

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

Pavína Mrázová

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

TESTOVÁNÍ CHEMOSENZITIVITY LEUKEMICKÝCH BUŇEK

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Monika Holubová PhD.

PLZEŇ 2018

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne: 29. 3. 2018

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování:

Děkuji Mgr. Monice Holubové, PhD za odborné vedení práce, vstřícný přístup, poskytování cenných rad a materiálních podkladů. Dále bych chtěla poděkovat Doc. MUDr. Danielu Lysákovi, PhD za umožnění provedení praktické části práce v prostorách laboratoří Hematologicko-onkologického oddělení a panu Bc. Martinovi Lebovi za konzultaci a pomoc při statistickém zpracování výsledků.

ABSTRAKT

Příjmení jméno : Mrázová Pavlína

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Testování chemosenzitivity leukemických buněk

Vedoucí práce: Mgr. Monika Holubová PhD.

Počet stran: číslované, nečíslované (tabulky, grafy): 37 číslovaných, 22 nečíslovaných

Počet příloh: 3

Počet titulů použité literatury: 46

Klíčová slova: chemosenzitivita, chemoterapie, CLL, metabolická aktivita

Chronická B-lymfocytární leukémie (B-CLL) je onemocnění s klonální proliferací B-lymfocytů. Standardní léčbou je chemoterapie, na kterou však mohou pacienti reagovat různě.

Cílem této práce bylo zjistit chemosenzitivitu leukemických buněk na dva druhy testovaných chemoterapeutik.

CLL buňky byly kultivovány v médiu s aktivačními látkami (Pokeweed, PMA, IL-2, DSP30) 72 hodin. Následovala aplikace chemoterapeutik fludarabin (1 μ M; 2 μ M) a cytarabin (1 μ M; 5 μ M; 10 μ M). Buňky byly kultivovány dalších 48hod. Po inkubaci byla stanovena metabolická aktivita a viabilita buněk.

Největší účinek jsme zaznamenali u cytarabinu o koncentracích 5 μ M a 10 μ M, kde došlo k poklesu metabolické aktivity o 18,2% resp. 21,1% ($p < 0,05$). U obou zmíněných koncentrací došlo také k lehkému nárůstu mrtvých buněk. Ostatní aplikace nevykazovaly významné změny.

Pacienti mohou reagovat na aktivační látky i chemoterapii rozdílně. *In vitro* testování může v budoucnu sloužit jako predikce reakce *in vivo*, ale vyžaduje důkladnější stanovení více parametrů.

ABSTRAKT

Surname and name: Mrázová Pavlína

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: The testing of chemosensitivity of leukemic cells

Consultant: Mgr. Monika Holubová PhD.

Number of pages: 37 numbered, 22 unnumbered

Number of appendices: 3

Number of literature items used: 46

Keywords: chemosensitivity, chemotherapy, CLL, metabolic activity

Chronic B-lymphocytic leukaemia (B-CLL) is disease with clonal proliferation of B-lymphocytes. Standard treatment is chemotherapy, but the patients can respond differently.

The aim of this work was evaluation of CLL chemosensitivity for two chemotherapeutic agents.

CLL cells were cultured with activation reagents (Pokeweed, PMA, IL-2, DSP30) for 72h. Then, chemotherapeutics fludarabine (1 μ M; 2 μ M) and cytarabine (1 μ M; 5 μ M; 10 μ M) were applied for next 48h. Metabolic activity and viability were evaluated.

The greatest effect was observed in cytarabine at concentrations of 5 μ M and 10 μ M, where the metabolic activity decreased by 18.2%, respectively 21.1% ($p < 0.05$). Both these concentrations also resulted in a slight increase in dead cells. Other applications didn't show significant changes.

We found that individual patients responded to both activation and chemotherapy differently. *In vitro* testing may serve as a prediction of *in vivo* reaction but requires more detailed study of several parameters.

Obsah

Úvod	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1 Buňka jako stavební kámen organismů	11
1.1 Kostní dřevě a vývoj krevních elementů	11
1.1.1 Vývoj krevních buněk	11
1.1.2 Rozlišení typů lymfoidních buněk	12
1.1.3 CD klasifikace	13
2 Hematologické malignity	14
2.1 Dělení hematologických malignit-myeloidní, lymfoidní, chronické a akutní	14
2.2 B-lymfocytární malignity	14
2.2.1 Vývoj B-lymfocytů	15
2.2.2 Imunoglobuliny	15
2.3 Malignity z B-lymfocytů	16
2.3.1 Folikulární lymfom	17
2.3.2 DLBCL	17
2.3.3 Vlasatobuněčná leukemie	18
2.3.4 Lymfom z plášťových buněk	18
2.4 Chronická B-lymfocytární leukemie	19
2.4.1 Příčiny, příznaky a průběh onemocnění	19
2.4.2 Diagnostika a vyšetření	19
2.4.3 Morfologické vyšetření kostní dřevě	20
2.4.4 Cytometrické vyšetření	20
2.4.5 Genetická vyšetření	21
2.4.6 Podskupiny na základ genetických mutací	21
3 Chemoterapie	22
3.1 Význam chemoterapie v léčbě nádorů	22
3.1.1 Faktory ovlivňující účinnost chemoterapie	23
3.1.2 Fludarabin a cytarabin	23
3.1.3 Nežádoucí účinky chemoterapie	24
3.1.4 Další léčebné postupy	25

PRAKTICKÁ ČÁST	26
4 Cíl výzkumu a výzkumný vzorek	26
4.1 Hypotéza	26
4.2 Cíl práce	26
4.3 Soubor pacientů	26
5 Metody výzkumu	27
5.1 Materiál a reagentie	27
5.2 Izolace mononukleárních buněk	28
5.3 Magnetická izolace CLL buněk	28
5.4 Kultivace buněk a zamrazení buněk	28
5.5 Rozmrazení buněk	29
5.6 Aktivace buněk	29
5.7 Testování chemoterapie	30
5.8 Metabolická aktivita buněk-mechanismus Alamar Blue	30
5.9 Stanovení čistoty a zastoupení mrtvých buněk – průtoková cytometrie	31
5.10 Zpracování dat – statistika	31
6 Výsledky	32
6.1 Izolace a kultivace buněk	32
6.2 Aktivace buněk po rozmrazení	32
6.3 Testování chemosenzibilizace	40
7 Diskuze	44
8 Závěr	46
SEZNAM LITERATURY	47
PŘÍLOHY	52
SEZNAM ZKRATEK	54
SEZNAM OBRÁZKŮ	56
SEZNAM TABULEK:	57
SEZNAM GRAFŮ	58
SEZNAM PŘÍLOH	59

Úvod

Maligní hematologické malignity vznikají onemocněním krevních buněk. Podle průběhu je lze dělit na chronické a akutní. Mohou vznikat na různých úrovních diferenciaci buňky.

Chronická lymfocytární leukemie je maligní onemocnění krevních buněk, kdy se lymfocyty kumulují v krvi, kostní dřeni, lymfatických orgánech a uzlinách. Toto onemocnění má pomalý průběh a může probíhat po mnoho let. Prognóza pacienta je závislá na vzniklé mutaci buněk. Jde o jedno z nejčastějších onemocnění krve, které však díky dále se rozvíjející se terapii nebývá často fatální. I přes pokroky v terapii se však najdou pacienti, kteří vyžadují pokročilejší možnosti terapie založené například na imunoterapii v kombinaci se standardní léčbou.

Standardní léčbou chronické lymfocytární leukemie je chemoterapie. Z klinických aplikací je známo, že každý pacient může na stejnou chemoterapie reagovat různě, a stejně tak se vyskytují pacienti zcela rezistentní na určité typy chemoterapie. Testování vlivu chemoterapeutik na buňky *in vitro* systému není v současnosti běžnou praxí, i když testování a výběr vhodného terapeutika by mohl pomoci při výběru nejvhodnější terapie. Zároveň může být nízkodávková chemoterapie použita pro ovlivnění (zviditelnění) leukemických buněk pro imunitní systém a sloužit jako chemosenzibilizace nádorových buněk pro buněčnou imunoterapii.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Buňka jako stavební kámen organismů

Buňka je základní stavební jednotkou všech živých organismů. Je schopna růstu, reprodukce, mezibuněčné komunikace, tvorby energie i metabolické aktivity. Každá buňka organismu nese stejnou genetickou informaci, genová exprese je však u různých buněk jiná a slouží ke specializaci buňky v organismu.

Pro obor hemato-onkologie je buňka hlavním předmětem zkoumání. V našem případě jde hlavně o leukocyty, které za normálních okolností plní funkci imunitního dohledu. Ovšem při narušení regulace genové exprese mohou vznikat maligně transformované buňky, které organismus ohrožují a mohou zapříčinit jeho smrt. Tyto buňky vznikají v kostní dřeni (Pospíšilová, Dvořáková, Mayer, 2013, str. 70).

1.1 Kostní dřeh a vývoj krevních elementů

Kostní dřeh je orgán, ve kterém se tvoří všechny typy krvinek. Každý den vznikají v kostní dřeni miliardy nových krevních destiček, červených a bílých krvinek. Ty nahrazují staré a opotřebované krvinky v krevním systému. Obnova je velmi důležitá pro správnou funkci buněk. Staré opotřebované buňky podléhají buněčné smrti, apoptóze. Apoptóza a obnova jsou ve fyziologickém stavu vždy v rovnováze.

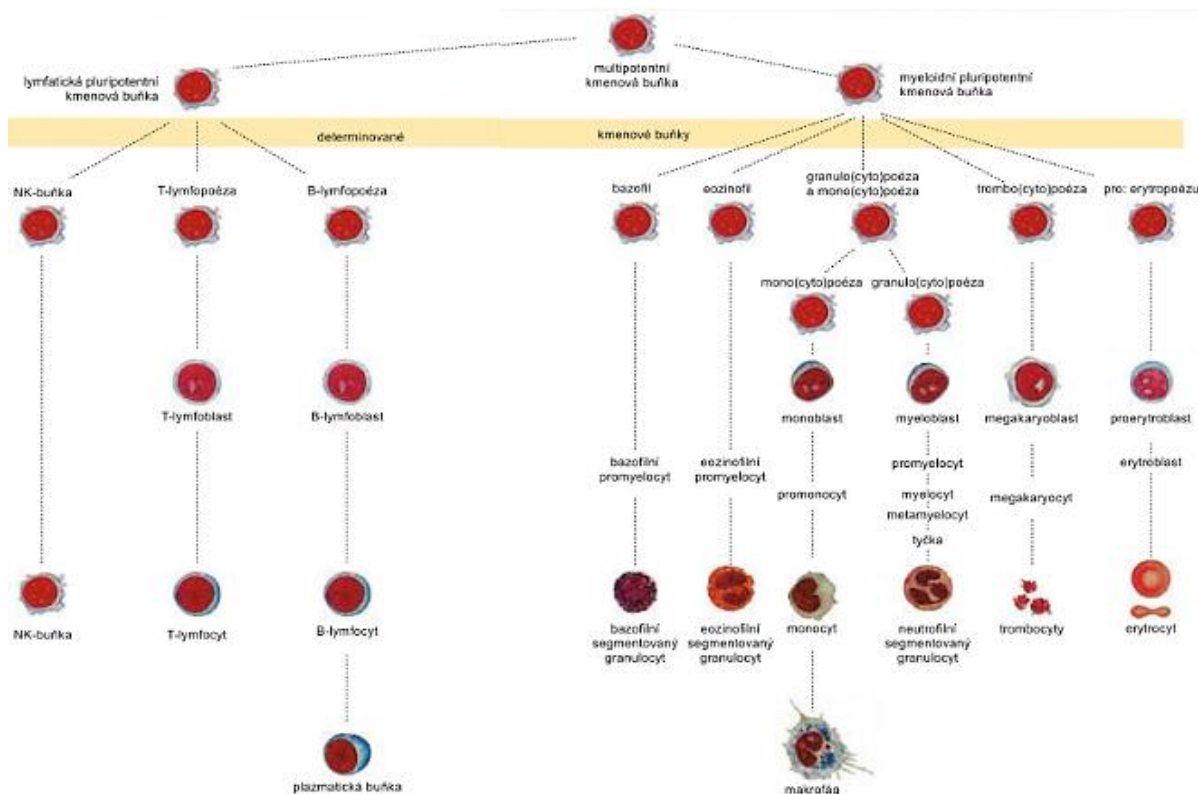
Krev je tělní tekutina, kterou tvoří nebuněčná (plazma) i buněčná složka složená z červených krvinek-erytrocytů, bílých krvinek-leukocytů a krevních destiček-trombocytů. Při onemocnění se často zastoupení těchto buněk mění. Pokud se hodnoty červených krvinek sníží, mluvíme o anemii. Když dojde ke snížení bílé řady krvinek, nastává leukopenie. Ta vzniká například při infekcích či při nežádoucím působení léků, jako jsou například chemoterapeutika. Pokud se ale hodnota leukocytů naopak zvýší, mluvíme o leukocytóze. Její vznik je zapříčiněn chronickou infekcí či patologickým množением buněk. Často dochází i ke snížení počtu krevních destiček, pak vzniká trombocytopenie.

1.1.1 Vývoj krevních buněk

Všechny krevní buňky se vyvíjejí v kostní dřeni z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky, která se může sama obnovovat. Dalším vývojovým stádiem v kostní dřeni je multipotentní buňka, která se dělí dvojí cestou na lymfoidní a myeloidní prekurzory.

Tyto cesty jsou na sobě zcela nezávislé. Z multipotentních buněk dále vznikají buňky progenitorové, z kterých se nakonec vyvíjejí prekurzorové buňky až finální stádia buněk, které se dále dělí. Multipotentní kmenové buňky mají na svém povrchu růstové faktory. Ty pomáhají k přeměně v buňky prekurzorové. Z myeloidní multipotentní buňky vznikají buňky myeloidní řady, jako jsou granulocyty, monocyty, bazofily, eozinofily, trombocyty a erytrocyty. Z lymfoidní linie se vyvíjejí lymfocyty (B i T, NK buňky). Větší část buněk této vývojové linie nedokončuje svůj vývoj v kostní dřeni, ale přesouvají se do sekundárních lymfatických orgánů, kde svůj vývoj dokončují (Navrátil a kol., 2008, str. 201-206). Po dozrání prekurzorové buňky vznikají zralé krvinky.

Obr. 1 Vývoj krevních buněk



Zdroj: Haferlach, 2014, str. 14-15

1.1.2 Rozlišení typů lymfoidních buněk

Z lymfatické pluripotentní kmenové buňky se diferencuje nejprve prekurzorová kmenová buňka lymfoblast, pak prolymfocyt a zralý lymfocyt. Lymfoblast je 10-18 μm velký s kulatým až oválným jemným chromatinem a jedním nebo více jaderky. Jeho cytoplazma je bazofilní bez granulace a tvoří úzký okraj kolem jádra. Další diferencovanou buňkou je prolymfocyt. Ten je také 10-18 μm velký s kulatým nebo oválným jádrem. Na rozdíl od lymfoblastu má hrudkovitý chromatin a jedno jádro.

Cytoplasma bývá tmavší modrá bez granulí. Konečným stádiem vývoje je lymfocyt. Rozlišujeme dva druhy, malý a velký lymfocyt. Malý lymfocyt má velikost 8–12 µm, trochu vtlačené kulaté jádro s hutným chromatinem. Cytoplasma nemusí být viditelná nebo je úzká, světle modré barvy. Velký lymfocyt je velikostně 12–16 µm velký s kulatým i oválným vpáčeným jádrem a hutným stočeným chromatinem. Cytoplasma je u tohoto lymfocytu světle modrá s nespecifickými granuly (Penka, Slavíčková a kol., 2011, str. 24).

1.1.3 CD klasifikace

Na povrchu všech leukocytů se nacházejí molekuly, ty nazýváme CD znaky. Zkratka CD je z dřívější terminologie, byla tak pojmenována podle toho, jak se vázaly s monoklonální protilátkou. Dnes jsou pomocí těchto znaků označovány téměř všechny molekuly nacházející se na povrchu buňky. Pojmenování molekul nemá žádný systém, byly pojmenovávány podle pořadí objevení. Pro pojmenování jednoho druhu molekuly může být použita klasifikace CD znaku nebo jeho druhý název, který blíže určuje jeho opravdovou funkci nebo strukturu. Je určeno kolem čtyřset druhů a jejich podskupiny se označují doplňkovými písmeny za pořadovým číslem objevení. Klasifikace byla přehledně sepsána v tabulkách, ve kterých můžeme blíže najít, o jaký druh a funkčnost molekuly se jedná. Jsou i povrchové molekuly, pro které však nemáme označení podle CD klasifikace. (Beare a kol., 2008, supl. 80)

Tab. 1 Příklady typických znaků pro dané leukocytární subpopulace

Populace	CD znaky
Leukocyty	Pan specifický CD45
T-lymfocyty	CD3, CD2, CD7, CD5, CD4, CD8
B-lymfocyty	CD19, CD20, CD79b, CD22
NK buňky	CD56, CD16, CD161
Monocyty	CD14, CD64
Granulocyty	CD15, CD11

Zdroj: upraveno z Beare a kol., 2008, supl. 80, tab. A.4A.1

2 Hematologické malignity

Jedná se o skupinu onemocnění, která vznikají z krevních buněk. Klíčová mutace může vzniknout v různém stádiu buňky a tato mutace pak dává výhody v růstu svým dceřiným buňkám. Tyto buňky mají většinou porušený proces apoptózy a dělicího cyklu. Díky svým výhodám utlačují zdravé buňky, proto vznikne maligní onemocnění. Zdravé buňky se nemohou dále vyvíjet a jsou omezovány buňkami mutovanými (Penka, Slavičková a kol., 2011, str.289-290).

2.1 Dělení hematologických malignit — myeloidní, lymfoidní, chronické a akutní

Hematologické malignity lze rozdělit také na chronické a akutní. Názvy těchto onemocnění nám říkají o jeho průběhu. V případě akutní leukemie je průběh velmi rychlý. Projevuje se vysokým počtem nezralých buněk, blastů. Pokud není tato forma časně léčena, dochází ke smrti pacienta, a to do týdnů až měsíců od vzniku onemocnění. Na rozdíl od akutního je chronický průběh pomalý. Dochází pouze ke zmnožení buněk. Pacient zprvu ani neví, že onemocněním trpí. I po pozdější diagnostice a zahájení léčby se pacient dožívá mnoho měsíců i několika let (Penka, Slavičková a kol., 2011, str.289-290).

Hematologické myeloidní malignity vznikají poruchou myeloidní pluripotentní kmenové buňky či monocytů a granulocytů. Nezralé myeloidní buňky se dále nediferencují, jen se nekontrolovatelně dělí. Lymfoidní malignity vznikají poruchou pluripotentní buňky, která dává vznik lymfocytární linii buněk. Mohou také vznikat přeměnou vyzrálých lymfatických buněk.

2.2 B-lymfocytární malignity

Lymfoidní malignity lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou je prekursorová B-lymfoblastická leukemie. Do druhé skupiny můžeme zařadit zralé B-lymfomy. Jsou to například folikulární lymfom, chronická lymfocytární leukemie, malobuněčný B-lymfom, lymfoplasmocytární lymfom, lymfom pláštěvých buněk, nodální lymfom marginální zóny, splenický lymfom marginální zóny, difuzní velkobuněčný B-lymfom nebo Burkittův lymfom. Všechny tyto lymfomy mohou mít indolentní nebo agresivní formu. Agresivní lymfom velmi rychle roste a vyžaduje včasnou léčbu, která stále může vést k uzdravení. Naopak indolentní forma je pomalá, dlouho nemá žádné nápadné

příznaky. Proto u této formy je léčba složitější a často nevléčitelná (Foretová, Svoboda, Slabý, 2014, str. 109-110).

2.2.1 Vývoj B-lymfocytů

Vývoj B-lymfocytů jde ruku v ruce s vývojem specifického BCR receptoru, který je tvořen imunoglobulinem. Nejmladším stádiem B-lymfocytů je pro-B-lymfocyt, u kterého se zahajuje přeskupování genů kódující BCR receptor. Toto přeskupování zajišťuje vysokovou variabilitu imunoglobulinů. První přeskupení se děje na těžkém řetězci (H) mezi D a J segmentem (struktura imunoglobulinu viz kap. 2.2.2.), kdy je vyštěpen úsek DNA a tím se dostanou úseky DJ k sobě. Poté dojde k přeskupení mezi V segmentem a DJ segmentem a vzniká pre-B-lymfocyt, který má na povrchu těžký řetězec s náhradním lehkých řetězcem, který se teprve začíná přeskupovat (Parham a kol., 2015, str 149-155). Po tomto přeskupování vzniká nezralý B-lymfocyt, který má na svém povrchu IgM molekulu. Po navázání antigenu dozrávání B-lymfocytu pokračuje dalšími změnami v genech kódující variabilní úseky lehkého a těžkého řetězce, čímž se zajistí specifita a afinita receptoru a protilátky a vzniká zralý B-lymfocyt. Zároveň dochází k izotopovému přesmyku, kde se mění třída protilátky (Abbas et al., 2015, str. 184 – 189). Po aktivaci receptoru antigenem se spustí signalizační kaskáda, kdy dochází až k rozdílnému vzniku transkribovaných genů nebo k rozdílnému buněčnému dělení a vývoji B buňky v buňku plasmatickou produkující protilátky (Horejší, 2013, str. 61-63).

2.2.2 Imunoglobuliny

Protilátky jsou globulární proteiny, které na povrchu B-lymfocytů tvoří jejich specifický receptor, avšak mohou být také produkovány plasmatickými buňkami jako volné molekuly plnící několik funkcí a to neutralizace, opsonizace, aktivace komplementu (tab. 2) (Jílek, 2005, str.41-48). Mají tvar písmene Y a skládají se z variabilní a konstantní části. Variabilní část je zodpovědná za specifitu k danému antigenu, na který se navazuje. Konstantní část určuje, do jaké třídy daný imunoglobulin patří (Bartůňková a kol., 2011, str. 23-24). Rozlišujeme pět tříd imunoglobulinů – IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. Každá z těchto tříd má svou určitou funkci.

Tab. 2 Přehled lokalizace a funkce imunoglobulinových tříd

Třída	Lokalizace	Funkce
IgG	sérum, intersticiální tekutina	přestup přes placentu, sekundární odpověď
IgM	sérum povrch B - lymfocytů	aktivace komplementu, primární odpověď
IgE	sérum, povrch sliznic	ochrana proti parazitům
IgD	sérum, povrch B - lymfocytů	receptor pro antigen
IgA	sérum, sliny, slzy, mléko	ochrana sliznic, opsonizace

Zdroj: Bartůňková a kol, 2011 str.24

2.3 Malignity z B-lymfocytů

Malignity z B-lymfocytů se mohou vyvinout v různých stupních vývoje B-buněk. Podle toho, v jakém vývojovém stavu se přemění B-lymfocyt v maligní buňky, můžeme dané malignity členit a charakterizovat.

Akutní leukemie vzniká přeměnou hematopoetické kmenové buňky, tj. nezralé buňky. Přeměněné buňky v úrovni blastů zastaví svůj vývoj a nekontrolovatelně se dělí. Takovéto buňky se shromažďují v kostní dřeni a utlačují zdravé hematopoetické kmenové buňky a dochází k poruše krvetvorby. V laboratorním výsledku je vysoký počet blastů a nízký počet zralých segmentů nebo příznaky anemie (Faber a kol, 2012, str.153-155).

Akutní B-lymfoblastická leukemie je jednou z nejčastějších maligních onemocnění u dětí. Vzniká bez vlivu vnějšího prostředí. Hlavní změnou je počet chromozomů a vznik translokací a přestavba MLL genu (lokus 11q23). Pokud je počet chromozomů více než 47, nazýváme tuto leukemii hyperdiploidní. Přesáhne-li počet 50ti chromozomů, mluvíme už o vysoce hyperdiploidní leukemii, bývá však nejčastější. Onemocnění už může začínat v prenatálním věku, kdy vzniká preleukemický klon, který se při další mutaci může vyvinout v leukemii. Hyperdiploidní forma má špatnou prognózu. Mutace MLL genu je nejčastěji u dětí kojeneckého věku a prognóza je velmi nepříznivá. (Foretová, Svoboda, Slabý, 2014, str. 101-102).

Další lymfocytární malignitou je chronická lymfocytární leukemie. Chronická lymfocytární leukemie je jednou z nejčastějších forem maligního onemocnění krvetvorby u dospělých. Vyznačuje se pomalým průběhem a chronickou formou. Lymfocyty

se mohou hromadit v kostní dřeni, krvi i lymfatických uzlinách (Adam, Krejčí, Vorlíček, 2010, str.311). Tomuto onemocnění se dále budeme věnovat v kapitole 2.4.

2.3.1 Folikulární lymfom

V případě folikulárního lymfomu jde o ne Hodgkinský lymfom, který postihuje pacienty středního věku a to spíše ženy než muže. Onemocnění má velmi proměnlivý průběh. Vyznačuje se agresivní formou nebo naopak tlumenou formou. Patří mezi jedny z nejčastějších ne Hodgkinských lymfomů v České republice (Janíková a kol., 2011, str. 323-329). Většina nemocných nepociťuje žádné symptomy, jen drobné nebolestivé zvětšení uzlin. To však může utlačovat okolní tkáň. U malé části nemocných mohou být B-symptomy, jedná se o nespecifické příznaky nemoci. To však nemusí znamenat při prvotní diagnostice nutnost výskytu folikulárního lymfomu. Častým výskytem je zasažení lymfomu do kostní dřene, ale útlum krvetvorby je v tomto případě vzácný.

V nátěru periferní krve můžeme vidět atypické lymfocyty, jádrem připomínající malé kávové zrno s velmi úzkou cytoplasmou. Konečnou diagnózu lze určit až pomocí histologického vyšetření a průtokové cytometrie, kdy stanovujeme imunofenotyp. Typickými CD znaky pro folikulární lymfom jsou CD10+, CD19+, CD20+, CD22+ a silně výrazné povrchové imunoglobuliny. V současnosti stále není dobrá prognóza léčitelnosti. Nemoc se jeví spíše jako nevléčitelná, i když dnešní medicína dokáže nemocnému prodloužit život i o pár let (Faber a kol., 2012, str. 197-199).

2.3.2 DLBCL

DLBCL je zhoubný nádor, celým názvem difúzní B-velkobuněčný lymfom (zkratka z angličtiny Difuze Large B-Cell Lymphoma). Ten vzniká z velkých B-lymfocytů. Je to velká skupina lymfoidních nádorů, které vznikly přeměnou B-lymfocytů. Počátečním příznakem nemoci bývá nebolestivé zvětšení uzlin v oblasti hlavy, krku a třísel. U méně než poloviny pacientů se zvětšují uzliny v dutině břišní a nitrohrudí. Takto zvětšené uzliny mají vliv na funkci blízkých orgánů. Také se objevují nespecifické příznaky, B-symptomy. Ty se vyskytují u třetiny nemocných. U malého počtu pacientů může být postižena i kostní dřeň (Roth and Reichard, 2012, str. 113-118).

V periferním nátěru můžeme vidět neobvyklé lymfocyty pocházející z nádorové tkáně s úzkou cytoplasmou kolem bazofilního jádra. Takto změněné lymfocyty jsou až 2x větší než zdravé a normální lymfocyty. V nátěru lze vidět mnoho mitoticky dělících se lymfocytů, nazýváme je mitotické figury (Faber a kol., 2012, str. 194-196).

2.3.3 Vlasatobuněčná leukemie

Mezi druhy nízké agresivního indolentního lymfomu z B-řady patří vlasatobuněčná leukemie. Je tvořena malými lymfocyty s typickou cytoplasmou, kdy výběžky připomínají vlas. Její výskyt není v populaci častý. Většinou postihuje pacienty, převážně muže, středního věku.

Nemocní většinou trpí únavou a celkovou slabostí. Dochází u nich ke zvětšení sleziny a vzniku anemického syndromu v pokročilejších stádiích nemoci. U pacienta dochází obvykle k pancytopenii, což je celkový pokles červených i bílých krvinek a krevních destiček. To přispívá ke vzniku anemického syndromu a krvácení z nedostatku krevních destiček (Faber a kol., 2012, str. 219-221).

Tato leukémie je snadno diagnostikovatelná z nátěru periferní krve. V nátěru barveném May Grünwald-Romanovski jsou viditelné typické výběžky bledě modré cytoplasmy a oválné fazolovité jádro. K určení konečné diagnózy je nutné vyšetření histologické a vyšetření pomocí průtokového cytometru. Mezi silně výrazné CD znaky lze zařadit znak CD11c+, CD 20+, CD22+, CD 103+, protilátka proti vlasatobuněčné leukemii DBA-44+, protilátka detekující antigen zralých B-buněk FMC-7. Můžeme prokázat i Annexin A1, který je důležitý při rozlišení od lymfomu buněk marginální zóny. Prognóza této nemoci je velmi dobrá. Více než tři čtvrtiny pacientů se zcela vyléčí (Vorlíček, 2012, str. 196-199).

2.3.4 Lymfom z pláštěvých buněk

Lymfom z pláštěvých buněk je onemocnění buněk lymfocytů pláštěvé zóny vznikající v lymfatické uzlině. Průběh této nemoci je velmi agresivní, nebo má utlumený průběh. Vyskytuje se velmi zřídka, a to častěji u mužů středního věku než u žen (Faber a kol., 2012, str. 200-202).

Diagnóza se stanovuje pomocí histologického rozboru lymfatické tkáně, cytogenetického vyšetření pomocí FISH metody, nebo určení imunofenotypu průtokovou cytometrií. Typický imunofenotyp pro toto onemocnění jsou pozitivní CD znaky-CD19, CD5, avšak bez koexprese CD23 a CD200 typické pro chronickou lymfatickou leukemii. Dále bývá pozitivní FMC-7 (Vydra, Cetkovský a kol, 2015, str. 221-225).

2.4 Chronická B-lymfocytární leukemie

Chronická lymfocytární leukemie je maligní nádorové onemocnění, při kterém se nekontrolovatelně dělí lymfocyty a kumulují se v kostní dřeni, lymfatických uzlinách, v jiných orgánech, ale i v periferní krvi (Vokurka, 2008, str.43). Je to nízce agresivní forma leukemie. Transformované B-lymfocyty nepodléhají tak snadno apoptóze jako zdravé B-lymfocyty. To může být způsobeno zvýšenou expresí genu Bcl 2 (Adam, Krejčí, Vorlíček, 2008, str.177), (Klener, 1996, str. 445-450).

2.4.1 Příčiny, příznaky a průběh onemocnění

Hlavní příčinou vzniku chronické lymfocytární leukemie je nádorová mutace lymfocytu. Takto přeměněný lymfocyt je životně zvýhodněn. Jeho delší životnost a hromadění v lymfatických uzlinách utlačuje zdravé buňky.

Klinické příznaky se projevují až v pokročilém stádiu onemocnění. Typické jsou teploty neinfekčního původu. K tomu se přidružuje zvětšení mízních uzlin, dále pak pocit plnosti. Dochází také ke snížení počtu červených krvinek, anemii. Ta způsobuje snížení výkonu pacienta, častou únavu a celkovou slabost organismu. Pacienti jsou náchylní k infekcím plic a dalších komplikacím spojených s dysfunkcností imunitního systému (Adam, Krejčí Vorlíček, 2008, str. 178-180).

Lymfocytární leukemie probíhá v několika stádiích. To podle Kanti Raie znamená, že ve stádiu 0 se objevuje pouze zvýšený počet lymfocytů v krvi a kostní dřeni. V tomto stádiu ještě pacient nezačíná léčbu, pouze je sledován lékařem. Ve stádiu I se přidávají další symptomy, mezi nimi i zvětšení lymfatických uzlin. Stádium II je podobné jako stádium I. Dochází ke zvětšení dalších orgánů v břišní dutině, jater a sleziny. Obvykle při stádiu III začíná pacient léčbu. Neboť dochází k anemii, to je snížení počtu červeného krevního barviva, hemoglobinu. Ve stádiu IV se dostávají destičky pod hodnotu $100 \times 10^9/l$ (Mayer, 2016, str. 101).

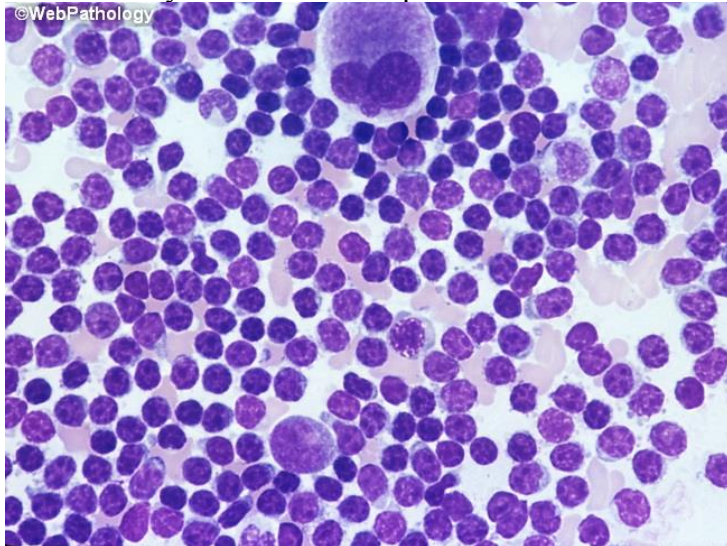
2.4.2 Diagnostika a vyšetření

Základní diagnostikou je morfologické vyšetření kostní dřene, histologické vyšetření, cytometrické vyšetření a genetická vyšetření (molekulární genetiky, cytogenetiky FISH), která nám vedle průkazu typických mutací dávají také informaci o prognóze (Panovská, Doubek, 2013, str. 119, vydání 7).

2.4.3 Morfologické vyšetření kostní dřeně

V aspirátu kostní dřeně obvykle nacházíme vysoké zastoupení zralých lymfocytů s úzkým lemem cytoplazmy bez zřetelně viditelného jadérka. Buňky jsou velmi uniformní (obr. 2).

Obr. 2 Buňky CLL v mikroskopickém nátěru kostní dřeně



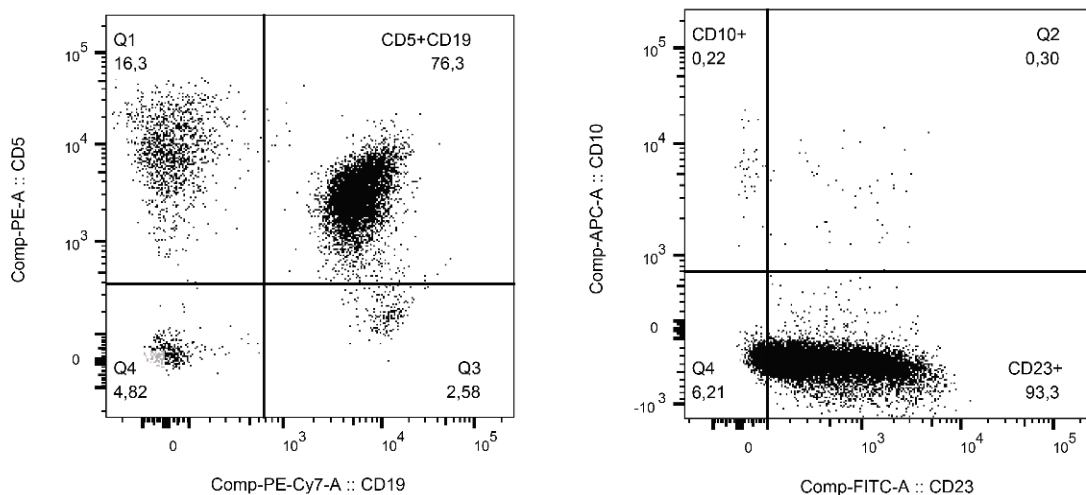
Převzato z <http://www.webpathology.com/image.asp?case=763&n=8>

2.4.4 Cytometrické vyšetření

CLL buňky mají charakteristické znaky, které usnadňují jejich diagnostiku. Typickým imunofenotypem je koexprese CD19, CD5 a CD23 a zároveň negativita CD10 (viz obr. 3). Donedávna se také vyšetřovaly znaky ZAP-70 a CD38, které sloužily k určení prognózy (Schroers a kol., 2005, 750-758), ale s nástupem molekulárně genetických vyšetření se již od těchto znaků upustilo.

Obr. 3 Ukázka detekce CLL buněk

Pro ty je typická koexprese CD5/CD19 a zároveň CD23



(vlastní data Hematologicko-onkologického oddělení, FN Plzeň)

2.4.5 Genetická vyšetření

Při CLL dochází k chromozomálním změnám ve vzniklých nádorových buňkách, nejčastější změnou je delece. To je chybění části chromozomu v části nebo v celém raménku chromozomu. Tato chromozomální změna se při CLL nejčastěji vyskytuje na chromozomu 13 (del 13q). Tato abnormalita je spojená s dobrou prognózou nemoci CLL. Další abnormalita je trizomie chromozomu 12, kdy je jeden nadbytečný chromozom 12, u Downova syndromu. Tato změna je spojená se střední prognózou nemoci. Další změna se týká střední a horší prognózy, to je delece dlouhého raménka chromozomu 11 (del 11q) (Pospíšilová, Dvořáková, Mayer, 2013, str. 38-39).

2.4.6 Podskupiny na základ genetických mutací

Můžeme definovat dvě podskupiny na základě rizikovosti. Podle toho, jestli došlo k mutaci IgVH („*gen kódující variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů*“) nebo nedošlo k mutaci v genu IgVH (Vokurka, 2008, str. 46). Díky mutaci variabilní části imunoglobulinového řetězce (IgVH) rozdělujeme pacienty na dvě hlavní skupiny. A to pacienty s mutovanou a nemutovanou formou IgVH genu (Vorlíček, 2012, str. 168). Mutovaná forma buňky značí lepší prognózu. Laboratorní výsledky léčby jsou dobré a nemoc má mírnější průběh. Pacienti s mutací IgVH se dožívají déle, až 25 let po propuknutí nemoci (Vokurka, 2008, str. 46). Pacient s nemutovanou formou nemoci má horší predikci. Mohou být s nemocí spojeny i další rizikové faktory. Často bývá i nižší senzitivita léčby. Tito pacienti se dožívají maximálně 8 let od začátku nemoci (Vokurka, 2008, str. 46).

Existují další znaky, které ukazují na horší predikci a horší výsledky léčby u pacientů. Jedním ze znaků je deleční změna na chromozomu 11 a 17. Dalším znakem může být defekt genu p53. Gen p53 je velmi důležitý tumor-supresorový gen. Produkuje protein p53, který je transkripčním faktorem a funguje jako receptor při poškození DNA (Zilfou a Lowe, 2009, str. 1-12). P53 udržuje celistvost genomu a brání šíření vzniku buněk s abnormální DNA. O monoalelickou delecii se jedná u 7-10 % pacientů s B-CLL, je pravidelně nacházena v oblasti 17p13. (Příloha 2: Prognóza podle mutací, souhrný přehled) Delece je vždy spojena s horší prognózou nebo odolností vůči chemoterapii. Další genetickou abnormalitou je gen ATM, který je umístěný v oblasti 11q22, a to u 20% pacientů s B-CLL. Objevuje se spíše u pacientů v mladším věku a v pokročilejším stádiu choroby. V obou případech to má vliv na prognózu onemocnění a těžkou léčbu (Pospíšilová, Dvořáková, Mayer, 2013, str. 47).

3 Chemoterapie

Pokud člověk onemocní nádorovým onemocněním, jedním z léčebných postupů je chemoterapie. Chemoterapie je podávání látek chemického původu s cytotoxickým účinkem. Tento účinek omezuje buněčné dělení a buňky zaniknou. Tento léčebný proces spočívá v podávání chemických látek do organismu, nejčastěji cytostatik, která toxicky působí na nemocné buňky. Účinek těchto látek působí i na zdravé tkáně. Často poškozením zdravých buněk mohou vznikat nežádoucí účinky, které se po terapii projevují.

Mechanismy účinku chemoterapie lze rozdělit do několika hlavních skupin. První skupinou jsou látky akrylační, ty pevnou vazbou naváží cytostatikum a DNA. DNA se tím poškodí a dále se nereplikuje. Druhým mechanismem je interkalace, kdy se cytostatikum zařadí mezi DNA a vzniká nekovalentní vazba. Tato vazba působí poruchu transkripce a další replikace. Funkci DNA lze také porušit blokadou topoizomeráz. Ty zajišťují správné rozmotávání DNA a její zamotávání, aby se moc neutáhla a šla znovu rozmotat. Také kontrolují riziko vzniku zlomů. Blokadou topoizomeráz se může vztahovat na jeden nebo oba řetězce DNA, kdy se inhibitor naváže na její řetězec.

Dalším mechanismem může být rozštěpení DNA. Tento účinek nazýváme radiometrický účinek. Cytostatika také mohou působit na některé z enzymů, které se podílejí na replikaci DNA a buněčného dělení. Cytostatika tohoto druhu jsou nazývána antimetabolity. Vyššího léčebného účinku lze dosáhnout kombinací cytostatik. Kombinujeme látky s různým mechanismem cytotoxického účinku. První aplikace chemoterapeutik je velmi účinná. Před další aplikací je nutno stanovit dostatečně dlouhou dobu k regeneraci pacienta. Zdravé buňky se obnovují mnohem rychleji než buňky nádorové. Po aplikaci dalšího cyklu chemoterapie se počet nádorových buněk opět snižuje. Po každé aplikaci je nutná doba k regeneraci organismu. I když se zdá, že nádor je zcela vyléčen, je nutné pokračovat v léčbě. Pacient se nachází pouze v remisi, kdy nádor není patrný, snížil se počet příznaků, ale pacient zcela vyléčen není (Klener, 2011, str. 38-40).

3.1 Význam chemoterapie v léčbě nádorů

Léčba onkologického onemocnění je obtížná, většinou nestačí jedna léčebná metoda. Je potřeba komplexního přístupu a kombinace terapeutických metod. Léčba solidního nádoru většinou začíná chirurgickou léčbou a pokračuje jinými léčebnými postupy jako je chemoterapie, radioterapie nebo hormonální léčba. Důležitá je též léčba podpurná, tj. užívání vitamínových doplňků a psychologická léčba. Cílem je snížit počet

nádorových buněk. Při chemoterapii je důležité se zaměřit na postižené nádorové buňky a podporovat buňky zdravé. Cytostatika používáme ke snížení proliferace nádorových buněk. Ovšem někteří pacienti jsou k této léčbě imunní. (Klener,2011,str.38-41).

3.1.1 Faktory ovlivňující účinnost chemoterapie

Důležitým faktorem je velikost a intenzita dávky. Vztah mezi účinkem chemoterapie a účinkem nádoru je evidentní. S přibývajícím počtem nádorových buněk se může stát chemoterapie méně účinná.

Množství podaného cytostatika při jedné aplikaci lze označit jako velikost dávky, to je maximální tolerovaná dávka při klinické zkoušce ve II. fázi testování (Klener, 1996, str. 132). Při druhé fázi se podává zpravidla maximálně tolerovaná dávka. Je to pro pacienty, kteří přestali odpovídat na konvenční léčbu (Klener, 1996, str 42). Důležitá je též intenzita dávky podaná v časové jednotce, například mg/m² za týden.

Dalšími ovlivňujícími faktory jsou projevy toxicity, tj. toxické poškození zdravých buněk. Podstatnou roli hraje i věk nemocného, neboť s přibývajícím věkem se zhoršuje vylučování léků, zvyšuje se riziko poškození srdeční činnosti a též celkový zdravotní stav nemocného ovlivňuje výši dávky. Pacienti v dobré léčebné kondici mohou přijímat vyšší dávky v kratších intervalech. I prodělané a probíhající choroby znemožňují podávání vyšších dávek chemoterapie, nebo zmenšují její účinek (Klener, 1996, str.136-139).

Jedním z důležitých faktorů před zahájením chemoterapie je doba od vzniku nemoci. Čím dříve je léčba zahájena, tím snáze a dříve mohou být nádorové buňky zničeny. Druhou důležitou věcí při léčbě je kombinace cytostatik. Kombinováním cytostatik se zlepší účinek a snižuje se vznik tolerance pacienta na chemoterapii. Léčba také musí probíhat v daných cyklech. Pauzy mezi cykly jsou důležité pro regeneraci buněk a vyloučení cytostatik z těla. Předčasné podání dalšího cyklu chemoterapie může poškodit pacienta a zcela nezregenerované zdravé buňky. Avšak pozdní aplikace zvyšuje pravděpodobnost vzniku dalších nádorových buněk (Klener,2011,str.41).

3.1.2 Fludarabin a cytarabin

Purinové analogum fludarabin má největší využití v hematologické a onkologické léčbě. Jeho funkcí je blokáce transkripce a translace tím, že se začleňuje do RNA a jeho metabolity inhibují DNA polymerázu a ribonukleotidreduktázu, která je důležitá pro přeměnu ribonukleotidů na deoxynukleotidy. Proto pak dojde k apoptóze buňky (Ricci a kol., 2009, str. 187-207). Metabolit je z těla vyloučen močí. Tento lék je používán hlavně

k léčbě chronické lymfatické leukemie. Do těla je aplikován v ředěných infuzích fyziologickým roztokem. Nežádoucí účinky mohou vést až k renálnímu selhání nebo působit neurotoxicky (Klener, 1996, str.291-292).

Analogem cytosinu je cytosin arabinosid neboli cytarabin, kde ribóza je nahrazena arabinózou. V lidském těle se rychle přeměňuje na cytosin arabinosid-3-P (cytosin arabinosid tri fosfát), ten blokuje DNA polymerázu a tím buněčný cyklus (de Vries a kol., 2006, str. str. 912-919). Jeho účinek v těle je velmi krátký, dochází k odštěpení aminoskupiny od jeho metabolitu a přeměnu na derivát uracylu v játrech (Klener, 2010, str.37). Jeho účinek trvá maximálně 1-2 hodiny od podání, proto je účinnost léčiva velmi omezená. Nežádoucí účinky tohoto léčiva jsou závislé na velikosti dávky. Je používán pro léčbu chronických hematologických malignit, v remisi akutních leukemií nebo v nízkých koncentracích při léčbě myelodysplastického syndromu. Podává se injekčně do podkoží a i nitrožilně (Klener, 1996, str.296-297).

