shiba T., Yang X., Yeh W., Mak W. T., Korneluk G. R., Cheng G. (2008): Noncanonical NF- κ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nature Immunology* **9** (12), 1371-1378.
- Zenz T., Kröber A., Scherer K., Häbe S., Bühler A., Benner A., Denzel T., Winkler D., Edelmann J., Schwänen C., Döhner H., Stilgenbauer S. (2008): Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: Results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* **112** (8), 3322-3329.
- Zhang L., Anglesio S. M., O'Sullivan M., Thang F., Yang G., Sarao R., Nghiem P. M., Cronin S., Hara H., Melnyk N., Li L., Wada T., Liu L. P., Farrar J., Arceci J. R., Sorensen H. P., Penninger M. J. (2007): The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers. *Nature Medicine* **13** (9), 1060-1069.
- Zwaal A. F. R., Comfurius P., Bevers M. E. (2004): Scott syndrome, a bleeding caused by defective scrambling of membrane fosfolipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1636**, 119-128.

9 Seznam použitých zkratek

12 ⁺	Trisomie 12
Ak	Arachidonová kyselina
Akt	Protein kinasa B
AnxA1	Anexin A1
ASC	Apoptosis associated speck-like protein containing a CARD
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
Bcl-2	Protein B cell lymphoma – 2
BCR	B-buněčný receptor
CCR5	C-C chemokinový receptor typ 5
CD	Diferencianční skupina neboli cluster of differentiation
CDK	Cyklin dependentní kinasa
CFDA	Karboxyfluorescein diacetát
CLL	Chronická lymfatická leukemie
COX	Cyklooxygenasa
CXCR4	C-X-C chemokinový receptor typ 4
DLS	Dynamic light scatter
EM	Elektronová mikroskopie
EMP	Endoteliální mikropartikule
EV	Extracelulární vezikuly
FC	Fosfatidilcholin
FE	Fosfatidilethanolamin
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
Flipasa	Aminofosfolipid translokasa
FS	Fosfatidilserin
FSC	Forward scatter
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HUVEC	Lidské endoteliálních buňky umbilikální žíly
ICHS	Ischemická choroba srdeční
Il-1 β	Interleukin 1 β
LDT	Zdvojovací čas lymfocytů (lymfocyte doubling time)
miRNA	MicroRNA
MLC	Myozinové lehké řetězce

MP	Mikropartikule
mRNA	Messenger RNA
MRN	Minimální reziduální nemoc
NF- κ B	Nukleární faktor κ B
NLRP3	Leucine rich repeat containing protein
nm	Nanometr
NTA	Nanoparticle tracking analysis
PAF	Aktivátor krevních destiček (platelet-activating factor)
PAF-AH	Aktivátor krevních destiček – acetylhydrolasa
PAI-1	Plasminogene aktivátor inhibitor typu I
p27	Cyklin dependentní kinasový inhibitor 1B
pb	Pár basí
PDMP	Platelet-derived mikropartikule
PGE2	Prostaglandin E ₂
PMN	Polymorfonukleární leukocyty
Rb	Retinoblastomový protein
RI	Refraktivní index
ROCK 1	Serin/treonin Rho-associated protein kinasa I
RPS	Resistive pulse sensing
Shh	Sonic hedgehog
SM	Sfingomyelin
SSC	Side scatter
sTk	Sérová tymidin kinasa
s β ₂ -m	Rozpustný β ₂ -mikroglobulin
TNF- α	Tumor necrosis factor
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor