

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Lenka Knapová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Role mikroprostředí u mnohočetného
myelomu**

Bakalářská práce

Lenka Knapová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Martin Dihel

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lenka KNAPOVÁ
Osobní číslo: R19835
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Role mikroprostředí u mnohočetného myelomu
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Cílem bakalářské práce je provést literární rešerši zaměřenou na mikroprostředí kostní dřene u mnohočetného myelomu a praktické zvládnutí základních molekulárně biologických metod používaných na školícím pracovišti, včetně teoretických základů, statistických hodnocení

a práce s odbornou literaturou. Zásady pro obsahovou náplň: Úvod (cíl a struktura práce, charakteristika kapitol), teoretická část, praktická část (metodika, výsledky, tabulky, grafy, diskuze), závěr, použitá literatura. Formální část se řídí pravidly PŘF UP. Min. 30 stran textu.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. Papadimitriou K, Tsakirakis N, Malandrakis P, Vitsos P, Metousis A, Orologas-Stavrou N, Ntanasis-Stathopoulos I, Kanellias N, Eleutherakis-Papaiakovou E, Pothos P, Fotiou D, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Dimopoulos MA, Terpos E, Tsitsilonis OE, Kostopoulos IV. Deep Phenotyping Reveals Distinct Immune Signatures Correlating with Prognostication, Treatment Responses, and MRD Status in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11):3245.
2. Hou J, Wei R, Qian J, Wang R, Fan Z, Gu C and Yang Y. The impact of the bone marrow microenvironment on multiple myeloma (Review). *Oncol Rep*. 2019;42(4):1272-1282.
3. Tesi RJ. MDSC: the Most Important Cell You Have Never Heard Of. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(1):4-7.
4. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines (Basel)*. 2016;4(4):36.
5. Apodaca MC, Wright AE, Riggins AM, Harris WP, Yeung RS, Yu L, Morishima C. Characterization of a whole blood assay for quantifying myeloid-derived suppressor cells. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):230.

Aktuální literatura bude doporučena v průběhu bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Martin Dihel
Ústav imunologie

Datum zadání bakalářské práce: 6. dubna 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
L.S. Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice,
tel.: +420 585 634 901

- 7 - 04 - 2021

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Lenka Knapová
Název práce: Role mikroprostředí u mnohočetného myelomu
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta
University Palackého v Olomouci
Vedoucí práce: Mgr. Martin Dihel
Rok obhajoby: 2022

Souhrn:

Mnohočetný myelom je hematologické onemocnění způsobené klonální proliferací myelomových buněk v kostní dřeni. Klíčovou roli v patogenezi tohoto onemocnění hraje mikroprostředí kostní dřeně. Tato práce se zaměřila na studium zastoupení myelomových a imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

Teoretická část této bakalářské práce se zabývala literární rešerší na téma mnohočetného myelomu a aktuálních poznatků v oblasti působení mikroprostředí kostní dřeně na jeho vývoj.

Praktická část této bakalářské práce se věnovala imunofenotypizaci myelomových buněk a základních imunitních populací v kostní dřeni a periferní krvi pacientů s mnohočetným myelomem pomocí metody průtokové cytometrie. Práce dále srovnávala zastoupení myelomových buněk a imunitních subpopulací v kostní dřeni mezi pacienty s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem a pacienty s progredujícím či relabujícím onemocněním podstupujících léčbu.

Stanovení buněčného profilu v kostní dřeni a periferní krvi může napomoci k pochopení vývoje nemoci a zpřesnit tak léčebný přístup k pacientům.

Klíčová slova: mnohočetný myelom; mikroprostředí kostí dřeně; imunofenotypizace; periferní krev; průtoková cytometrie

Počet stran: 64

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Lenka Knapová
Title: The role of the microenvironment in multiple myeloma
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor: Mgr. Martin Dihel
The year of presentation: 2022

Summary:

Multiple myeloma is a hematological disease caused by clonal proliferation of myeloma cells in the bone marrow, whose microenvironment plays a key role in the pathogenesis of the disease. This work focuses on the study of myeloma and immune cell distribution in the bone marrow and in peripheral blood in patients with multiple myeloma.

The theoretical part of this thesis provides the findings of a literature search on the topic of multiple myeloma and current knowledge of the influence of bone marrow microenvironment onto the development of the disease in question.

The practical part of this bachelor thesis is devoted to immunophenotyping myeloma cells and main immune populations in the bone marrow and in peripheral blood of patients with multiple myeloma. For this purpose, the method of flow cytometry was used. Furthermore, the distribution of myeloma cells and immune subpopulations in the bone marrow was compared between two groups of patients: those with newly diagnosed multiple myeloma and those with progressive or relapsing disease who are undergoing treatment.

Determining the cell profile in the bone marrow and in peripheral blood can help to understand the development of multiple myeloma and thus refine the treatment approach to patients.

Keywords: multiple myeloma; bone marrow microenvironment; immunophenotyping; peripheral blood; flow cytometry
Number of pages: 64
Number of appendices: 0
Language: Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Martina Dihela a použila jen uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

V Olomouci dne 3. 5. 2022

Lenka Knapová

Touto cestou bych ráda poděkovala zejména svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Martinu Dihelovi. Rovněž chci poděkovat všem pracovníkům Laboratoře molekulární imunologie Ústavu imunologie LF UP a Fakultní nemocnice Olomouc (vedoucí doc. Dr. Ing. Eva Kriegová, přednosta prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.), především Mgr. Zuzaně Mikulkové, Ph.D. a Bishu Shrestha MSc. za spolupráci v laboratořích a za mnoho podnětných rad. Dále děkuji doc. MUDr. Mgr. Jiřímu Minaříkovi, Ph.D. z Hemato-onkologické kliniky LF UP a Fakultní nemocnice Olomouc (přednosta prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.) za poskytnutí biologických vzorků a klinických dat.

Práce vznikla za finanční podpory grantu LF UP_2022_011.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Mnohočetný myelom.....	3
3.1.1	Epidemiologie.....	4
3.1.2	Etiologie	4
3.1.3	Patogeneze	4
3.1.4	Změny u mnohočetného myelomu na molekulární úrovni.....	5
3.1.5	Klinické projevy	6
3.2	Fyziologické mikroprostředí kostní dřeně.....	7
3.2.1	Stroma kostní dřeně	8
3.2.2	Hematopoéza	9
3.2.3	B-lymfocyty a jejich vývoj	10
3.3	Mikroprostředí kostní dřeně u mnohočetného myelomu	11
3.3.1	Osídlení mikroprostředí kostní dřeně myelomovými buňkami	11
3.3.2	Remodelace mikroprostředí kostní dřeně myelomovými buňkami.....	12
3.3.3	Buněčné složky mikroprostředí kostní dřeně u mnohočetného myelomu	13
3.4	Průtoková cytometrie	15
4	Materiál a metody.....	19
4.1	Biologický materiál	19
4.2	Schéma práce.....	20
4.3	Laboratorní zpracování vzorků kostní dřeně a periferní krve	21
4.4	Imunofenotypizace vzorků kostní dřeně a periferní krve.....	21
4.5	Statistická analýza	22
4.6	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	22
4.6.1	Použité chemikálie.....	22

4.6.2	Použité roztoky	23
4.7	Seznam použitých přístrojů	24
5	Výsledky	25
5.1	Zastoupení základních imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem	25
5.2	Zastoupení myelomových buněk a subpopulací imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem	26
5.3	Srovnání zastoupení myelomových a imunitních buněk v kostní dřeni u pacientů s odběrem vzorku při diagnóze a při léčbě mnohočetného myelomu.....	29
6	Diskuse	34
7	Závěr	37
8	Seznam použité literatury	38

Seznam symbolů a zkratek

- APC – Allofykocyanin
- APC-Cy7 – Allofykocyanin-cyanin 7
- BCR – B-cell receptor (B-buněčný receptor)
- bFGF – Basic fibroblast growth factor (bazický fibroblastový růstový factor)
- CCL2 – Chemokinový ligand 2
- CCL3 – Chemokinový ligand 3
- CCL14 – Chemokinový ligand 14
- CTLA-4 – Cytotoxický T-lymfocytární antigen 4
- CRAB – Calcium elevated, renal failure, anemie, bone lesions (zvýšená hladina vápníku, selhání ledvin, anémie a patologické zlomeniny kostí)
- CSFs – Colony stimulating factors (kolonie stimulující factory)
- CXCL12 – Chemokinový ligand 12 s motive C-X-C
- CXCR4 – C-X-C Motif chemokine receptor 4 (chemokinový receptor 4 s motivem C-X-C)
- FITC – Isothiokyanát
- FSC – Forward scatter (přímý rozptyl)
- G-MDSC – Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (granulocytární myeloidní supresorové buňky)
- HSCs – Hematopoietic stem cells (hematopoetické kmenové buňky)
- ICAM-1 – Intercellular Adhesion Molecule 1 (intracelulární adhezní molekula 1)
- IFN- γ – Interferon gamma
- IgH – Imunoglobulinový těžký řetězec
- IL-10 – Interleukin 10
- IL-13 – Interleukin 13
- IL-4 – Interleukin 4
- IL-6 – Interleukin 6
- IMC – Immature myeloid cell (nezralá myeloidní buňka)
- KD – Kostní dřev
- LFA-1 – Lymphocyte function-associated antigen 1
- M protein – Myeloma protein (myelomový protein)

- MAdCAM-1 – Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
- MDSC – Myeloid-derived suppressor cells (myeloidní supresorové buňky)
- MGUS – Monoclonal gammopathy of undetermined significance (monoklonální gamapatie nejasného významu)
- MIG – Monoklonální immunoglobulin
- MIP-1 α – Macrophage inflammatory protein 1alpha (makrofágový zánětlivý protein 1 alpha)
- MIP-1 β – Macrophage inflammatory protein 1beta (makrofágový zánětlivý protein 1 beta)
- MKD – Mikroprostředí kostní dřeně
- MM – Mnohočetný myelom
- M-MDSC – Monocytic myeloid-derived suppressor cells (monocytární myeloidní supresorové buňky)
- MSCc – Mesenchymal stem cells (mesenchymální kmenové buňky)
- OPG – Osteoprotegerin
- PBS – Phosphate buffer saline (fosfátový pufr)
- PD-1 – Programmed cell death protein 1
- PE – Fykoerythryn
- Pe-Cy7 – Fykoerythryn-cyanin 7
- PerCP-Cy5.5 – Peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5
- PK – Periferní krev
- PMD-MDSC – Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (polymorfonukleární myeloidní supresorové buňky)
- PMT – Photomultiplier tube (fotonásobič)
- RANKL – Nukleární factor kappa B ligand
- SD – Směrodatná odchylka
- SMM – Smoldering myeloma (doutnající myelom)
- SSC – Side scatter (boční rozptyl)
- TAMs – Tumor-associated macrophages (makrofágové asociované s nádorem)
- TGF- β – Transforming growth factor beta (transformující růstový factor beta)

- T_h17 – Pomocné T17 lymfocyty
- TNF- α – Tumor necrosis factor alfa (tumor nekrozní faktor alfa)
- Treg – Regulační T-lymfocyty
- VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule 1
- VEGF – Vaskulární endoteliální růstový faktor
- VLA-4 – Very late antigen-4

Seznam obrázků

Obrázek 1: Ilustrativní porovnání vzhledu kostní dřeně u zdravé osoby a osoby s mnohočetným myelomem.....	3
Obrázek 2: Mikroprostředí kostní dřeně	8
Obrázek 3: Základní schéma hematopoézy.	10
Obrázek 4: Základní princip průtokového cytometru	15
Obrázek 5: Tvorba signálu u průtokového cytometru.	17
Obrázek 6: Scattergram FSC-A/SSC-A s gaty pro lymfocyty, monocyty a neutrofile v periferní krvi pacienta s mnohočetným myelomem.	18
Obrázek 7: Schéma postupu práce při imunofenotypizaci základních imunitních buněk ve vzorcích kostní dřeně a periferní krve pacientů s mnohočetným myelomem	20
Obrázek 8: Zastoupení lymfocytů, monocytů a neutrofilů v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.	25
Obrázek 9: Zastoupení myelomových buněk (A) a B-lymfocytů (B) v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.	26
Obrázek 10: Zastoupení cytotoxických (A) a pomocných (B) T-lymfocytů v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.	27
Obrázek 11: Zastoupení regulačních T-lymfocytů ze subpopulace pomocných T-lymfocytů v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.	27
Obrázek 12: Zastoupení klasických (A), intermediárních (B) a neklasických (C) monocytů v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.	28
Obrázek 13: Zastoupení G-MDSC a M-MDSC v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.....	28
Obrázek 14: Zastoupení neutrofilů v kostní dřeni (A) a periferní krvi (B) u pacientů s mnohočetným myelomem.....	29
Obrázek 15: Zastoupení myelomových buněk (A) a B-lymfocytů (B) v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě	30
Obrázek 16: Zastoupení cytotoxických (A) a pomocných (B) T-lymfocytů v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě	30
Obrázek 17: Zastoupení regulačních T-lymfocytů ze subpopulace pomocných T-lymfocytů v kostní dřeni při diagnóze a při léčbě.....	31
Obrázek 18: Zastoupení klasických (A), intermediárních (B) a neklasických (C) monocytů v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě	32

Obrázek 19: Zastoupení G-MDSC (A) a M-MDSC (B) subpopulace v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě	32
Obrázek 20: Zastoupení nezralých (A) a zralých (B) neutrofilů v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě	33

Seznam tabulek

Tabulka 1: Charakteristika souboru pacientů.....	19
Tabulka 2: Kombinace protilátek proti příslušným znakům využité pro charakterizaci imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.....	22

1 Úvod

Mnohočetný myelom je druhé nejčastější hematoonkologické onemocnění charakteristické klonální proliferací myelomových buněk v kostní dřeni. Klíčovou roli v patogenezi tohoto onemocnění hraje mikroprostředí kostní dřene, kde dochází k řadě strukturním a funkčním změnám. Dosud není etiologie onemocnění plně objasněna a prognóza pro většinu pacientů není příznivá. Je tedy všeobecná snaha v hledání příčin onemocnění spolu s prognostickými markery, které by napomohly předpovědět budoucí vývoj onemocnění a stanovit strategii léčby. Tato práce se proto zaměřila na studium zastoupení myelomových a imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

Experimentální část bakalářské práce se zabývá imunofenotypizací základních imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi pacientů s mnohočetným myelomem za pomoci metody průtokové cytometrie. U pacientů s mnohočetným myelomem je srovnáváno zastoupení myelomových a imunitních buněk mezi kostní dřeni a periferní krvi. Dále se práce zabývá srovnáním zastoupení myelomových a imunitních buněk v kostní dřeni u podskupin pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem a pacientů s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem podstupujících léčbu.

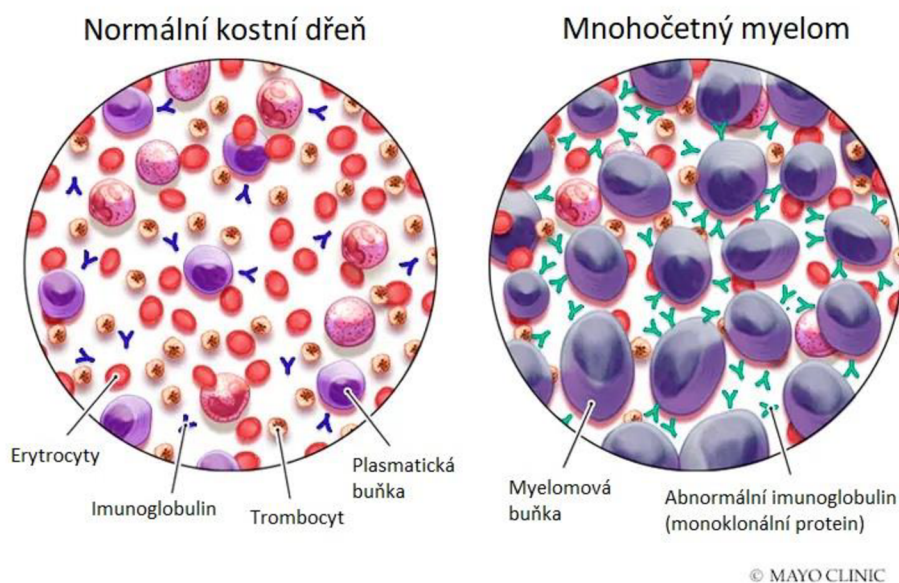
2 Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma nádorové mikroprostředí u pacientů s mnohočetným myelomem.
- Imunofenotypizace základních imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem s využitím metody průtokové cytometrie.
- Srovnání zastoupení myelomových buněk a základních imunitních buněk mezi kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem. Subanalýza provedena u podskupin pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem a pacientů s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem.

3 Literární přehled

3.1 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (MM) je nádorové onemocnění patřící mezi monoklonální gamapatie, které jsou charakterizovány maligní transformací B-lymfocytů, jejich následnou klonální proliferací a akumulací terminálních vývojových stádií plazmatických buněk v kostní dřeni. Maligní transformované plazmatické buňky způsobující MM se nazývají myelomovými buňkami a jsou typické produkcí abnormálního monoklonálního imunoglobulinu (MIG, M-proteinu), též zvaného paraprotein (viz Obrázek 1). Charakteristickými symptomy MM jsou zvýšená hladina vápníku, selhání ledvin, anémie a patologické zlomeniny kostí. V odborné literatuře bývají označovány akronymem CRAB (calcium elevated, renal failure, anemia, bone lesions) (Fairfield *et al.*, 2016). MM je onemocnění s několika vývojovými stádii. Stádia monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS = monoclonal gammopathy of undetermined significance) a doutnajícího MM (SMM = smoldering myeloma) se vyskytují před rozvojem aktivního myelomu. Díky rozvoji specializovaných molekulárních diagnostických metod je možné včasné odhalení brzkých stádií MM, bohužel i navzdory pokročilým metodám je onemocnění stále nevléčitelné (Špička *et al.*, 2005). V současné době roste na poli hematologických onemocnění snaha o identifikaci nových prognostických markerů, které by napomohly v sestavení účinné personalizované léčby (Hanbali *et al.*, 2017).



Obrázek 1: Ilustrativní porovnání vzhledu kostní dřene u zdravé osoby a osoby s mnohočetným myelomem (Převzato a upraveno z Mayo Clinic).

3.1.1 Epidemiologie

MM se v porovnání s jinými nemocemi tohoto typu řadí mezi poměrně řídké se vyskytující nádorové onemocnění. Dle údajů z mezinárodní databáze Globocan (IARC, 2020) k roku 2020 zaujímá MM v rámci všech diagnostikovaných nádorových onemocněních přibližně 1 %. V rámci hematologických malignit je druhým nejčastěji se vyskytujícím onemocněním, objevuje se v 15-20 % případů. Absolutní celosvětová incidence za rok 2020 činila přibližně 177 000 případů, z toho přibližně 99 000 případů se vyskytovalo u mužů a 78 000 u žen. U mužů je výskyt MM 1,3x častější než u žen. Absolutní počet zemřelých činil přibližně 117 000 (Sung *et al.*, 2021).

MM je často relabující onemocnění a v současné době neexistuje trvale účinná léčba. Incidence i mortalita dlouhodobě vzrůstá, na druhou stranu doba přežití, která je 5-10 let, se stále prodlužuje (Becker, 2011). MM se typicky vyskytuje u starší populace. Medián věku při diagnóze je 69 let (Padala *et al.*, 2021).

V České republice byla k roku 2018 absolutní incidence 561 případů, tj. 5,3 nových případů na 100 000 obyvatel. U žen i mužů byla absolutní incidence podobná. V roce 2018 zemřelo na následky MM 418 osob, tj. 3,9 úmrtí na 100 000 obyvatel (Krejčí *et al.*, 2018).

3.1.2 Etiologie

Dle dosavadních poznatků je vznik MM multifaktoriální proces. Mezi faktory vedoucí k rozvoji MM se řadí např. expozice radiací, pesticidům či jiným chemickým látkám. Rizikovým faktorem je i obezita a vyšší věk. Dále se na rozvoji MM podílejí faktory genetické a epigenetické (Boyle *et al.*, 2014). Zvýšené riziko onemocnění MM bylo pozorováno u potomků rodičů, kteří měli diagnózu MM. Etiologie MM však není doposud zcela objasněna (Altieri *et al.*, 2006).

3.1.3 Patogeneze

Patogeneze MM je způsobena akumulací mutací genů v paměťových B-lymfocytech vznikajících v zárodečných centrech lymfatických folikulů. Postupně vznikající promyelomové buňky cirkulují krevním oběhem a zachycují se pomocí adhezivních molekul ve dřevném stromatu kostní dřeně. Kostní dřeň je postupně osídlována zvyšujícím se počtem promyelomových buněk indukujících tvorbu řady cytokinů (např. IL-6, TNF- α) a adhezivních molekul (např. VCAM-1, ICAM-1). IL-6 je nejdůležitějším růstovým, diferenciacním a antiapoptickým cytokinem (Indrák *et al.*, 2006). Vyvinuté myelomové

buňky produkují vysoké hladiny monoklonálního proteinu (M proteinu) a další faktory vedoucí ke stimulaci aktivity osteoklastů způsobující kostní léze. Pokud poměr myelomových buněk v kostní dřeni přesáhne 50 %, jsou počty a funkce osteoblastů zodpovídající za tvorbu nové kostní tkáně výrazně redukovány (Bataille *et al.*, 1990; Bataille *et al.*, 1991).

V průběhu patogeneze MM se uplatňuje i aktivace buněčných onkogenů, dysregulace nádorových supresorových genů, chromozomální aberace a změny na molekulární úrovni spolu s provázaným působením mikroprostředí kostní dřene (MKD) (Indrák *et al.*, 2006).

MKD je dynamické prostředí obsahující navzájem komunikující různé typy buněk. Myelomové buňky v kostní dřeni jsou schopny si ostatní buňky podmanit a vytvořit si vhodné prostředí ke svému růstu (Fairfield *et al.*, 2016). Podmanění ostatních buněk je zprostředkováno několika mezibuněčnými a vnitrobuněčnými signalizačními kaskádami zahrnujícími RANK/RANK/OPG, Notch, Wnt kaskády, chemokiny a interleukiny. Ovládnutí mikroprostředí kostní dřene vede k postupné supresi osteoblastů a aktivaci osteoklastů. Zvýšená aktivace osteoklastů způsobuje degradaci kostní hmoty a tvorbu patologických zlomenin kostí (Terpos *et al.*, 2018). Postupnou progresí a akumulací genetických mutací se stávají myelomové buňky na MKD nezávislé. Následně mohou kostní dřeň opustit a metastázovat krví do jiných tkání a orgánů. V okamžiku metastáze myelomových buněk je onemocnění drastické a těžce léčitelné (Chesi *et Bergsagel*, 2015).

3.1.4 Změny u mnohočetného myelomu na molekulární úrovni

MM se vždy vyvíjí progresí z asymptomatických prekancerózních stádií MGUS a SMM. Existují především dvě skupiny cytogenetických abnormalit podílejících se na rozvoji MGUS a SMM: 1) aneuploidie chromozomů a 2) strukturní aberace. Nejčastější formou aneuploidie chromozomů jsou hyperdiploidie chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21, vyskytující se přibližně u 55 % pacientů. Strukturní aberace se vyskytují nejčastěji ve formě translokací spřažených s lokusem pro imunoglobulinový těžký řetězec IgH na chromozomu 14. Výskyt translokací je přibližně u 40-50 % pacientů (Corre *et al.*, 2015). Translokace zahrnují přemístění genového lokusu pro imunoglobulinový těžký řetězec (IgH) z chromozomu 14 (14q32.33) nejčastěji na chromozom 4, 6, 11, 14, 8, 12 nebo 20 a jsou často spojeny s tvorbou hypodiploidního karyotypu. Translokace vyskytující se s vysokou frekvencí u MM jsou t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) a t(14;20) (Kumar *et Rajkumar*, 2018).

Během patogeneze z prekancerozních stádií do MM se kumulují sekundární abnormality. Jedná se o delece chromozomů, inzerce, mutace nebo další translokace. Nejčastější chromozomální změny u MM jsou delece na chromozomu 17 v oblasti 17p13 nebo translokace na chromozomu 8 t(8;14). Dalšími abnormalitami pak mohou být změny v oblasti dlouhých ramen chromozomu 1, jako jsou delece v úseku 1p12 nebo amplifikace 1q21. Dále se s vysokou frekvencí vyskytují monosomie chromozomu 13 a del 13q, které se řadí mezi nejčastěji se vyskytující sekundární cytogenetické abnormality u MM. Monosomie chromozomu 13 je detekována u 35-40 % pacientů, del 13q u 6-10 % (Castaneda *et al.*, 2019). U pacientů trpících MM se vyskytuje řada mutací genů, nejvýznamnější jsou pak mutace v genech *NRAS*, *KRAS*, *FAM46C*, *DIS3*, *TP53*, *CCND1*, *PNRC1*, *ALOX12B*, *HLA-A* a *MAGED1* (Chapman *et al.*, 2011). Rychlost progresu do symptomatického MM je ovlivněna typem translokací a delecí, které se u daného pacienta vyskytují. Delece t(4;14), t(14;16) a del(17p) jsou spojovány s vysokým rizikem progresu do MM. Naopak t(11;14) a t(6;14) jsou spojovány s lepší prognózou a pomalejší progresí onemocnění (Hu *et al.*, 2019).

3.1.5 Klinické projevy

Klinické projevy MM jsou pestré a všichni pacienti netrpí stejnou škálou potíží. Nejčastěji pacienti s MM trpí bolestmi kostí způsobené osteolýzou. Osteolytická ložiska jsou vícečetná a mohou se nacházet po celém těle. Bolest je však nejintenzivnější v oblasti bederní páteře, která je nejvíce zatěžována. Dalším častým jevem je porucha imunitního systému asociována především s poruchou tvorby řady funkčních imunoglobulinů. Zvýšená tvorba jednoho klonu protilátek vede k supresi funkce imunitního systému a v konečném důsledku jsou pacienti s MM náchylnější k patogenům.

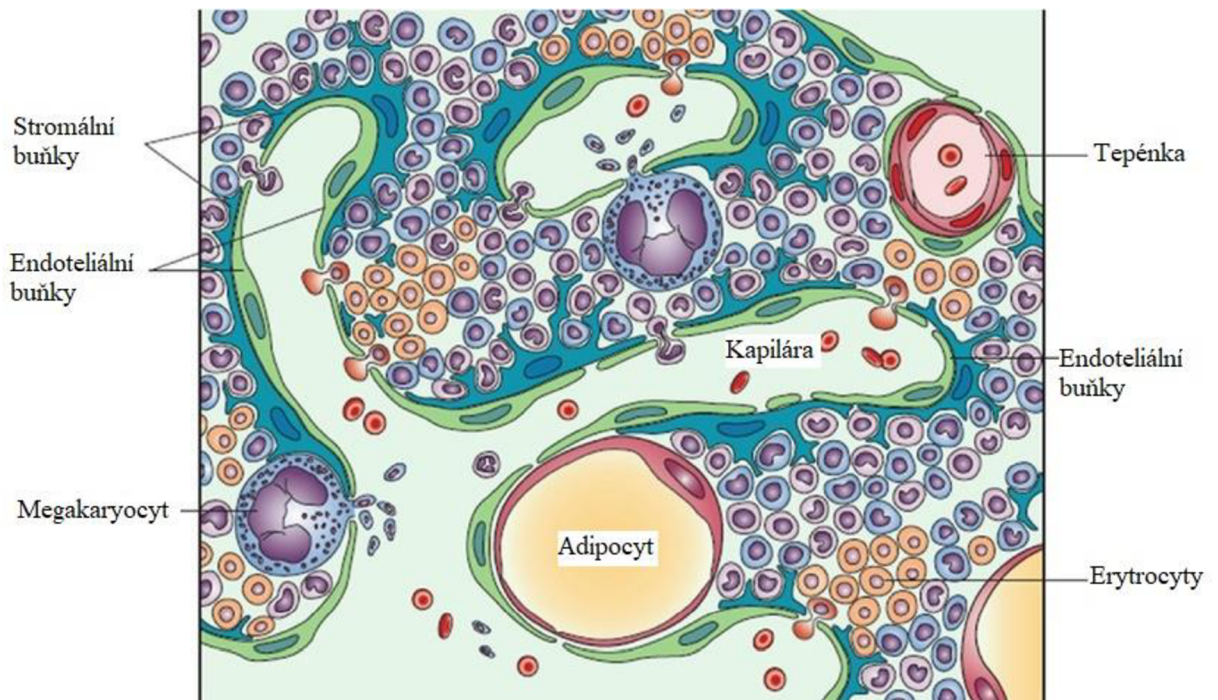
Dalším častým klinickým projevem je myelomová nefropatie způsobená poškozením ledvinových tubulů lehkými řetězci monoklonálních protilátek. Myelomová nefropatie se může vyvinout až v nebezpečnou renální insuficienci, během které pacienti vyžadují léčbu pomocí dialýzy (Špička *et al.*, 2005). Anemie, trombocytopenie, leukopenie jsou taktéž běžnými klinickými projevy způsobené působením cytokinů či potlačením správné funkce kostní dřeně myelomovými buňkami (Adam *et al.*, 2002).

3.2 Fyziologické mikroprostředí kostní dřene

Kostní dřeň je měkká tkáň nacházející se v dutinách kostí. Jedná se o hlavní hematopoetický orgán a primární lymfoidní tkáň. Její stavbu lze rozdělit na tzv. mezibuněčný matrix a stromu. **Stroma** kostní dřene je složena z hematopoetických a mesenchymálních kmenových buněk, které se dále diferenciuji do krevních buněk, osteoblastů, retikulárních buněk, fibroblastů, adipocytů a dalších specializovaných buněk. **Mezibuněčný matrix** je tvořen retikulární sítí tvořenou retikulárními buňkami, cytokiny a dalšími biologicky aktivními látkami sloužící k vzájemné buněčné komunikaci. MKD je zásobeno krví z cév a inervováno nervy (viz Obrázek 2) (Pospíšilová *et al.*, 2013).

MKD se během života dynamicky mění v závislosti na okolním prostředí a stáří člověka. Tradičně se dle stavby dělí na červenou, žlutou a šedou kostní dřeň.

- **Červená kostní dřeň** je hematopoeticky aktivní s vysokým zastoupením hematopoetických kmenových buněk. Krevní buňky vznikají postupným dělením a diferenciací. Během ontogeneze člověka dochází k postupné redukci hematopoetických kmenových buněk za adipocyty. V dospělosti se červená kostní dřeň vyskytuje především v hrudních kostech, žebrech, lebečních kostech a pánvi.
- **Žlutá kostní dřeň** je charakteristická vysokým výskytem adipocytů. Adipocyty fungují především jako energetická rezerva pro lidský organismus. Hematopoéza zde kvůli absenci hematopoetických buněk příliš neprobíhá.
- **Šedá kostní dřeň** vzniká postupně ve stáří ze žluté kostní dřene. Adipocyty se postupně nahrazují vazivem ve dřenevých dutinách (Dylevský, 2009).



Obrázek 2: Mikroprostředí kostní dřeně (Převzato a upraveno z Radiology Key).

3.2.1 Stroma kostní dřeně

Mesenchymální kmenové buňky (MSCs) jsou multipotentní kmenové buňky, které se v kostní dřeni vyskytují v nízkém zastoupení. Zaujímají přibližně 0,001-0,01 % mononukleárních buněk kostní dřeně. V současné době jsou ve středu zájmu vědeckého výzkumu v rámci regenerativní medicíny pro svůj vysoký terapeutický efekt. Tvarem jsou podobné fibroblastům (Bhat *et al.*, 2021).

Fibroblasty jsou vřetenovité buňky adherentního typu, které produkují proteiny extracelulárního matrixu (např. kolagen I). V kostní dřeni vytvářejí síť, kde sídlí hematopoetické buňky (Koller *et Palsson*, 1993). Typicky se vyskytují v pojivové tkáni, kde zajišťují její integritu. V současné době se na fibroblasty nahlíží jako na heterogenní buněčnou populaci. Nejenom že v rámci odlišných tkání lze najít odlišné fibroblasty, ale i v rámci jedné tkáně se vyskytují různé subpopulace fibroblastů (typicky v kůži). Vyjma produkce proteinů extracelulárního matrixu jsou nezbytné i pro regulaci imunitního systému, mezibuněčnou komunikaci nebo buněčnou diferenciaci. Jejich funkce však není stále plně objasněna, neboť nebyly dosud nalezeny adekvátní markery pro jejich studium (Claeys *et al.*, 2020). Dle studie Ugurlu *et Karaoze* (2020) mají fibroblasty stejně jako MSCs schopnost diferenciaci do dalších buněčných typů jako jsou osteoblasty, chondrocyty, adipocyty a hepatocyty a s MSCs sdílejí i podobné povrchové markery. Podobnost

fibroblastů s MSCs byly potvrzeny i dalšími studiemi (Blasi *et al.*, 2011, Sabatini *et al.*, 2005).

Adipocyty jsou buňky v kostní dřeni, které jsou součástí tzv. tukové tkáně kostní dřene (MAT). Během vývoje člověka dochází k jejich akumulaci a u dospělého člověka zastupují až 70 % kostní dřene. Funkce MAT není v dosavadní době pochopena. Pravděpodobně ovlivňuje osteogenezi a hematopoézu (Fazeli *et al.*, 2013).

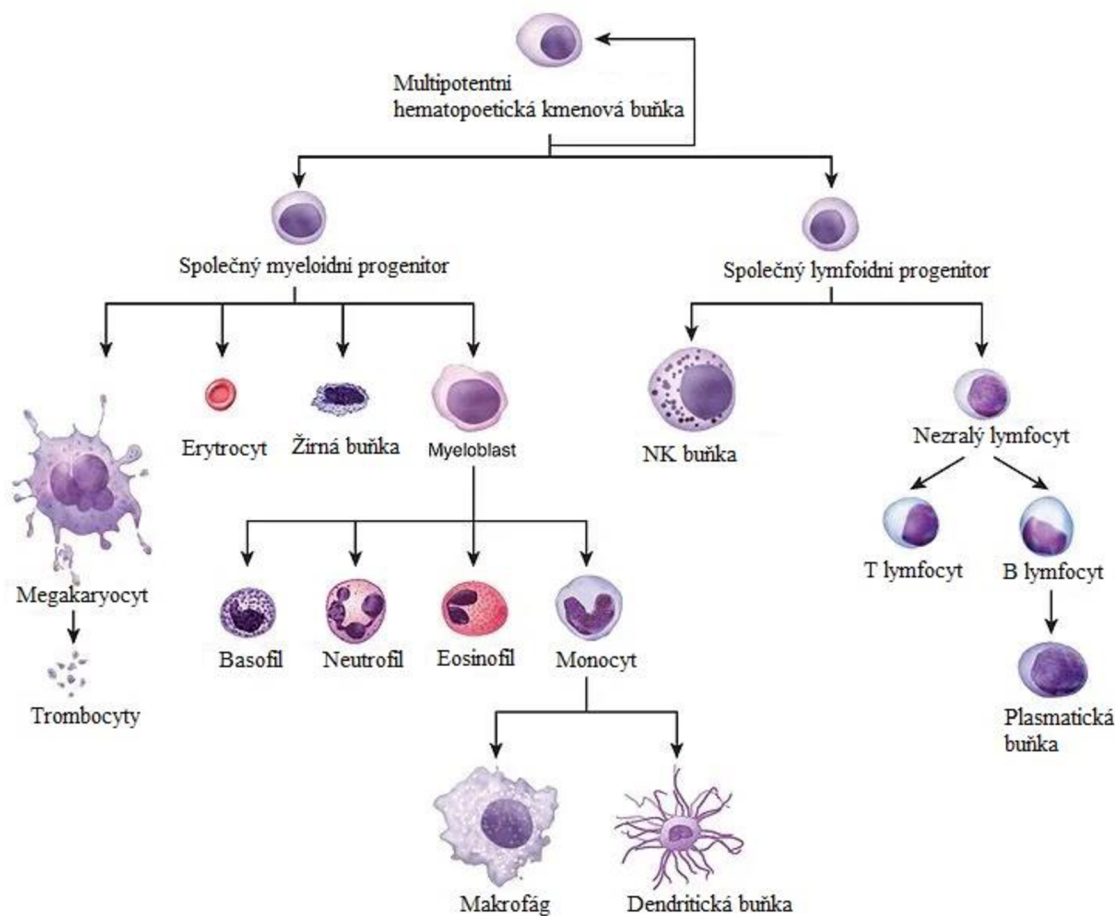
Endoteliální buňky se vyskytují na vnitřní stěně krevních cév. Vytvářejí bariéru mezi krevním řečištěm a tkáněmi. Svoji činností se podílejí na regulaci trombózy, trombolýze, přichytávání krevních destiček a vychytávání buněk z krevního řečiště. Známymi adhezivními molekulami endoteliálních buněk jsou ICAM-1, ICAM-2 a VCAM (Sumpio *et al.*, 2002).

Hematopoetické kmenové buňky (HSCs) jsou multipotentní buňky se schopností postupné diferenciaci do všech typů krevních buněk a schopností sebeobnovy. Proces diferenciaci se nazývá hematopoéza neboli krvetvorba a pro její správné fungování je nutná kooperace i dalších typů buněk vyskytujících se v blízkém okolí. HSCs se vyskytují v kostní dřeni v tzv. nikách neboli specifických mikroprostředích, které jsou nutné pro správné fungování hematopoézy (Penka *et Tesařová*, 2011; Schofield, 1978).

3.2.2 Hematopoéza

Hematopoéza je proces vzniku nových krevních buněk. V našem těle probíhá neustále, poněvadž organismus potřebuje obnovovat své krevní buňky po celý život. U dospělého člověka je hematopoéza v červené kostní dřeni realizována diferenciací multipotentních HSCs. Multipotence je schopnost buněk se diferenciovat do jakéhokoliv buněčného typu v rámci tkáně svého výskytu. Hematopoetické kmenové buňky dávají vzniknout všem typům krevních buněk. Kromě schopnosti multipotence jsou navíc schopné se obnovovat a po celý život organismu zajistit jejich dostatek. Systém hematopoézy je dosud povětšinou chápán jako hierarchický proces, na jehož vrcholu sídlí hematopoetické kmenové buňky (viz Obrázek 3) (Raza *et al.*, 2021). Z hematopoetické kmenové buňky se oddělují dvě základní větve: lymfoidní a myeloidní. Z myeloidní větve vznikají postupnou diferenciací erytrocyty, trombocyty, granulocyty (neutrofil, basofil, eozinofil), monocyty a některé další specializované krevní buňky. Z lymfoidní větve se vyvíjejí B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky. Hematopoéza je řízeným procesem biologicky

aktivních látek vyskytujících se v MKD, kterými jsou např. peptidové hormony CSFs (colony stimulating factors) (Jílek, 2014).



Obrázek 3: Základní schéma hematopoézy (Převzato a upraveno z Difference Between).

3.2.3 B-lymfocyty a jejich vývoj

Vývoj B-lymfocytů vychází z lymfoidní progenitorové buňky vznikající v červené kostní dřeni. Zde dochází k přeskupování genů kódujících variabilní části lehkých i těžkých řetězců imunoglobulinových molekul, které dávají vzniknout receptoru pro antigen B-lymfocytů (BCR = B-cell receptor). Vznik funkčního BCR je striktně kontrolován a v případě nefunkčního či autoreaktivního BCR dochází k apoptóze B-lymfocytů. Z červené kostní dřene migrují nezralé B-lymfocyty do periferních lymfatických orgánů (mízní uzliny, slezina, slizniční lymfatická tkáň), kde dochází k diferenciaci do terminálních vývojových stádií, jimiž jsou plazmatické či paměťové B-lymfocyty. Dokončení vývoje B-lymfocytů probíhá díky kontaktu s antigenem iniciující somatické hypermutace na molekulární úrovni. V případě kontaktu samotného nezralého B-lymfocytu s antigenem dochází k diferenciaci do plazmatického B-lymfocytu secernujícího pouze IgM izotyp

protilátek. K přesmyku na další izotypy imunoglobulinů (IgA, IgG, IgD, IgE) je nutná koaktivace specializovanými T-lymfocyty prostřednictvím adhezivní a kostimulační molekuly CD40/CD40L. Pro aktivaci je významné i působení cytokinů (Špička *et al.*, 2005).

3.3 Mikroprostředí kostní dřeně u mnohočetného myelomu

MKD je u MM charakteristické akumulací myelomových buněk v množství větším než 10 % (Charliński *et Jurczyszyn*, 2020). MKD hraje v patogenezi MM důležitou roli. Homeostáza MKD je myelomovými buňkami narušena v jejich prospěch, kdy dochází k podpoře proliferace, přežití, migrace a lékové rezistence (Podar *et al.*, 2009). Hypotéza recipročního vztahu mezi nádorovými buňkami a zdravým okolním mikroprostředím byla navržena už v roce 1889 anglickým chirurgem Stephenem Pagetem pod označením „seed and soil hypothesis“ a je platná i u jiných nádorových buněk a jejich mikroprostředích (Paget, 1889).

Pro osídlení a remodelaci MKD myelomovými buňkami jsou významné především adhezivní molekuly a cytokiny sloužící k vzájemné interakci s MKD a k indukci vnitrobuněčných biochemických mechanismů vedoucí k pozměnění MKD ve prospěch myelomových buněk (Špička *et al.*, 2005). Myelomové buňky se po určité době mohou stát na MKD nezávislé. Opouštějí MKD a migrují skrze cévní systém do dalších tkání, kde utvářejí ložiska. Onemocnění se pak vyvíjí do agresivní formy extramedulárního plazmocytomu (Bansal *et al.*, 2021).

3.3.1 Osídlení mikroprostředí kostní dřeně myelomovými buňkami

Myelomové buňky se zachycují v kostní dřeni pomocí vícečetné selektivní adheze k endoteliálním buňkám nacházejících se na rozhraní kapilár a MKD (Vanderkerken *et al.*, 2000). Po adhezi pronikají hlouběji do kostní dřeně a adherují k ostatním stromálním buňkám kostní dřeně, čímž se lépe zakotvují do MKD. Vazba k endoteliálním buňkám je řízena několika adhezními spoji. Důležitá je především vazba skrze CXCL12 a CXCR4. Chemokinový ligand CXCL12 (též označovaný jako SDF-1) exprimovaný endoteliálními buňkami (Alsayed *et al.*, 2007) zprostředkovává vazbu na chemokinový receptor CXCR4 exprimovaný na povrchu myelomových buněk (Möller *et al.*, 2003). Vazba receptoru CXCR4 s ligandem CXCL12 zvyšuje aktivitu receptoru VLA-4 ($\alpha 4\beta 1/CD138$) na povrchu myelomových buněk (Sanz-Rodriguez, 2001), jehož ligandem je VCAM-1 exprimovaný endoteliálními buňkami (Elices *et al.*, 1990) a glykoprotein extracelulárního matrixu

fibronektin (Wayner *et al.*, 1989). Upevnění myelomových buněk do MKD je tímto způsobem zesíleno. V adhezi myelomových buněk se dále uplatňuje integrin $\alpha 4\beta 7$ exprimovaný myelomovými buňkami (Neri *et al.*, 2011) vázající se na mukózní vaskulární adresin MAdCAM-1 (Berlin *et al.*, 1993) a E-cadherin exprimovaný endoteliálními buňkami (Turel, 1998). Vazba myelomových buněk v MKD na buňky stromální je zprostředkována především pomocí adhezních molekul VLA-4, CD44 a LFA-1 (Lokhorst *et al.*, 1994).

3.3.2 Remodelace mikroprostředí kostní dřene myelomovými buňkami

Hlavním proliferačním faktorem myelomových buněk je interleukin-6 (IL-6) (Zhang *et al.*, 1989). IL-6 je pleiotropní cytokin (Andus *et al.*, 1987; Snick *et al.*, 1988) a je produkován řadou stromatických buněk (Klein *et al.*, 1989). Jeho produkce se po adhezi myelomových buněk k buňkám stromatu zvyšuje a tím dochází k podpoře životaschopnosti myelomových buněk (Uchiyama *et al.*, 1993). Kromě parakrinního působení je IL-6 produkován i autokrinním způsobem samotnými myelomovými buňkami (Hata *et al.*, 1993; Kawano *et al.*, 1988). Produkce IL-6 je kromě receptoru pro IL-6 řízena i skrze receptor CD40 na povrchu myelomových buněk. Stimulací receptoru CD40 dochází k dalšímu zvýšení exprese IL-6 a podpoře růstu a přežití myelomových buněk (Urashima *et al.*, 1995). V MKD pak postupně dochází i za účasti dalších cytokinů, jako jsou vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF), ke zvýšení angiogeneze. VEGF, jenž je sekretován stromálními i myelomovými buňkami, kromě angiogeneze podporuje taktéž proliferaci myelomových buněk a indukuje produkci IL-6 stromálními buňkami (Gupta *et al.*, 2001).

Pro MM je charakteristická dysregulace v kostním metabolismu vedoucí ke zvýšené resorpci kostní hmoty, tedy ke zvýšené aktivitě osteoklastů. Zvýšená resorpce kostní hmoty způsobuje kostní léze a tvorbu patologických zlomenin (Oyajobi, 2007). V aktivaci a diferenciaci osteoklastů je podstatný ligand pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru kappa B (RANKL). RANKL indukuje diferenciaci osteoklastů vazbou na svůj receptor RANK exprimovaný osteoklasty (Burgess *et al.*, 1999) a jeho antagonistou je osteoprotegerin (OPG) (Lacey *et al.*, 1998). U pacientů s MM je působením myelomových buněk indukována vyšší exprese RANKL a snížená exprese OPG stromálními buňkami (Roux *et al.*, 2002) a to prostřednictvím buněčné adheze myelomových buněk ke stromálním buňkám skrze VLA-4/VCAM-1 interakci (Giuliani *et al.*, 2001). V aktivaci a diferenciaci

osteoklastů figurují rovněž makrofágové zánětlivé proteiny-1-alfa a beta (MIP-1 α , MIP-1 β) produkovány myelomovými buňkami (Abe *et al.*, 2002).

3.3.3 Buněčné složky mikroprostředí kostní dřene u mnohočetného myelomu

Mezi buněčné populace přítomné v MKD se řadí osteoblasty, osteoklasty, osteocyty, adipocyty, retikulární buňky, endoteliální buňky, erytrocyty, trombocyty, B-lymfocyty, T-lymfocyty, neutrofilů, basofilů, eosinofilů, makrofágové a myeloidní supresorové buňky (Pospíšilová *et al.*, 2013). V této práci jsou popsány buněčné populace, které jsou během patogeneze MM nejvýznamnější.

Makrofágy jsou specializované fagocytující buňky vyvíjející se z monocytů. Jedná se o buňky s jedním jádrem a vysoce granulózní cytoplazmou. Morfologie makrofágů je nestejnorodá a v řadě tkání se vyskytují morfologicky odlišné varianty jako např. Kupfferovy buňky v játrech, mikroglie v mozku nebo osteoklasty v kostech (Peakman *et Vergani*, 2009). Makrofágy jsou významné ve fungování imunitního systému. Aktivují buňky imunitního systému během infekce sekrecí prozánětlivých mediátorů a fagocytují patogeny a poškozené buňky. Tradičně se dělí na dvě skupiny M1 a M2 dle způsobu své aktivace. M1 makrofágy jsou aktivovány prozánětlivým cytokinem interferonem- γ (IFN- γ) a fagocytují odumřelé a degradující buňky v místě tvořícím zánět. M2 makrofágy se vyvíjejí po stimulaci IL-4 a IL-13 a stimulují hojení a regeneraci poškozených tkání produkcí protizánětlivých cytokinů (např. IL-10 a TGF- β). Při obraně organismu proti vyvíjejícímu se nádoru dochází k časté infiltraci makrofágu do tkání postiženými rakovinnými buňkami, označujících se jako makrofágy asociované s nádory (TAMs, tumor-associated macrophages). TAMs podporují růst nádorových buněk a angiogenezi (Burke *et Lewis*, 2002). Role makrofágů v MKD a v patogenezi MM je významná (Zheng *et al.*, 2009). V MKD dochází působením chemokinů CCL3, CCL14, CCL2 exprimovanými myelomovými a stromálními buňkami k chemoatrakci monocytů do MKD, kde je jejich vývoj stimulován do TAMs (Li *et al.*, 2015). U pacientů v progresivní fázi onemocnění je infiltrace TAMs v kostní dřeni vyšší oproti pacientům v remisi. Zvýšená infiltrace TAMs v kostní dřeni je proto asociována s horší prognózou a stupeň infiltrace by mohl fungovat jako jeden z potencionálních prognostických markerů (Chen *et al.*, 2020).

Myeloidní supresorové buňky (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) jsou heterogenní skupinou buněk vznikajících z nezralých myeloidních buněk (IMC, immature myeloid cell) během patologického stavu. Za normálních podmínek se IMC v kostní dřeni

diferenciují do zralých granulocytů, makrofágů a dendritických buněk. U MM je diferenciace IMC do zralých buněk inhibována a IMC se rozvíjejí v MDSC (Gabrilovich *et al.*, 2009). MDSC buňky se tradičně dělí na dvě podskupiny: monocytární MDSC (M-MDSC) a polymorfonukleární nebo také granulocytární MDSC (PMN-MDSC/G-MDSC) (Gabrilovich *et al.*, 2012). Lidské MDSC jsou CD33⁺ a CD11b⁺ a zároveň neexprimují markery typické pro zralé lymfoidní a myeloidní buňky. M-MDSC a G-MDSC lze rozlišit na základě rozdílné exprese vícero znaků. M-MDSC jsou CD11b⁺ CD14⁺ CD15⁻ HLA-DR^{low/-}, zatímco profil G-MDSC je CD11b⁺ CD14⁻ CD15⁺ (Bronte *et al.*, 2016). M-MDSC jsou u pacientů s MM zvýšeny jak v kostní dřeni, tak v periferní krvi. Množství vyskytujících se M-MDSC je asociováno s progresí MM. Pacienti v pokročilém stádiu MM mají vyšší poměr M-MDSC v periferní krvi oproti pacientům v méně pokročilém stádiu MM (Wang *et al.*, 2015).

Cytotoxické T-lymfocyty odstraňují poškozené a napadené buňky. Jsou charakteristické výskytem kostimulační molekuly CD8, pomocí které rozpoznávají HLA molekuly I. třídy (Jílek, 2014). Zvýšené zastoupení cytotoxických T-lymfocytů v periferní krvi pacientů s MM je asociováno s lepší prognózou onemocnění (Brown *et al.*, 1997).

Dalším subtypem T-lymfocytů jsou **pomocné T17 lymfocyty (Th17)**, které jsou charakteristické uvolňováním prozánětlivého interleukinu 17 (Jílek, 2019). U pacientů s MM lze pozorovat zvýšené množství Th17 v kostní dřeni a periferní krvi a zároveň podporu růstu myelomových buněk působením interleukinu 17 (Prabhala *et al.*, 2010).

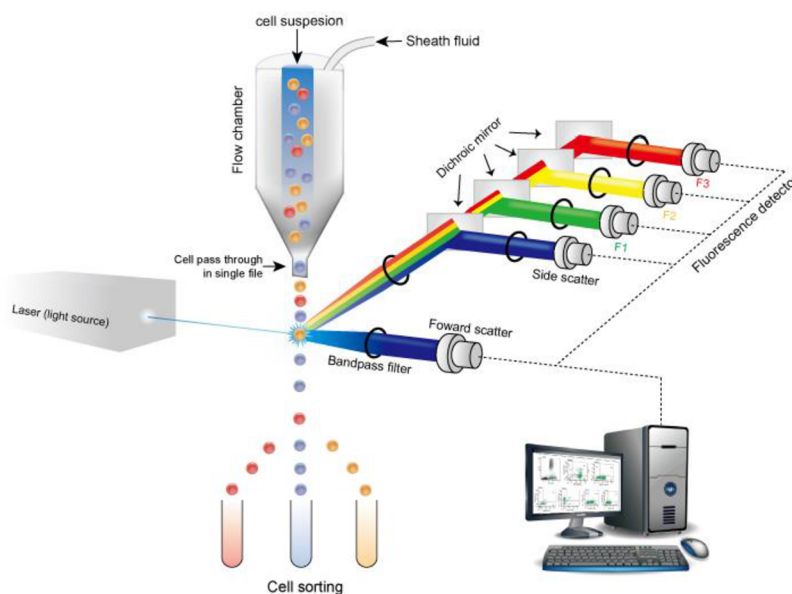
Regulační T-lymfocyty (Treg) se řadí mezi subpopulaci T-lymfocytů, jejichž hlavní funkcí je regulace imunitního systému proti vlastním antigenům. Potlačují působení autoreaktivních T-lymfocytů, které nebyly odstraněny apoptózou (Joshua *et al.*, 2008). Gershon *et al.* (1970) byli první, kteří popsali Treg na myších modelech. O pár let později Fujimoto *et al.* (1975) popsal negativní působení Treg v patogenezi rakoviny na myších modelech. Na Treg se začalo nahlížet jako na buňky podporující růst rakoviny. Množství Treg je u pacientů trpících hematologickými onemocněními zvýšeno (Heimberger *et al.*, 2008; Liyanage *et al.*, 2002; Ormandy *et al.*, 2005) a to i u pacientů s MM (Beyer *et al.*, 2006). Avšak dle jiných studií je množství Treg u pacientů s MM sníženo (Gupta *et al.*, 2011). Role Treg je tedy stále rozporuplná a vyžaduje další výzkum.

Neutrofilny jsou typem bílých krvinek s polymorfonukleárním jádrem a granulární acidofilní cytoplazmou, jejichž hlavní funkce je fagocytóza patogenů (Jílek, 2019). U pacientů s MM neutrofilny vykazují odlišnou morfolonii oproti „klasickým“ neutrofilům (Puglisi *et al.*, 2019). Neutrofilny vyskytující se v kostní dřeni pacientů s MM mají

up-regulovány geny *CSK*, *GSA*, *MEGF*, *PGMI* a *PROK2*, které jsou taktéž asociovány s progresí z MGUS do stádia aktivního MM (Romano *et al.*, 2020).

3.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní molekulárně biologická metoda používaná k identifikaci buněk na základě detekce jejich specifických znaků. Základní princip metody spočívá v ozáření buněk paprskem laseru o dané vlnové délce a detekování odraženého světla. Skrze paprsek laseru jsou buňky seřazeny jednotlivě vedle sebe v tenkém proudu tekutiny a jsou zaznamenávány jako jednotlivé události. Každá událost je charakteristická svou **relativní velikostí**, **relativní granularitou** a **relativní intenzitou fluorescence** (Ormerod, 2000). Relativní intenzita fluorescence je přímo úměrná míře exprese zkoumaného znaku označeného specifickou monoklonální protilátkou konjugovanou s daným fluorochromem. Použitím fluorochromů lze u buněk sledovat i další buněčné znaky jako například povrchové znaky, množství DNA či přítomnost proteinů (viz Obrázek 4) (Givan, 2013).



Obrázek 4: Základní princip průtokového cytometru (Převzato z Creative Diagnostics).

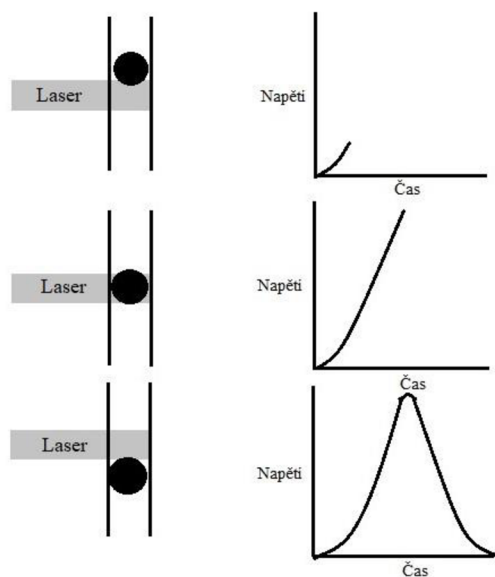
Základní systémy průtokového cytometru jsou fluidika, optika a elektronika.

- **Fluidní systém** unáší vzorek přístrojem v tzv. nosné tekutině (sheath fluid) a fokusuje vzorek do tenkého proudu, v němž jsou buňky separovány jednotlivě za sebou. Fokusace proudu je provedena hydrodynamickou

fokusací. Analyzovaný vzorek musí být vždy pro měření průtokovým cytometrem připraven v suspenzní formě.

- **Optický systém** má za úkol ozáření jednotlivých buněk excitačním laserovým zářením a detekci rozptýleného a emisního záření. Před detekcí je záření dle své vlnové délky soustavou dichroických zrcadel rozděleno.
- **Elektronický systém** převádí emisní světlo či fluorescenční záření do elektrických signálů. Pomocí fotonásobiče (PMT) jsou absorbovány odražené fotony, které excitují v PMT detektoru elektrony. Elektroдами je následně produkováno napětí, které signály elektronů zesílí. Proporcionálně k množství přicházejících fotonů jsou elektroдами generovány elektrické signály, které jsou zobrazeny ve formě kvantitativních dat (Ormerod, 2000).

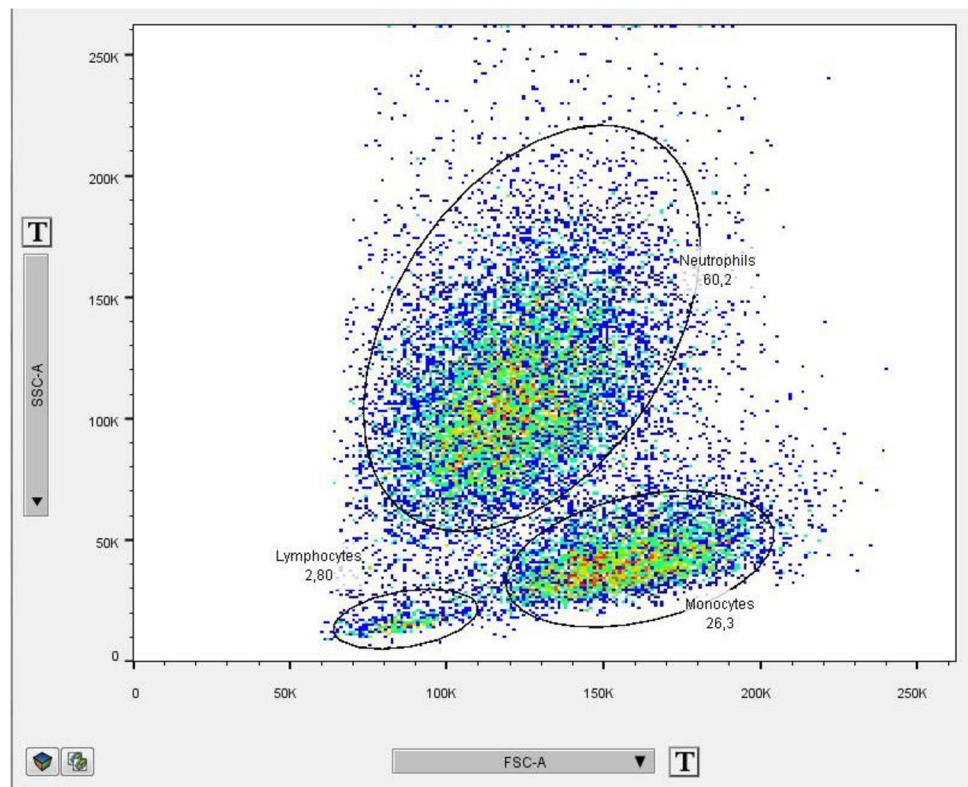
Část excitačního laserového záření, které dopadne na buňku, se rozptýlí a excituje fluorochromy navázané na buňce. Fluorochromy poté pohlčené záření uvolní ve formě fluorescenčního záření. Rozptýlené i fluorescenční záření je optickým systémem detekováno a pro každou jednotlivou buňku zaznamenáno elektronickým systémem jako jednotlivá událost charakteristická **časem detekce**, **forward scatterem (FSC)**, **side scatterem (SSC)** a **relativní intenzitou fluorescence** v jednotlivých detekčních kanálech. FSC odpovídá rozptýlenému záření ve směru dopadajícího laserového záření a jeho intenzita je přímo úměrná velikosti měřené buňky. SSC odpovídá rozptýlenému záření odlišného směru dopadajícího laserového záření a jeho intenzita je přímo úměrná granularitě uvnitř buňky. Průchodem buňky skrze laserový paprsek dochází ke zvyšování produkovaného napětí, které dosáhne maxima v okamžiku ozáření nejširší části buňky, poté napětí klesá až k nule. Proces lze graficky vyjádřit ve formě křivky s charakteristickou výškou, šířkou a plochou pod křivkou (viz Obrázek 5) (Givan, 2013).



Obrázek 5: Tvorba signálu u průtokového cytometru (Převzato a upraveno z Labome).

Základní grafické zobrazování cytometrických dat je pomocí histogramu a scattergramu. Histogram zobrazuje jednotlivé události s příslušnými hodnotami relativní intenzity fluorescence v jednom měřeném kanálu. Scattergram zobrazuje hodnoty relativní intenzity fluorescence ve dvou měřených kanálech v kartézské soustavě souřadnic.

Při měření vzorků s výskytem vícero populací a subpopulací buněk se k jejich identifikaci používá tzv. gating. Gate je určitý výběr z celého souboru naměřených dat zobrazených v podobě scattergramu. Data uvnitř gatu sdílí stejné nebo podobné charakteristiky (viz Obrázek 6) (Adan *et al.*, 2017).



Obrázek 6: Scattergram FSC-A/SSC-A s gaty pro lymfocyty, monocyty a neutrofilu v periferní krvi pacienta s mnohočetným myelomem.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

K analýze byly použity vzorky kostní dřeně (KD) a periferní krve (PK) od 58 pacientů s MM. Odběr vzorků byl proveden na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci mezi lety 2019-2021. Biologický materiál byl odebírán do zkumavky s transportním médiem (5ml RPMI + 3 kapky heparinu) či do EDTA zkumavky (zkumavka s přídavkem soli kyseliny etylendiaminotetraoctové: K₂ – EDTA, K₃ – EDTA). Následně byly vzorky transportovány do laboratoře. Přehled souboru pacientů je znázorněn v Tabulce 1.

Odběr a následná práce se vzorky KD a PK byly umožněny po získání informovaných souhlasů pacientů.

Pacienti byli rozděleni do dvou podskupin dle vývojového stádia MM, kde první podskupinu tvořili pacienti s nově diagnostikovaným aktivním MM (D) a druhou podskupinu tvořili pacienti s progredujícím či relabujícím MM podstupující léčbu (R).

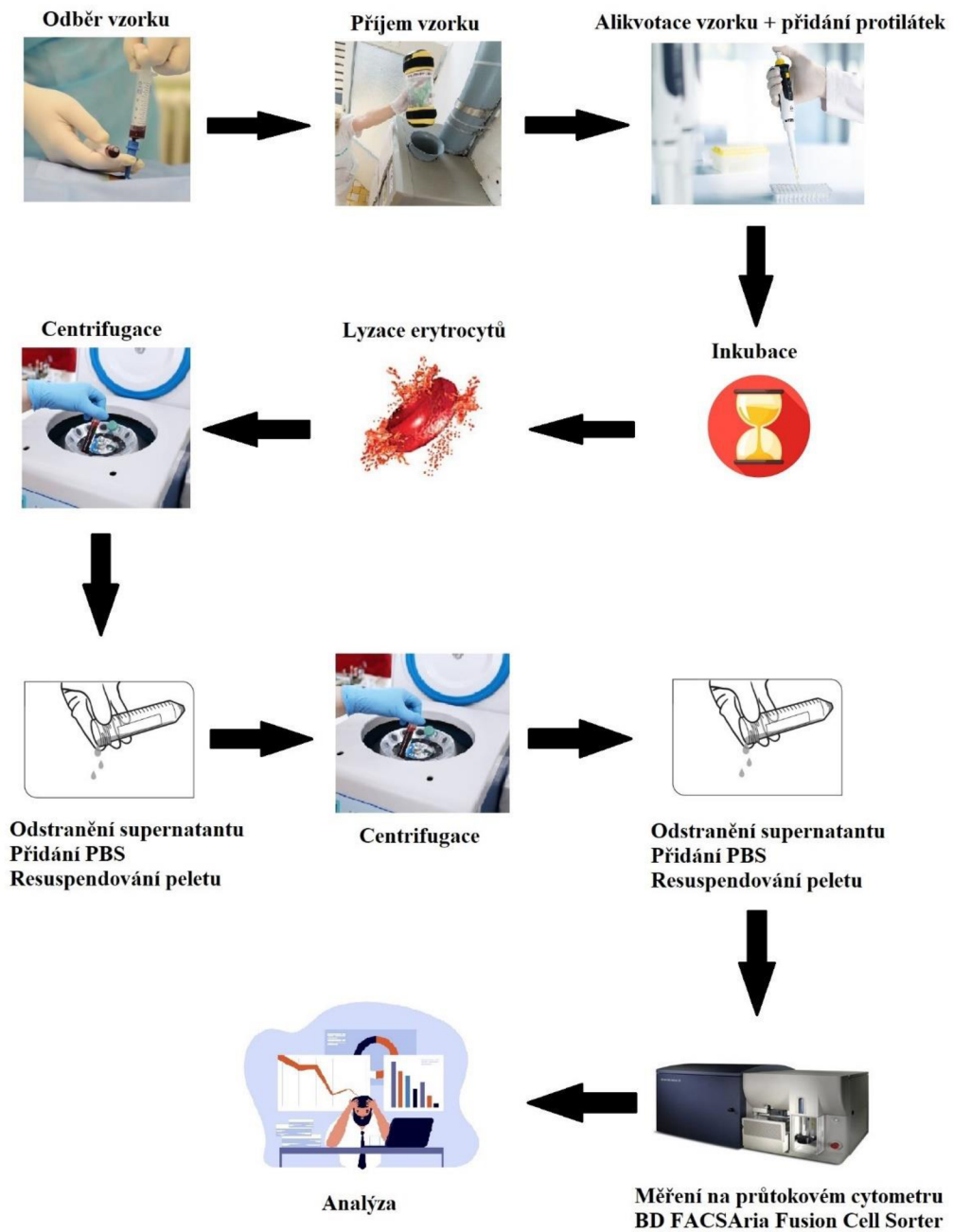
Tabulka 1: Charakteristika souboru pacientů.

	D	R	Celkem
Počet pacientů	23	35	58
Muži / ženy	14 / 9	17 / 18	31 / 27

D – pacienti s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem

R – pacienti s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem podstupující léčbu

4.2 Schéma práce



Obrázek 7: Schéma postupu práce při imunofenotypizaci základních imunitních buněk ve vzorcích kostní dřeně a periferní krve pacientů s mnohočetným myelomem (Převzato a upraveno z AlphaTec, Brand group, Idnes, Istock, Rehabilitace.info, Shsmu, Standard of care, Vecteezy).

4.3 Laboratorní zpracování vzorků kostní dřeně a periferní krve

Nejdříve byl pro každý biologický materiál napipetován do šesti 5ml zkumavek pro průtokovou cytometrii (BD Falcon) po 25 µl BD Horizon Brilliant Stain Buffer, který slouží ke stabilizaci polymerních fluorochromů typu Brilliant. Následně byly přidány příslušné protilátky konjugované s fluorochromy (viz kapitola 4.4 Imunofenotypizace vzorků kostní dřeně a periferní krve). Do připravených zkumavek s protilátkami byly poté přidány po 50 µl vzorky KD a PK. Po promíchání a 20 minutách inkubace za laboratorní teploty ve tmě byla provedena lyzace erytrocytů přidáním 3,5 ml vychlazeného lyzačního roztoku (4 °C). Lyzační roztok byl se vzorky pečlivě promíchán a ponechán k působení po dobu 5 min. Následně byla provedena centrifugace (400 rcf, 7 min, 20 °C). Vzniklý supernatant byl odstraněn slitím do odpadní láhve a buněčný pelet byl resuspendován ve 2 ml PBS. Vzorky byly poté znovu centrifugovány (400 rcf, 7 min, 20 °C). Supernatant byl opět odstraněn slitím do odpadní láhve a buněčný pelet resuspendován v 0,5 ml PBS. Poté následovalo měření vzorků na průtokovém cytometru BD FACSAria Fusion Cell Sorter.

4.4 Imunofenotypizace vzorků kostní dřeně a periferní krve

Imunofenotypizace, tedy identifikace buněk pomocí intracelulárních a povrchových znaků, byla provedena pomocí souboru protilátek charakterizující konkrétní buněčné populace (viz Tabulka 2). Dle postupu při zpracování vzorků KD a PK (viz kapitola 4.3 Laboratorní zpracování vzorků kostní dřeně a periferní krve) byl přidán 1 µl protilátky proti znakům CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD25, CD33, CD38, CD45, CD49d, CD56, CD62L, CD64, CD66b, CD86, CD127, CD138, CD152, CD163, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD192, CD197, CD274, CD279 a HLA-DR, konjugované s fluorochromy FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, Brilliant Violet 421, Brilliant Violet 510, Brilliant Violet 605, Brilliant Violet 650, Brilliant Violet 711, Brilliant Violet 785. Pro určení hranice pozitivní exprese ve vzorku či na jednotlivých subpopulacích byly pro každý vzorek kromě specifických protilátek použity rovněž nespecifické protilátky izotypové kontroly.

Panel byl sestaven nejen pro naši analýzu imunitních populací v KD a PB u pacientů s MM (viz Tabulka 2), ale také pro další výzkum probíhající na Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého společně s Fakultní nemocnicí Olomouc. Proto některé měřené znaky nebyly hodnoceny.

Tabulka 2: Kombinace protilátek proti příslušným znakům využité pro charakterizaci imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

Buňky imunitního systému	Kombinace znaků
Leukocyty	CD45⁺
T-lymfocyty	CD3 ⁺
Pomocné T-lymfocyty	CD3 ⁺ CD4 ⁺
Cytotoxické T-lymfocyty	CD3 ⁺ CD8 ⁺
Regulační T-lymfocyty	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻
B-lymfocyty	CD3 ⁻ CD19 ⁺
Klasické monocyty	CD14 ⁺ CD16 ⁻
Intermediární monocyty	CD14 ⁺ CD16 ⁺
Neklasické monocyty	CD14 ⁻ CD16 ⁺
Neutrofilly	CD15 ⁺ CD16 ⁺
M-MDSC	HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD66b ⁻
G-MDSC	HLA-DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD66b ⁺

4.5 Statistická analýza

Numerické hodnoty získané pomocí průtokové cytometrie byly vyhodnoceny statistickým softwarem GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). K nalezení vhodného statistického testu byl použit Shapirův-Wilkův test normality dat. Pro porovnání párových vzorků KD a PK s nenormálním rozdělením byl použit párový neparametrický Wilcoxonův test. Pro data s normálním rozdělením byl použit párový parametrický t-test. Pro porovnání vzorků KD odebraných při diagnóze nebo při léčbě onemocnění byl použit neparametrický Mann-Whitney U test. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Obrázky byly upraveny či vytvořeny ve FlowJo v.X0.7 software (Tree Star, Inc., San Carlos, CA, USA) a MS PowerPoint 2016 (Microsoft Corporation).

4.6 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.6.1 Použité chemikálie

- BD Horizon Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences, kat. č.563794)
- Monoklonální myši protilátky proti lidským znakům konjugované s fluorochromy (BioLegend): FITC – CD3 (klon OKT3, kat. č. 317306), CD181 (klon 8F1, kat. č. 320606), CD183 (klon G025H7, kat.č. 353704), CD185 (klon J252D4, kat. č. 356914), CD192 (klon K036C2, kat. č. 357216), IgG1 izotypová kontrola (klon

MOPC-21, kat. č. 400110); **PE** – CD20 (klon 2H7, kat. č. 302306), CD25 (klon M-A251, kat. č. 356104), CD66b (G10F5, kat. č. 305106), CD86 (klon IT2.2, kat. č. 305406), CD274 (klon 29E.2A3, kat. č. 329706), IgG1 izotypová kontrola (MOPC-21, kat. č. 400114); **PerCP-Cy5.5** – CD11b (klon ICRF44, kat. č. 301328), CD56 (klon MEM-188, kat. č. 304626), CD127 (klon A019D5, kat. č. 351322), CD274 (klon 29E.2A3 kat. č. 329738), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21, kat. č. 400150); **Pe-Cy7** – CD38 (klon HB-7, kat. č. 356608), CD163 (klon RM3/1, kat. č. 326514), CD182 (klon 5E8/CXCR2, kat. č. 320716), CD274 (klon 29E.2A3, kat. č. 329718), CD279 (klon EH12.2H7, kat. č. 329918), IgG1 izotypová kontrola (MOPC-21, kat. č. 400126); **APC** – CD49d (klon 9F10, kat. č. 304308), CD62L (klon DREG-56, kat. č. 304810), CD184 (klon 12G5, kat. č. 306510), CD197 (klon G043H7, kat. č. 353214), IgG1 izotypová kontrola (MOPC-21, kat. č. 400122); **APC-Cy7** – CD4 (klon RPA-T4, kat. č. 300518), CD19 (klon SJ25C1, kat. č. 363010), CD33 (klon P67.6, kat. č. 366614), CD64 (klon 10.1, kat. č. 305026), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21, kat. č. 400128); **Brilliant Violet 421** – CD152 (klon BNI3, kat. č. 369606), CD184 (klon 12G5, kat. č. 306518), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21, kat. č. 400158); **Brilliant Violet 510** – CD45 (klon 30-F11, kat. č. 103138), CD197 (klon G043H7, kat. č. 353232), HLA-DR (klon L243, kat. č. 307646), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21, kat. č. 400172); **Brilliant Violet 605** – CD15 (klon W6D3, kat. č. 323032), CD86 (klon IT2.2, kat. č. 305430), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21, kat. č. 400162); **Brilliant Violet 650** – CD16 (klon 3G8, kat. č. 302042), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21, kat. č. 400164); **Brilliant Violet 711** – CD14 (klon M5E2, kat. č. 301838), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-173, kat. č. 400272); **Brilliant Violet 785** – CD8 (klon SK1, kat. č. 344740), IgG1 izotypová kontrola (MOPC-173, kat. č. 400274) (EXBIO Antibodies); **FITC** – CD138 (klon MI15, kat. č. 1F-814-T100); **PerCP-Cy5.5** – CD56 (klon MEM-188, kat. č. PC-231-T100), **Pe-Cy7** – CD38 (klon HIT2, kat. č. ED7148), CD279 (klon 29E.2A3, kat. č. T7-177-T100); **APC** – CD62L (klon DREG56, kat. č. 12-630-C100); **APC-Cy7** – CD19 (klon LT19, kat. č. ED7135)

4.6.2 Použité roztoky

- 1x PBS pufr (8 g NaCl, 200 mg KCl, 240 mg KH₂PO₄, 1,44 g Na₂PO₄, doplnit destilovanou vodou do 1000 ml; pH 7,4) (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)

- Erytrocytární lyzační pufr (8,3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 40 mg EDTA, doplnit destilovanou vodou do 1000 ml; pH 7,29) (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)
- Transportní médium (5 ml RPMI + 3 kapky heparinu (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)

4.7 Seznam použitých přístrojů

- Flowbox MSC 1.2 (Thermo Scientific GmbH)
- Centrifuga Thermo ScientificTM CytospinTM 4 Cytocentrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Průtokový cytometr BD FACSAria Fusion Cell Sorter (BD Biosciences)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Minicentrifuga Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)

5 Výsledky

5.1 Zastoupení základních imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem

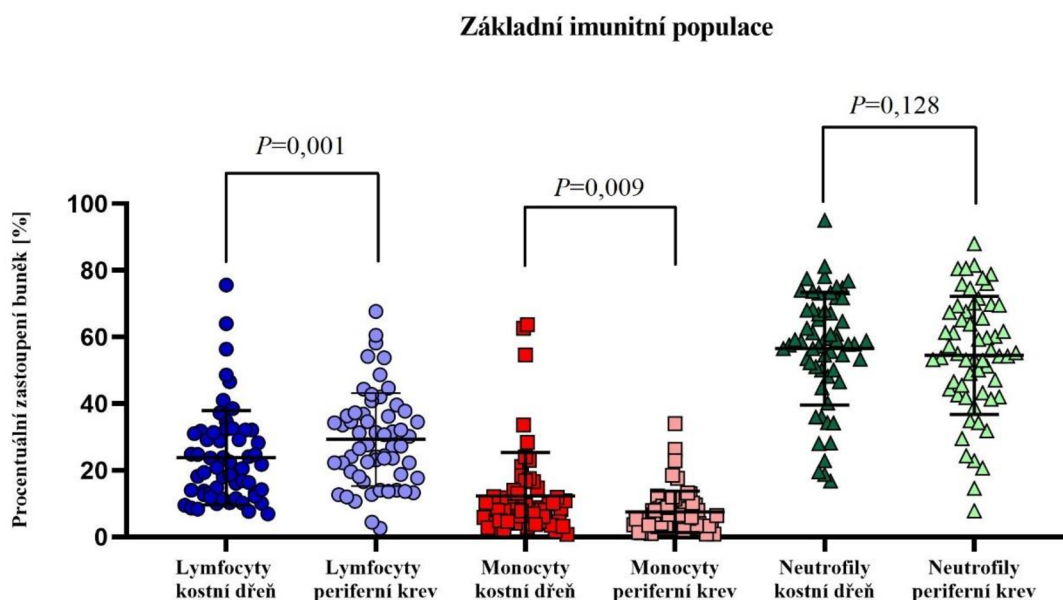
Imunofenotypizací vzorků KD a PK pacientů s MM (n=58) pomocí metody průtokové cytometrie byly získány hodnoty, které byly dále analyzovány ve FlowJo a vyhodnoceny ve statistickém programu GraphPad Prism 8.01 za použití párového neparametrického Wilcoxonova testu. Pro stanovení zastoupení základních imunitních buněk v KD a PK byly vybrány populace lymfocytů, monocytů a neutrofilů.

Lymfocyty se vyskytovaly u pacientů s MM více v PK s průměrným zastoupením 29,3 % (směrodatná odchylka $SD \pm 14,3$ %) než v KD ($P=0,001$). V KD bylo jejich průměrné zastoupení 23,8 % $SD \pm 13,6$ %.

Monocyty se vyskytovaly více v KD s průměrným zastoupením 12,3 % $SD \pm 11,5$ % ($P=0,009$). V PK bylo průměrné zastoupení 7,6 % ($SD \pm 5,5$ %).

V rámci zastoupení **neutrofilů** v KD a PK u pacientů s MM nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (56,5 % $SD \pm 16,5$ % v KD vs. 54,5 % $SD \pm 16,5$ % v PK, $P=0,128$).

Procentuální zastoupení lymfocytů, monocytů a neutrofilů v KD a PK je znázorněno na Obrázku 8.



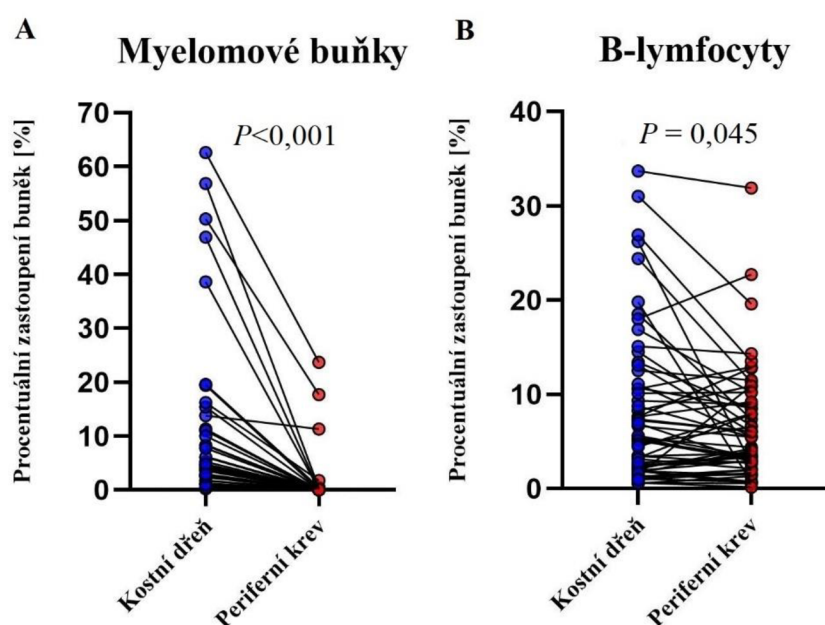
Obrázek 8: Zastoupení lymfocytů, monocytů a neutrofilů v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

5.2 Zastoupení myelomových buněk a subpopulací imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem

Pro detailnější analýzu KD a PK u pacientů s MM byly dále sledovány myelomové buňky a významné subpopulace imunitních buněk důležité v patogenezi MM.

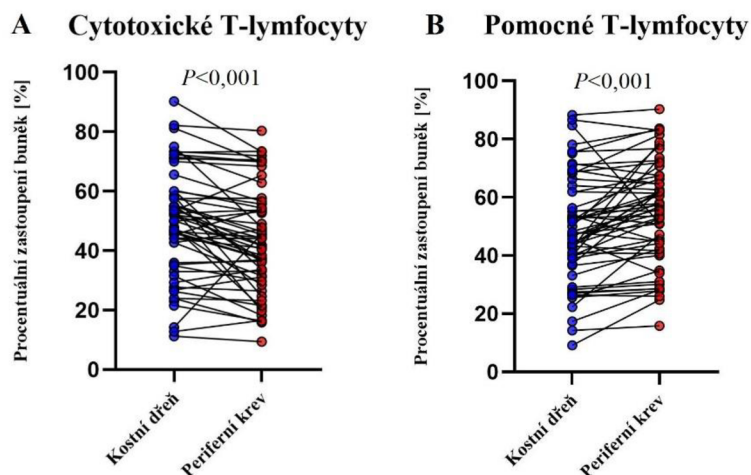
Pro MM je charakteristická především přítomnost myelomových buněk exprimujících molekuly CD138 a CD38. **Myelomové buňky** se více vyskytovaly v KD než v PK ($P < 0,001$). Průměrné zastoupení v KD bylo 8,8 % (SD±12,6 %), v PK 1,0 % (SD±3,4 %) (viz Obrázek 9A).

B-lymfocyty byly více zastoupeny v KD s průměrným zastoupením 8,2 % (SD±12,7%) než v PK (6,4 % SD±10,8 %, $P = 0,045$, viz Obrázek 9B).



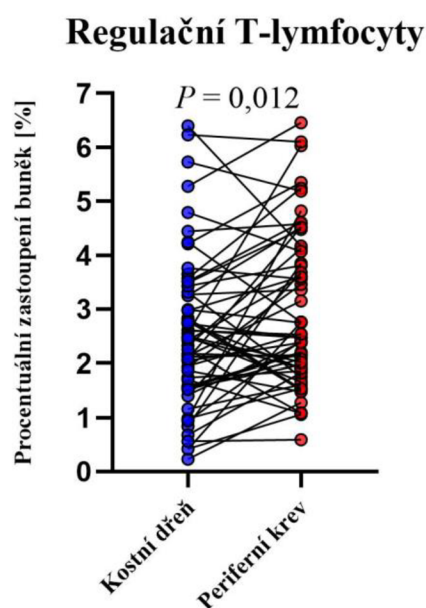
Obrázek 9: Zastoupení myelomových buněk (A) a B-lymfocytů (B) v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

V rámci populace T-lymfocytů byly sledovány cytotoxické a pomocné T-lymfocyty. **Cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty** se více vyskytovaly v KD než v PK (49,2 % SD±17,4 % vs. 43,6 % SD±16,7 %, $P < 0,001$), naopak v PK se více vyskytovaly **pomocné CD4⁺ T-lymfocyty** (49,2 % SD±17,3 % vs. 54,7 % SD±16,9 %, $P < 0,001$) ve srovnání s KD (viz Obrázek 10).



Obrázek 10: Zastoupení cytotoxických (A) a pomocných (B) T-lymfocytů v kostní dřevě a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

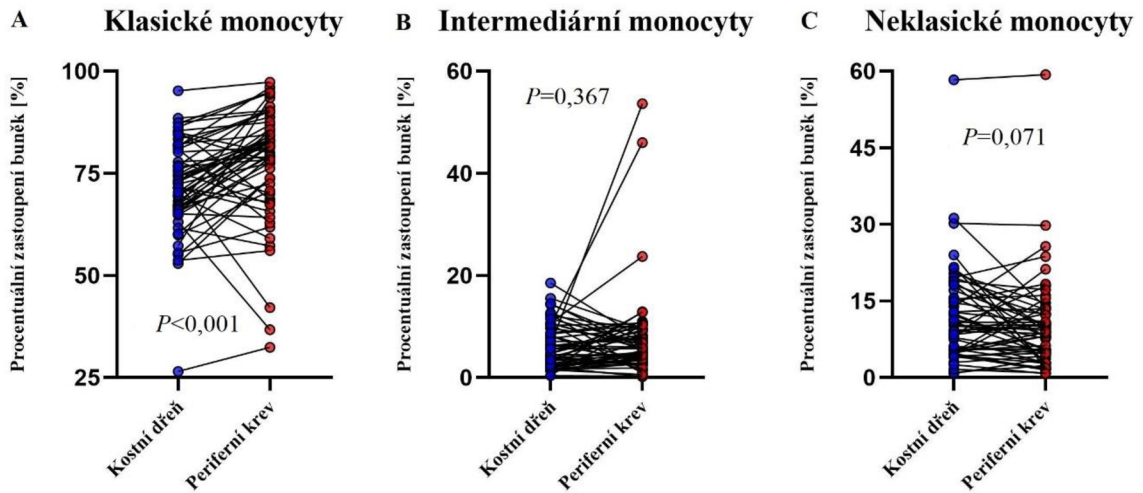
Zastoupení **regulačních T-lymfocytů** ze subpopulace **pomocných CD4⁺ T-lymfocytů** bylo větší v PK (2,5 % SD±1,4 % vs. 3,0 % SD±2 %, $P=0,012$) ve srovnání s KD (viz Obrázek 11).



Obrázek 11: Zastoupení regulačních T-lymfocytů ze subpopulace pomocných T-lymfocytů v kostní dřevě a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

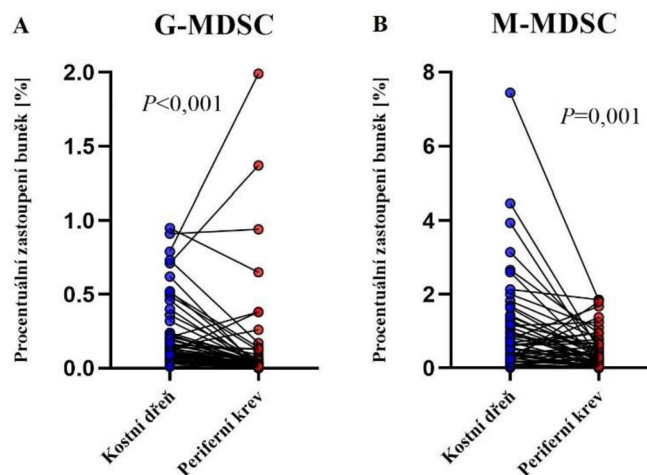
V PK byl ve srovnání s KD pozorován vyšší výskyt **klasických monocytů** (71,9 % SD±12,8 % vs. 77,6 % SD±13,1 %, $P<0,001$). V zastoupení **intermediárních** (6,1 %

SD±3,9 % vs. 7,6 % SD±7,9 %, $P=0,367$) a **neklasických** (12,0 % SD±9,7 % vs. 10,2 % SD±8,4 %, $P=0,071$) **monocytů** nebyl pozorován mezi KD a PK statisticky významný rozdíl (viz Obrázek 12).



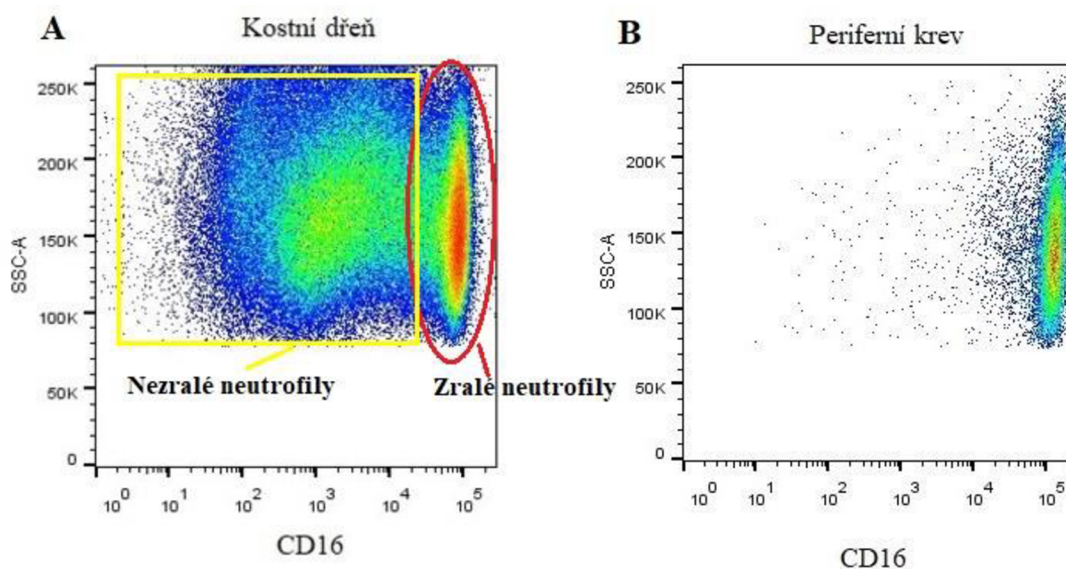
Obrázek 12: Zastoupení klasických (A), intermediárních (B) a neklasických (C) monocytů v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

Dále byly zkoumány subpopulace MDSC. Zastoupení subpopulací **G-MDSC** (0,2 % SD±0,2 % vs. 0,1 % SD±0,4 %, $P<0,001$) a taktéž **M-MDSC** (1,0 % SD± 1,1 % vs. 0,5 % SD±0,5 %, $P=0,001$) bylo vyšší v KD ve srovnání s PK (viz Obrázek 13).



Obrázek 13: Zastoupení G-MDSC a M-MDSC v kostní dřeni a periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem.

Populace neutrofilů vykazuje v KD a PK odlišný fenotyp. V KD se vyskytují kromě zralých neutrofilů i neutrofilů nezralé, které exprimují znak CD16 v menší míře. V PK se vyskytují pouze zralé neutrofilů (viz Obrázek 14B). Na Obrázku 14A vpravo lze vidět populaci, která odpovídá populaci zralých neutrofilů s velmi vysokou expresí znaku CD16, vlevo od této populace se nachází nezralé neutrofilů s nižší expresí znaku CD16.

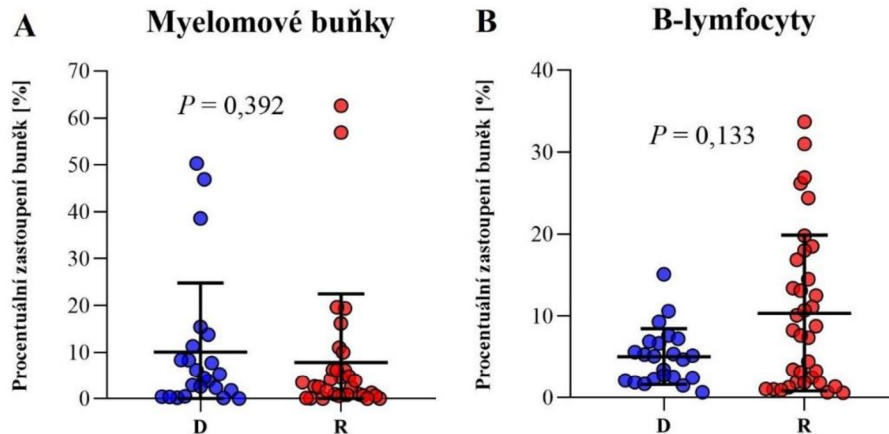


Obrázek 14: Zastoupení neutrofilů v kostní dřeni (A) a periferní krvi (B) u pacientů s mnohočetným myelomem.

5.3 Srovnání zastoupení myelomových a imunitních buněk v kostní dřeni u pacientů s odběrem vzorku při diagnóze a při léčbě mnohočetného myelomu

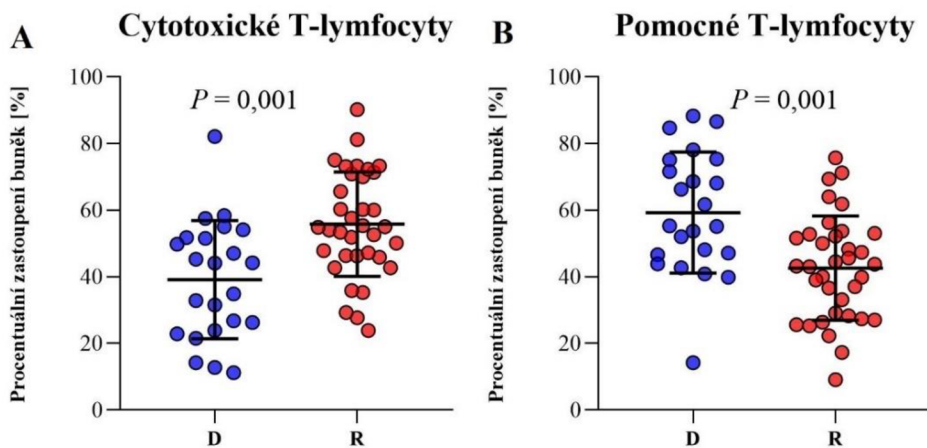
Dále jsme srovnali zastoupení myelomových buněk a imunitních populací v kostní dřeni u pacientů s MM s odběrem vzorku při diagnóze (n=23) a u pacientů při léčbě MM (n=35).

V rámci zastoupení **myelomových buněk** nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (10,1 % SD±11,2 % u pacientů s odběrem vzorku při diagnóze vs. 7,9 % SD±12,6 % při léčbě, $P=0,392$) a taktéž ani u **B-lymfocytů** (5,0 % SD±12,7 % vs. 10,3 % vs. 12,7 %, $P=0,133$ (viz Obrázek 15).



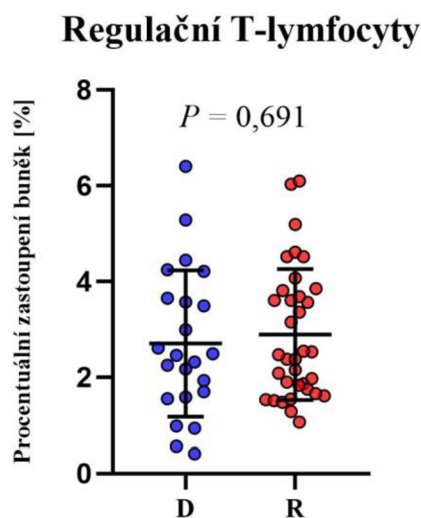
Obrázek 15: Zastoupení myelomových buněk (A) a B-lymfocytů (B) v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě (D – pacienti s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, R – pacienti s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem podstupující léčbu).

Cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty se vyskytovaly více u pacientů podstupujících léčbu (39,1% SD±17,4 % vs. 55,8 % SD±17,4 %, $P=0,001$), naopak **pomocné CD4⁺ T-lymfocyty** se více vyskytovaly u pacientů s odběrem vzorku při diagnóze (59,3 % SD±17,3 % vs. 42,6 % SD±17,3 %, $P=0,001$, viz Obrázek 16).



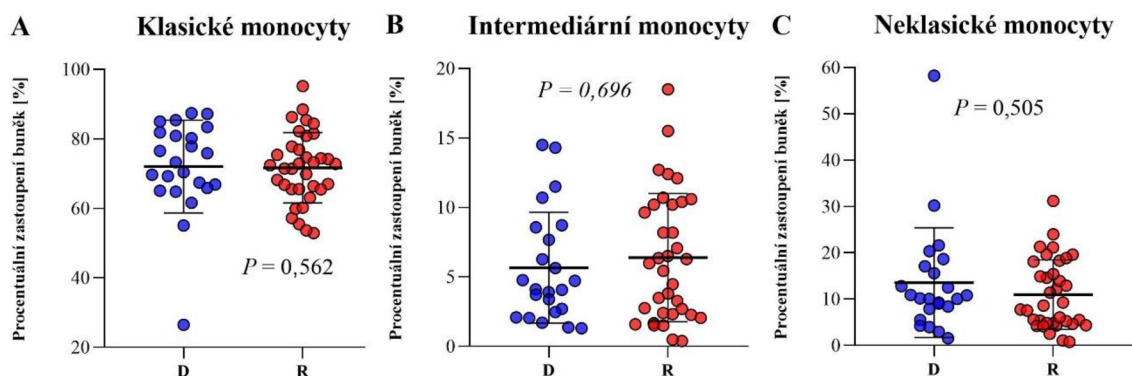
Obrázek 16: Zastoupení cytotoxických (A) a pomocných (B) T-lymfocytů v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě (D – pacienti s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, R – pacienti s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem podstupující léčbu).

Zastoupení **regulačních T-lymfocytů** ze subpopulace pomocných CD4⁺ T-lymfocytů nevykazovalo statisticky významný rozdíl ve srovnání s pacienty s odběrem vzorku při diagnóze a pacienty při léčbě (2,7 % SD±1,3 % vs. 2,9 % SD±2,3, $P=0,691$, viz Obrázek 17).



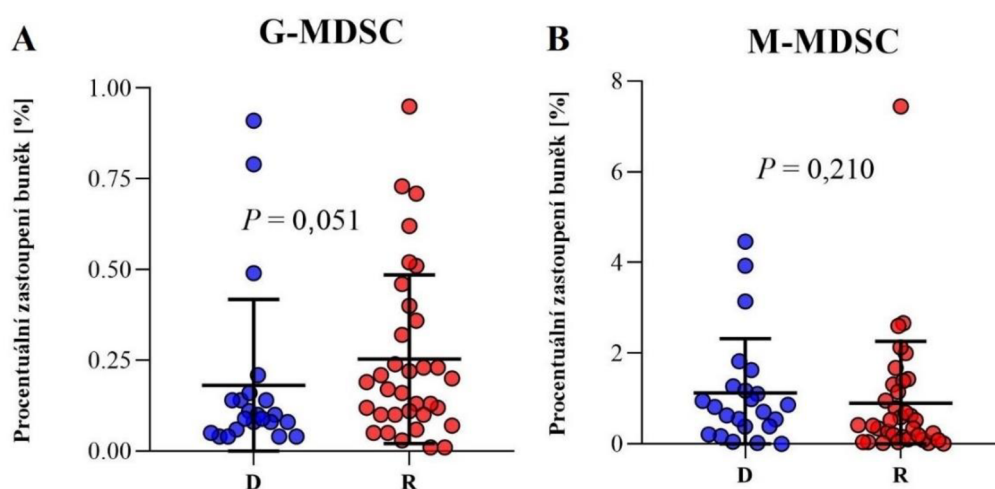
Obrázek 17: Zastoupení regulačních T-lymfocytů ze subpopulace pomocných T-lymfocytů v kostní dřeni při diagnóze a při léčbě (D – pacienti s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, R – pacienti s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem podstupující léčbu).

Zastoupení **klasických** (72,1 % SD±13,0 % vs. 71,7 % SD±12,8 %, $P=0,562$), **intermediárních** (5,7 % SD±4,0 % vs. 6,4 % SD±3,9 %, $P=0,696$) a **neklasických monocytů** (13,4 % SD±9,8 % vs. 11,0 % SD±9,7 %, $P=0,505$) nevykazovalo statisticky významné rozdíly ve srovnání s pacienty s odběrem vzorku při diagnóze a pacienty při léčbě (viz Obrázek 18).



Obrázek 18: Zastoupení klasických (A), intermediárních (B) a neklasických (C) monocytů v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě (D – pacienti s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, R – pacienti s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem podstupující léčbu).

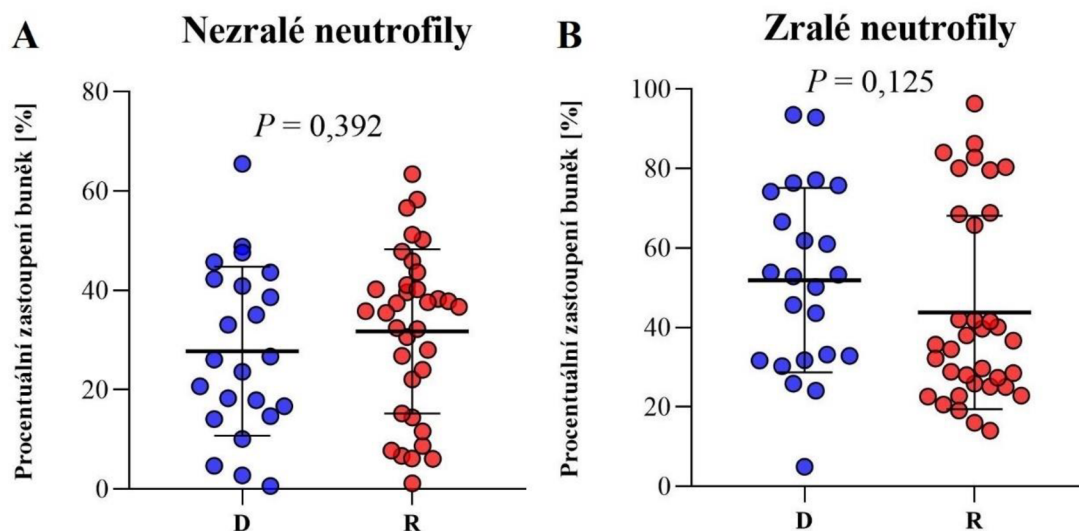
G-MDSC subpopulace vykazovala mírný trend vyššího výskytu u léčených pacientů (0,2 % $SD\pm 0,2$ % vs. 0,3 % $SD\pm 0,2$ %, $P=0,051$), zatímco M-MDSC subpopulace nevykazovala statisticky významné rozdíly mezi podskupinami pacientů (1,1 % $SD\pm 1,1$ % vs. 0,9 % $SD\pm 1,1$ %, $P=0,210$, viz Obrázek 19).



Obrázek 19: Zastoupení G-MDSC (A) a M-MDSC (B) subpopulace v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě (D – pacienti s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, R – pacienti s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem podstupující léčbu).

Zastoupení **nezralých neutrofilů** vyskytujících se v KD nevykazovalo statisticky významné rozdíly (27,7 % $SD\pm 16,3$ % vs. 31,7 % $SD\pm 16,6$ %, $P=0,392$) mezi studovanými

podskupinami pacientů a taktéž u zastoupení **zralých neutrofilů** nebyl pozorován statisticky významný rozdíl (51,9 % SD±23,6 % vs. 43,8 % SD±23,7, $P=0,125$, viz Obrázek 20).



Obrázek 20: Zastoupení nezralých (A) a zralých (B) neutrofilů v kostní dřeni pacientů při diagnóze a při léčbě (D – pacienti s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, R – pacienti s progredujícím či relabujícím mnohočetným myelomem podstupující léčbu).

6 Diskuse

MM je nádorové onemocnění charakteristické nekontrolovaným množením plazmatických buněk a obecně lze říct, že příčina onemocnění stále není známá. Klíčovou roli v patogenezi tohoto onemocnění hraje mikroprostředí kostní dřeně. Současný výzkum se v dané problematice snaží objasnit příčinu onemocnění a nalézt funkční prognostické markery, což by mohlo vést k přesnějšímu stanovení budoucí závažnosti onemocnění a zároveň k výběru vhodné léčby (Hanbali *et al.*, 2017). Tato práce se proto zaměřila na studium zastoupení myelomových a imunitních buněk v KD a PK u pacientů s mnohočetným myelomem.

V první části této bakalářské práce jsme se zaměřili na porovnání KD a PK z hlediska zastoupení základních imunitních populací: lymfocytů, monocytů a neutrofilů, významných buněčných složek mikroprostředí kostní dřeně u MM. Ze základních imunitních populací bylo nejméně monocytů, poté lymfocytů a nejpočetnější skupinou byly neutrofilové. V PK bylo zjištěno vyšší zastoupení lymfocytů a nižší zastoupení monocytů než v KD. Zastoupení neutrofilů se v naší kohortě pacientů nelišilo, ovšem Romano *et al.* (2020) ve své studii popsali asociaci mezi zvýšeným zastoupením neutrofilů v KD a progresí MM. Navíc poměr neutrofilů k lymfocytům určený při diagnóze MM nebo po 100 dnech od autologní transplantace kmenových buněk by mohl být prognostickým markerem u nově diagnostikovaných pacientů s MM (Romano *et al.*, 2017; Solmaz *et al.*, 2018).

V další části jsme se zaměřili na srovnání zastoupení myelomových buněk. Zastoupení myelomových buněk bylo vyšší v KD v porovnání s PK, což potvrdily i další studie (Henry *et al.*, 1996; Vij *et al.*, 2014). Vyšší výskyt myelomových buněk v KD je možné vysvětlit skutečností, že KD je primárním místem vzniku myelomových buněk. Myelomové buňky v PK jsou však dle Nowakowski *et al.* (2005) i důležitým markerem přežití pacientů a jejich zastoupení je u nově diagnostikovaných pacientů s MM nepřímo korelován s dobou přežití. Taktéž populace B-lymfocytů vykazovala vyšší zastoupení v KD v porovnání s PK. Klonální proliferaci myelomových buněk může být tedy způsobeno zvýšené zastoupení B-lymfocytů.

Dále jsme srovnávali zastoupení subpopulací imunitních buněk v KD a PK pacientů s MM. Významné rozdíly mezi KD a PK byly nalezeny u všech vybraných subpopulací T-lymfocytů. V KD bylo pozorováno vyšší zastoupení populace cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů než v PK. Ke stejnému zjištění dospěla i studie Zelle-Rieser *et al.* (2016). Dle stejných autorů však akumulované cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty v KD vykazují poruchu

funkčnosti. Je možné u nich pozorovat expresi molekul charakteristických pro vyčerpané (např. PD-1, CTLA-4) a senescentní (např. CD57) buňky. Pomocné CD4⁺ a regulační T-lymfocyty vykazovaly vyšší zastoupení v PK než v KD. Papadimitriou *et al.* (2020) identifikovali taktéž vyšší zastoupení pomocných CD4⁺ T-lymfocytů v PK, naopak regulační T-lymfocyty byly dle stejných autorů zvýšeny v KD.

V rámci subpopulací monocytů byly nalezeny významné rozdíly u klasických monocytů s vyšším zastoupením v PK než v KD. Zvýšené zastoupení monocytů v PK u pacientů s MM může inhibovat protinádorové imunitní reakce a zvýšit agresivitu onemocnění (Pessoa de Magalhaes *et al.*, 2013; Suyani *et al.*, 2013; Zahran *et al.*, 2021). Sponaas *et al.* (2015) popsali, že zastoupení neklasických monocytů v PK u pacientů s MM se zvyšuje s vážností onemocnění. V naší kohortě pacientů nebyly rozdíly v subpopulaci intermediárních a neklasických monocytů nalezeny.

Statisticky významné hodnoty byly zjištěny v rámci obou subpopulací G-MDSC a M-MDSC. U našich pacientů jsme identifikovali vyšší zastoupení obou subpopulací v KD oproti PK. Dle studie Ramachandran *et al.* (2013) dochází ke zvýšené akumulaci obou subpopulací MDSC v KD i PK oproti zdravým jedincům. Ke stejnému zjištění dospěla i studie Görgün *et al.* (2013). Stejní autoři zároveň stanovili imunosupresivní účinek MDSC v KD. MDSC inhibují proliferace cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů a NK buněk. Inhibice MDSC buněk představuje jednu z možných terapeutických strategií.

V následující části naší studie jsme provedli srovnání zastoupení myelomových buněk a imunitních subpopulací v KD u podskupin pacientů s nově diagnostikovaným MM a pacientů s relabujícím či progredujícím průběhem MM podstupujících léčbu. Zastoupení myelomových buněk a B-lymfocytů bylo mezi oběma podskupinami našich pacientů podobné, avšak Pessoa de Magalhaes *et al.* (2013) pozorovali vyšší zastoupení B-lymfocytů u nově diagnostikovaných pacientů. Rozdíly mohou být dány odlišnými klinickými obrazy pacientů a léčbou.

U pacientů podstupujících léčbu jsme dále našli vyšší zastoupení cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů a nižší zastoupení pomocných CD4⁺ T-lymfocytů než u nově diagnostikovaných pacientů. Ke stejným výsledkům dospěla i studie Barilà *et al.* (2021). Zjištěný nález může znamenat účinnost léčby, která prokazatelně ovlivňuje distribuci imunitních buněk u MM pacientů.

Dále jsme zkoumali zastoupení G-MDSC a M-MDSC v KD mezi podskupinami pacientů. V rámci G-MDSC subpopulace jsme identifikovali trend s vyšším výskytem u léčených pacientů než u nově diagnostikovaných pacientů. M-MDSC subpopulace

nevykazovala statisticky významné rozdíly mezi podskupinami pacientů. Studie Wang *et al.* (2015) naopak potvrdila pokles zastoupení obou MDSC subpopulací u pacientů podstupujících léčbu.

Naše studie prokázala, že charakterizace buněčného profilu kostní dřeně a periferní krve může přispět k porozumění vývoje onemocnění a pomoci tak pacientům, kteří by profitovali z individuálního přístupu. Naše nálezy bude nutné ověřit na větším souboru pacientů v asociaci s klinickými a laboratorními parametry. Studium změn v zastoupení buněčných populací v KD v různých stádiích onemocnění může významně přispět k pochopení imunitních mechanismů spojovaných s patogenezí MM.

7 Závěr

V rámci bakalářské práce bylo zkoumáno zastoupení myelomových buněk a imunitních subpopulací v kostní dřeni a periferní krvi pacientů s mnohočetným myelom pomocí metody průtokové cytometrie. Neutrofilly představovaly převažující populaci buněk imunitního systému, poté lymfocyty a nejméně ze všech hlavních populací imunitního systému bylo monocytů, jejichž počty se lišily ve srovnání periferní krve a kostní dřene pacientů. V kostní dřeni bylo zjištěno vyšší zastoupení myelomových buněk, B-lymfocytů, cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů, G-MDSC a M-MDSC než v periferní krvi, kde bylo naopak zjištěno vyšší zastoupení pomocných CD4⁺ a regulačních T-lymfocytů a klasických monocytů.

Další část bakalářské práce se zaměřila na srovnání zastoupení myelomových a imunitních buněk v kostní dřeni u podskupin pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem a pacientů s progredujícím či relabujícím onemocněním podstupujících léčbu. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny v subpopulaci T-lymfocytů, konkrétně v zastoupení cytotoxických CD8⁺ a pomocných CD4⁺ T-lymfocytů. Cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty se více vyskytovaly u léčených pacientů, naopak pomocné CD4⁺ T-lymfocyty více u nově diagnostikovaných pacientů.

Ačkoli je potřeba naše nálezy potvrdit na větším počtu pacientů a korelovat s dalšími klinickými parametry, i přesto mohou pozorované rozdíly v zastoupení imunitních buněk v kostní dřeni a periferní krvi pomoci lépe popsat vývoj onemocnění a stanovit vhodnou léčebnou strategii pacientům s mnohočetným myelomem.

8 Seznam použité literatury

- Abe, M., Hiura, K., Wilde, J., Moriyama, K., Hashimoto, T., Ozaki, S., Wakatsuki, S., Kosaka, M., Kido, S., Inoue, D., & Matsumoto, T. (2002): Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood*, 100(6): 2195–2202.
- Adam, Z., Vorlíček, Jiří, Vaniček, J. (2002): Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. Grada.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2017): Flow cytometry: Basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2): 163–176.
- Alsayed, Y., Ngo, H., Runnels, J., Leleu, X., Singha, U. K., Pitsillides, C. M., Spencer, J. A., Kimlinger, T., Ghobrial, J. M., Jia, X., Lu, G., Timm, M., Kumar, A., Côté, D., Veilleux, I., Hedin, K. E., Roodman, G. D., Witzig, T. E., Kung, A. L., Ghobrial, I. M. (2007): Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)–dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*, 109(7): 2708–2717.
- Altieri A, Chen B, Bermejo JL, Castro F, Hemminki K. (2006): Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma. *Eur J Cancer*, 42(11): 1661-1670.
- Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T., Heinrich, P. C. (1987): Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Letters*, 221(1): 18–22.
- Bansal, R., Rakshit, S., Kumar, S. (2021): Extramedullary disease in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 11(9): 161.
- Barilà, G., Pavan, L., Vedovato, S., Berno, T., Lo Schirico, M., Arangio Febbo, M., Teramo, A., Calabretto, G., Vicenzetto, C., Gasparini, V. R., Fregnani, A., Manni, S., Trimarco, V., Carraro, S., Facco, M., Piazza, F., Semenzato, G., Zambello, R. (2021): Treatment Induced Cytotoxic T-Cell Modulation in Multiple Myeloma Patients. *Frontiers in Oncology*, 11: 682658.
- Bataille R, Chappard D, Marcelli C, Rossi JF, Dessauw P, Baldet P, Sany J, Alexandre C. (1990): Osteoblast stimulation in multiple myeloma lacking lytic bone lesions. *British Journal of Haematology*, 76(4): 484-487.
- Bataille, R., Chappard, D., Marcelli, C., Dessauw, P., Baldet, P., Sany, J., Alexandre, C. (1991): Recruitment of new osteoblasts and osteoclasts is the earliest critical event

- in the pathogenesis of human multiple myeloma. *The Journal of clinical investigation*, 88(1): 62–66.
- Becker, N., Moehler, T., Goldschmidt, H. (2011): *Epidemiology of Multiple Myeloma*, Springer Berlin Heidelberg.
- Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A., Butcher, E. C. (1993): Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*, 74(1): 185–195.
- Beyer, M., Kochanek, M., Giese, T., Endl, E., Weihrauch, M. R., Knolle, P. A., Classen, S., Schultze, J. L. (2006): In vivo peripheral expansion of naive CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*, 107(10): 3940–3949.
- Bhat, S., Viswanathan, P., Chandanala, S., Prasanna, S. J., Seetharam, R. N. (2021): Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Scientific Reports*, 11(1): 3403.
- Blasi, A., Martino, C., Balducci, L., Saldarelli, M., Soleti, A., Navone, S. E., Canzi, L., Cristini, S., Invernici, G., Parati, E. A., Alessandri, G. (2011): Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vascular Cell*, 3(1): 5.
- Boyle, E. M., Davies, F. E., Leleu, X., Morgan, G. J. (2014). Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica*, 99(4): 605–612.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., & Gabrilovich, D. I. (2016): Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7(1): 12150.
- Brown, R. D., Yuen, E., Nelson, M., Gibson, J., Joshua, D. (1997): The prognostic significance of T cell receptor beta gene rearrangements and idiotype-reactive T cells in multiple myeloma. *Leukemia*, 11(8): 1312–1317.
- Burgess, T. L., Qian, Y., Kaufman, S., Ring, B. D., Van, G., Capparelli, C., Kelley, M., Hsu, H., Boyle, W. J., Dunstan, C. R., Hu, S., Lacey, D. L. (1999): The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. *Journal of Cell Biology*, 145(3): 527–538.

- Burke, B., Lewis, C. E. (2002): *The macrophage* (2nd ed), Oxford University Press.
- Castaneda, O., Baz, R. (2019): Multiple Myeloma Genomics – A Concise Review. *Acta Medica Academica*, 48(1): 57.
- Claeys, L., Bravenboer, N., Eekhoff, E. M. W., & Micha, D. (2020): Human Fibroblasts as a Model for the Study of Bone Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 11: 394.
- Corre, J., Munshi, N., Avet-Loiseau, H. (2015): Genetics of multiple myeloma: Another heterogeneity level? *Blood*, 125(12): 1870–1876.
- Dylevský, I. (2009): *Funkční anatomie*. Grada, Praha.
- Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., Lobb, R. R. (1990): VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, 60(4): 577–584.
- Fairfield, H., Falank, C., Avery, L., Reagan, M. R. (2016): Multiple myeloma in the marrow: Pathogenesis and treatments: Understanding the pathogenesis of multiple myeloma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1364(1): 32–51.
- Fazeli, P. K., Horowitz, M. C., MacDougald, O. A., Scheller, E. L., Rodeheffer, M. S., Rosen, C. J., Klibanski, A. (2013): Marrow Fat and Bone—New Perspectives. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(3): 935–945.
- Fujimoto, S., Greene, M., Schon, A. H. (1975): Immunosuppressor T Cells in Tumor Bearing Hosts. *Immunological Communications*, 4(3): 201–217.
- Gabrilovich, D. I., Nagaraj, S. (2009): Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(3): 162–174.
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Bronte, V. (2012): Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*, 12(4): 253–268.
- Gershon, R. K., Kondo, K. (1970): Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5): 723–737.
- Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M., Barillé, S. (2001): Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*, 98(13): 3527–3533.
- Givan, A. L. (2013): *Flow Cytometry First Principles*. John Wiley & Sons. New Hampshire.
- Görgün, G. T., Whitehill, G., Anderson, J. L., Hideshima, T., Maguire, C., Laubach, J., Raje, N., Munshi, N. C., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2013): Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*, 121(15): 2975–2987.

- Gupta, D., Treon, S., Shima, Y., Hideshima, T., Podar, K., Tai, Y., Lin, B., Lentzsch, S., Davies, F., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P., Ralph, P., Wu, L., Payvandi, F., Muller, G., Stirling, D., Anderson, K. (2001): Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: Therapeutic applications. *Leukemia*, 15(12): 1950–1961.
- Gupta, R., Ganeshan, P., Hakim, M., Verma, R., Sharma, A., & Kumar, L. (2011): Significantly reduced regulatory T cell population in patients with untreated multiple myeloma. *Leukemia Research*, 35(7): 874–878.
- Hanbali, A., Hassanein, M., Rasheed, W., Aljurf, M., Alsharif, F. (2017): The Evolution of Prognostic Factors in Multiple Myeloma. *Advances in Hematology*, 1–11.
- Hata, H., Xiao, H., Petrucci, M., Woodliff, J., Chang, R., Epstein, J. (1993): Interleukin-6 gene expression in multiple myeloma: A characteristic of immature tumor cells. *Blood*, 81(12): 3357–3364.
- Heimberger, A. B., Abou-Ghazal, M., Reina-Ortiz, C., Yang, D. S., Sun, W., Qiao, W., Hiraoka, N., Fuller, G. N. (2008): Incidence and Prognostic Impact of FoxP3⁺ Regulatory T Cells in Human Gliomas. *Clinical Cancer Research*, 14(16): 5166–5172.
- Henry, J. M., Sykes, P. J., Brisco, M. J., Bik To, L., Juttner, C. A., Morley, A. A. (1996): Comparison of myeloma cell contamination of bone marrow and peripheral blood stem cell harvests. *British Journal of Haematology*, 92(3): 614–619.
- Hu, Y., Chen, W., Wang, J. (2019): Progress in the identification of gene mutations involved in multiple myeloma. *OncoTargets and Therapy*, Volume 12: 4075–4080.
- Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A. C., Harview, C. L., Brunet, J.-P., Ahmann, G. J., Adli, M., Anderson, K. C., Ardlie, K. G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P. L., Bernstein, B. E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S. B., Golub, T. R. (2011): Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471(7339): 467–472.
- Charliński, G., Jurczynszyn, A. (2020): Multiple myeloma – 2020 update on diagnosis and management. *Nowotwory. Journal of Oncology*, 70(5): 173-183.
- Chen, H., Li, M., Sanchez, E., Soof, C. M., Bujarski, S., Ng, N., Cao, J., Hekmati, T., Zahab, B., Nosrati, J. D., Wen, M., Wang, C. S., Tang, G., Xu, N., Spektor, T. M., Berenson, J. R. (2020): JAK1/2 pathway inhibition suppresses M2 polarization and overcomes resistance of myeloma to lenalidomide by reducing TRIB1, MUC1,

- CD44, CXCL12, and CXCR4 expression. *British Journal of Haematology*, 188(2): 283–294.
- Chesi, M., Bergsagel, P. L. (2015): Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37: 108–114.
- Indrák, K., Alušík, Š., Lejsková, M., Černá, M., Divoký, V., Faber, E., Heczko, M. (2006): *Hematologie*. Triton, Praha.
- Jílek, P. (2014): *Imunologie: Stručně, jasně, přehledně*. Grada, Praha.
- Jílek, P. (2019): *Imunologie: Stručně, jasně, přehledně*. Grada, Praha.
- Joshua, D. E., Brown, R. D., Ho, P. J., Gibson, J. (2008): Regulatory T Cells and Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma and Myeloma*, 8(5): 283–286.
- Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H. (1988): Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*, 332(6159): 83–85.
- Klein, B., Zhang, X., Jourdan, M., Content, J., Houssiau, F., Aarden, L., Piechaczyk, M., Bataille, R. (1989): Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 73(2): 517–526.
- Koller, M. R., Palsson, B. O. (1993): Review: Tissue engineering: Reconstitution of human hematopoiesis ex vivo. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(8): 909–930.
- Krejčí, D., Pehalová, L., Talábová, A., Pokorová, K., Katinová, I., Mužík, J., Dušek, L. (2018): Novotvary 2018 – Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice. 345.
- Kumar, S. K., Rajkumar, S. V. (2018): The multiple myelomas—Current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(7).
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.-X., Kaufman, S., Sarosi, I., Boyle, W. J. (1998): Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, 93(2): 165–176.
- Li, Y., Zheng, Y., Li, T., Wang, Q., Qian, J., Lu, Y., Zhang, M., Bi, E., Yang, M., Reu, F., Yi, Q., Cai, Z. (2015): Chemokines CCL2, 3, 14 stimulate macrophage bone marrow homing, proliferation, and polarization in multiple myeloma. *Oncotarget*, 6(27): 24218–24229.
- Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H.-G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., Linehan, D. C. (2002):

- Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *The Journal of Immunology*, 169(5): 2756–2761.
- Lokhorst, H., Lamme, T., de Smet, M., Klein, S., de Weger, R., van Oers, R., Bloem, A. (1994): Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood*, 84(7): 2269–2277.
- Möller, C., Strömberg, T., Juremalm, M., Nilsson, K., Nilsson, G. (2003): Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia*, 17(1): 203–210.
- Neri, P., Ren, L., Azab, A. K., Brentnall, M., Gratton, K., Klimowicz, A. C., Lin, C., Duggan, P., Tassone, P., Mansoor, A., Stewart, D. A., Boise, L. H., Ghobrial, I. M., Bahlis, N. J. (2011): Integrin $\beta 7$ -mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood*, 117(23): 6202–6213.
- Nowakowski, G. S., Witzig, T. E., Dingli, D., Tracz, M. J., Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Lust, J. A., Dispenzieri, A., Greipp, P. R., Kyle, R. A., Rajkumar, S. V. (2005): Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 106(7): 2276–2279.
- Ormandy, L. A., Hillemann, T., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Greten, T. F., Korangy, F. (2005): Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 65(6): 2457–2464.
- Ormerod, M. G. (2000): *Flow cytometry: a practical approach*. Third edition. Oxford: Oxford University Press, Oxford.
- Oyajobi, B. O. (2007): Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Research & Therapy*, 9: S4.
- Padala, S. A., Barsouk, A., Barsouk, A., Rawla, P., Vakiti, A., Kolhe, R., Kota, V., Ajebo, G. H. (2021): Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Medical Sciences*, 9(1): 3.
- Paget, S. (1889): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Reviews*, 8(2): 98–101.
- Papadimitriou, K., Tsakirakis, N., Malandrakis, P., Vitsos, P., Metousis, A., Orogas-Stavrou, N., Ntanasis-Stathopoulos, I., Kanellias, N., Eleutherakis-Papaiakovou, E., Pothos, P., Fotiou, D., Gavriatopoulou, M., Kastritis, E., Dimopoulos, M.-A., Terpos, E., Tsitsilonis, O. E., Kostopoulos, I. V. (2020): Deep Phenotyping Reveals

- Distinct Immune Signatures Correlating with Prognostication, Treatment Responses, and MRD Status in Multiple Myeloma. *Cancers*, 12(11): 3245.
- Peakman, M., Vergani, D. (2009): *Basic and clinical immunology*. Churchill Livingstone, London.
- Penka, M., Tesařová, E. (2011): *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Grada, Praha.
- Pessoa de Magalhaes, R. J., Vidriales, M.-B., Paiva, B., Fernandez-Gimenez, C., Garcia-Sanz, R., Mateos, M.-V., Gutierrez, N. C., Lecomte, Q., Blanco, J. F., Hernandez, J., de las Heras, N., Martinez-Lopez, J., Roig, M., Costa, E. S., Ocio, E. M., Perez-Andres, M., Maiolino, A., Nucci, M., De La Rubia, J. (2013): Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*, 98(1): 79–86.
- Podar, K., Chauhan, D., Anderson, K. C. (2009): Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia*, 23(1): 10–24.
- Pospíšilová, Š., Dvořáková, D., Mayer, J. (2013). *Molekulární hematologie*. Galén, Praha.
- Prabhala, R. H., Pelluru, D., Fulciniti, M., Prabhala, H. K., Nanjappa, P., Song, W., Pai, C., Amin, S., Tai, Y.-T., Richardson, P. G., Ghobrial, I. M., Treon, S. P., Daley, J. F., Anderson, K. C., Kutok, J. L., Munshi, N. C. (2010): Elevated IL-17 produced by Th17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood*, 115(26): 5385–5392.
- Puglisi, F., Parrinello, N. L., Giallongo, C., Cambria, D., Camiolo, G., Bellofiore, C., Conticello, C., Fabro, V. D., Leotta, V., Markovic, U., Sapienza, G., Barbato, A., Scalese, S., Tibullo, D., Brundo, M. V., Palumbo, G. A., Romano, F. D., Romano, A. (2019): Plasticity of High-Density Neutrophils in Multiple Myeloma is Associated with Increased Autophagy via STAT3. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14): 3548.
- Ramachandran, I. R., Martner, A., Pisklakova, A., Condamine, T., Chase, T., Vogl, T., Roth, J., Gabrilovich, D., Nefedova, Y. (2013): Myeloid-Derived Suppressor Cells Regulate Growth of Multiple Myeloma by Inhibiting T Cells in Bone Marrow. *The Journal of Immunology*, 190(7): 3815–3823.
- Raza, Y., Salman, H., Luberto, C. (2021): Sphingolipids in Hematopoiesis: Exploring Their Role in Lineage Commitment. *Cells*, 10(10): 2507.
- Romano, A., Parrinello, N., Cerchione, C., Consoli L. M., Parisi, M., Calafiore, V., Martino, E., Conticello, C., Di Raimondo, F., Palumbo, G. A. (2017): The NLR and LMR

- ratio in newly diagnosed MM patients treated upfront with novel agents. *Blood Cancer Journal*, 7(12): 649.
- Romano, A., Parrinello, N. L., Simeon, V., Puglisi, F., La Cava, P., Bellofiore, C., Giallongo, C., Camiolo, G., D'Auria, F., Grieco, V., Larocca, F., Barbato, A., Cambria, D., La Spina, E., Tibullo, D., Palumbo, G. A., Conticello, C., Musto, P., Di Raimondo, F. (2020): High-density neutrophils in MGUS and multiple myeloma are dysfunctional and immune-suppressive due to increased STAT3 downstream signaling. *Scientific Reports*, 10(1): 1983.
- Roux, S., Meignin, V., Quillard, J., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Feraud, J.-P., Milgrom, E., Mariette, X. (2002): RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 117(1): 86–92.
- Sabatini, F., Petecchia, L., Tavian, M., de Villeroché, V. J., Rossi, G. A., Brouty-Boyé, D. (2005): Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Laboratory Investigation*, 85(8): 962–971.
- Sanz-Rodríguez, F. (2001): Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*, 97(2): 346-351.
- Schofield, R. (1978): The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1–2): 7–25.
- Snick, J. V., Cayphas, S., Szikora, J. P., Renauld, J. C., Roost, E. V., Boon, T., Sirnpson, R. J. (1988): cDNA cloning of murine interleukin-HP1: Homology with human interleukin 6. *European Journal of Immunology*, 18(2): 193–197.
- Solmaz, M. S., Acar, C., Olgun, A., Acar, A., Seyhanli, A., Taskiran, E., Sevindik, O. G., Alacacioglu, I., Piskin, O., Ozcan, M. A., Demirkan, F., Undar, B., Ozsan, G. H. (2018): Can Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Monocyte-to-Lymphocyte Ratio, and Platelet-to-Lymphocyte Ratio at Day +100 be used as a prognostic marker in Multiple Myeloma patients with autologous transplantation? *Clinical Transplantation*, 32(9): 13359.
- Sponaas, A. M., Moen, S. H., Liabakk, N. B., Feyzi, E., Holien, T., Kyam, S., Groseth, L. A. G., Stordal, B., Buenel, G., Espevik, T., Waage, A., Standal, T., Sundan, A. (2015): The proportion of CD16⁺ CD14^{dim} monocytes increases with tumor cell

- load in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Immunity, Inflammation and Disease*, 3(2): 94–102.
- Sumpio, B. E., Timothy Riley, J., Dardik, A. (2002): Cells in focus: Endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(12): 1508–1512.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): 209–249.
- Suyani, E., Sucak, G. T, Akyurek, N., Sahin, S., Baysal, N. A., Yagci, M., Haznedar, R. (2013): Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma. *Annals of Hematology*, 92(5): 669–677.
- Špička, I., Bartůňková, J., Campr, V., Danzing, V., Danzigová, Z., Gregora, E., Hachová, L., Hořejš, J., Jarolímková, E., Karban, J., Klener, J., Kubeš, J., Mazanec, R., Merta, M., & Michalová, K. (2005): Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Galén, Praha.
- Terpos, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., Gavriatopoulou, M., Dimopoulos, M. A. (2018): Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: From bench to bedside. *Blood Cancer Journal*, 8(1): 7.
- Turel, K. (1998): Expression of the cell adhesion molecule E-cadherin by the human bone marrow stromal cells and its probable role in CD34⁺ stem cell adhesion. *Cell Biology International*, 22(9–10): 641–648.
- Ugurlu, B., Karaoz, E. (2020): Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta Histochemica*, 122(8): 151634.
- Uchiyama, H., Barut, B., Mohrbacher, A., Chauhan, D., Anderson, K. (1993): Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*, 82(12): 3712–3720.
- Urashima, M., Chauhan, D., Uchiyama, H., Freeman, G., & Anderson, K. (1995): CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma. *Blood*, 85(7): 1903–1912.
- Vanderkerken, K., Greef, C. D., Asosingh, K., Arteta, B., Veerman, M. D., Broek, I. V., Riet, I. V., Kobayashi, M., Smedsrod, B., Camp, B. V. (2000): Selective initial in vivo homing pattern of 5T2 multiple myeloma cells in the C57BL/KalwRij mouse. *British Journal of Cancer*, 82(4): 953–959.

- Vij, R., Mazumder, A., Klinger, M., O’Dea, D., Paasch, J., Martin, T., Weng, L., Park, J., Fiala, M., Faham, M., Wolf, J. (2014): Deep Sequencing Reveals Myeloma Cells in Peripheral Blood in Majority of Multiple Myeloma Patients. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 14(2): 131–139.
- Wang, Z., Zhang, L., Wang, H., Xiong, S., Li, Y., Tao, Q., Xiao, W., Qin, H., Wang, Y., Zhai, Z. (2015): Tumor-induced CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(3): 389–399.
- Wayner, E. A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M. J., McDonald, J. A., Carter, W. G. (1989): Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *Journal of Cell Biology*, 109(3): 1321–1330.
- Zahran, A. M., Nafady-Hego, H., Moeen, S. M., Eltyb, H. A., Wahman, M. M., Nafady, A. (2021): Higher proportion of non-classical and intermediate monocytes in newly diagnosed multiple myeloma patients in Egypt: A possible prognostic marker. *African Journal of Laboratory Medicine*, 10(1).
- Zelle-Rieser, C., Thangavadivel, S., Biedermann, R., Brunner, A., Stoitzner, P., Willenbacher, E., Greil, R., Jöhrer, K. (2016): T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1): 116.
- Zhang, X., Klein, B., Bataille, R. (1989): Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood*, 74(1): 11–13.
- Zheng, Y., Cai, Z., Wang, S., Zhang, X., Qian, J., Hong, S., Li, H., Wang, M., Yang, J., Yi, Q. (2009): Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood*, 114(17): 3625–3628.

Internetové zdroje

- AlphaTec. [online] [navštíveno 16. 4. 2022] Dostupné z
<https://www.alphatecsystems.com/processing-procedures/nac-pac-ea3-processing-procedure/>
- Brand group. [online] [navštíveno 16. 4. 2022] Dostupné z
<https://www.brand-group.net/cn/pipetting-how-to-select-the-right-pipette>
- Creative Diagnostics. [online] [navštíveno 21. 12. 2021] Dostupné z
<https://www.creative-diagnostics.com/flow-cytometry-guide.htm>
- Diffrence between [online] [navštíveno 3. 12. 2021] Dostupné z
<https://www.differencebetween.com/difference-between-hematopoiesis-and-vs-erythropoiesis/>
- Idnes. [online] [navštíveno 16. 4. 2022] Dostupné z
https://www.idnes.cz/zlin/zpravy/potrubni-posta-ve-zlinske-nemocnici.A170815_345347_zlin-zpravy_ras/foto
- International Agency for Research on Cancer. [online] [navštíveno 15. 2. 2022] Dostupné z
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/35-Multiple-myeloma-fact-sheet.pdf>
- IStock. [online] [navštíveno 16. 4. 2022] Dostupné z
<https://www.istockphoto.com/cs/search/2/image?phrase=centrifuge+machine>
- Labome. [online] [navštíveno 22. 12. 2021] Dostupné z
<https://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
- Mayo Clinic. [online] [navštíveno 15. 9. 2021] Dostupné z
<https://www.mayoclinic.org/medical-professionals/cancer/news/msmart-a-clear-and-simple-guide-for-treating-patients-with-multiple-myeloma/mqc-20506750>
- Radiology Key. [online] [navštíveno 18. 11. 2021] Dostupné z
<https://radiologykey.com/%CE%BDormal-bone-marrow-anatomy-function-conversion-and-reconversion/>
- Rehabilitace.info. [online] [navštíveno 16. 4. 2022] Dostupné z
<https://www.rehabilitace.info/zdravotni/odber-a-vysetreni-kostni-drene-kdy-je-potreba-a-co-je-dobre-vedet/>
- Shsmu. [online] [navštíveno 16. 4. 2022] Dostupné z
<https://www.shsmu.edu.cn/sii/info/1176/1306.htm>
- Standard of care. [online] [navštíveno 16. 4. 2022] Dostupné z
<https://standardofcare.com/paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria-pnh/>

Vecteezy. [online] [navštíveno 16. 4. 2022] Dostupné z

<https://es.vecteezy.com/arte-vectorial/834470-reloj-de-arena-icno-en-circulo-rojo>