3.1.3 Nežádoucí účinky chemoterapie

Velký vliv na nežádoucí účinky chemoterapie má druh a množství dávky cytostatik. Pro snížení nežádoucího účinku léčby se obvykle používá kombinace cytostatik, proto tuto léčbu můžeme označovat jako kombinovaná cytostatická léčba. Této metody se využívá hlavně v případech, kdy je třeba zvýšit účinek cytostatik. Mezi podanými dávkami chemoterapie je důležité dodržet určitý časový interval. Pacientovo tělo musí mezi cykly regenerovat a vyloučit podaná cytostatika, aby mohl podstoupit další léčbu.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří zvracení, průjmy, nevolnost, nadýmání. Dále vypadávání vlasů a ochlupení, tento stav však bývá přechodný. Po ukončení chemoterapie se růst většinou obnoví. Buňky trávicího traktu jsou velmi citlivé k cytostatikům, proto dochází k jejich narušení po celém trávicím traktu a to může vést ke vzniku aftů i bolestivosti při odchodu stolice. Nejrizikovějším nežádoucím účinkem je ztráta bílých krvinek-leukocytů, které chrání tělo před infekcemi. Dalším zásadním projevem cytostatické léčby je pokles počtu červených krvinek a vzniku anemického syndromu. Ten má za následek únavu pacienta, bušení na hrudi, celkovou slabost a bledost sliznic. Může dojít také k poklesu krevních destiček-trombocytů, v důsledku čehož se zvyšuje riziko krvácivosti. Při léčbě CLL jsou nežádoucí účinky nízké a jsou možné řešit pouze ambulantně. Mezi nejčastější používaná chemoterapeutika patří například

fludarabin, chlorambucil, cyklofosamid, bendamustin, vinkristin, rituximab, doxorubicin a cytarabin (Brychtová, Panovská, Doubek, 2016, str. 19-20).

Cytostatická chemoterapeutika poškozují jak buňky nádorové, tak i buňky zdravé. Mutagenní účinek na zdravé buňky je závislý na chemoterapeuticky podávané dávce. Čím vyšší dávka chemoterapeutika, tím je vyšší riziko vzniku nového nádorového onemocnění a jiných komplikací (Adam, Krejčí, Vorlíček, 2011, str.146).

3.1.4 Další léčebné postupy

Radioterapie využívá ionizujícího záření, které zastavuje růst nádorových buněk. Je využívána jako doplňková metoda k léčbě lymfocytární leukemie, zejména pak při extrémním zvětšení sleziny. Tato terapie se provádí na oddělení radiační onkologie. Kortikoterapie se využívá zejména v případech, kdy tělo vytváří nepřiměřené množství protilátek-autoprotilátek, to jsou protilátky zaměřené proti vlastnímu tělu pacienta. Imunoterapie kombinuje účinky kombinované chemoterapie, využívá vlastní imunitní systém pacienta k ničení nádorových buněk. Jedná se zejména o monoklonální protilátky zacílené proti specifickému antigenu, které dokáží zaktivovat protinádorové složky imunity (komplement, NK buňky) (Farsa, 2013, str. 464-470). V současné době je tato metoda velmi moderní.

Transplantace krvetvorné tkáně je zřídka využívaná metoda u chronických lymfocytárních malignit a je prováděna jen ve specializovaných pracovištích. V případě transplantace od příbuzného i nepříbuzného dárce lze prognózu zlepšit, ba i nemoc vyléčit. Transplantace kostní dřeně je vhodná spíše pro mladší pacienty v dobré kondici. Na výzkum dalších druhů cytostatik se velmi intenzivně pracuje, ovšem ani nové léky a léčebné kombinace nejsou bez nežádoucích účinků a zatím nedokážou nemoc zcela vyléčit (Panovská, Doubek, 2013, str. 119, vydání 7).

PRAKTICKÁ ČÁST

4 Cíl výzkumu a výzkumný vzorek

4.1 Hypotéza

Nádorové buňky pacientů se mohou lišit nejen z hlediska jejich chování, ale také jejich reakce na nízké dávky chemoterapi. Nízké dávky chemoterapie sice nemusí buňky zabít, ale mohou ovlivnit jejich metabolickou aktivitu.

4.2 Cíl práce

Cílem této práce je zjistit:

- 1) zda existují rozdíly v reakci CLL buněk pacientů na nízké dávky aplikované chemoterapie
- 2) zda je měření metabolické aktivity senzitivní pro stanovení ovlivnění buněk

4.3 Soubor pacientů

Všichni pacienti byli zařazeni na základě podepsání informovaného souhlasu, který byl schválen, stejně jako projekt zabývající se tímto zkoumáním, etickou komisí Lékařské fakulty v Plzni.

Všichni testovaní pacienti měli prokázanou diagnózu CLL minimálně dvěma metodami, a to cytologickým a flowcytometrickým vyšetřením. Kritériem pro zařazení byla infiltrace periferní krve, ze které byly leukemické buňky izolovány. Veškeré izolace buněk byly provedeny před léčbou pacienta. Bližší informace o souboru pacientů uvádíme v příloze.

5 Metody výzkumu

5.1 Materiál a reagensie

Materiál

- 12-ti jamková kultivační destička (TPP, Švýcarsko)
- Kryozkumavky 1,8ml (NUNC, USA)
- Běžný spotřetí materiál: nastavitelné pipety a jednorázové špičky, Eppendorf zkumavky o objemu 0,2 a 1,5 ml, centrifugační zkumavky o objemu 15ml a 50ml, pasturovy pipety, sérologické pipety
- Zkumavky 12x75mm (BD Bioscience, USA)
- Magnetické LS colony, magnetický stojan (Miltenyi, USA)
- 96-jamkové černé destičky pro měření fluorescence (NUNC, USA)

Reagensie:

- Ficoll-Paque (GE Healthcare, USA)
- Hybridoma médium (Gibco, USA)
- FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco USA)
- DMSO (Wak-Chemie, Německo)
- RPMI médium (Gibco, USA)
- PBS (Gibco, USA)
- ATB (100x koncentrované, Gibco, USA; finální koncentrace antibiotik je 100UI /mL penicilinu, 100 µg/mL of streptomycinu a 0,25 µg/mL Amphotericinu B)
- fludarabine (25mg/ ml) a Cytarabine (100mg/ml)
- protilátky CD45 – BrilliantViolet 510 (Biolegend, USA), CD5-PE (Beckman Coulter, USA), CD19 – PECy7 (Beckman Coulter, USA), 7-actinomycin (7AAD, Exbio, ČR)
- CLL izolační kit (Miltenyi, USA)
- CST kalibrační kuličky (BD Bioscience, USA)
- DSP30 oligonukleotid (TIBMolBiol, Německo)
- pokeweed mitogen (Sigma Aldrich, USA)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma Aldrich, USA)
- IL-2 (Proleukin, Novartis, Švýcarsko)

Přístroje:

- PCR box s Hepa-filtrem (ESCO)
- CO2 inkubátor (Thermo, USA)
- Průtokový cytometr ARIA Fusion (BD Bioscience, USA)
- Destičkový reader Synergy HTX (Biotek, USA)
- Centrifugy, stripetor, vortex

5.2 Izolace mononukleárních buněk

Nejprve se přenese 9ml plné heparizované krve do 50-ti ml zkumavky. K materiálu se přidá 9ml PBS a důkladně promíchá. Připraví se 15-ti ml zkumavky, do kterých se přidá 5ml separačního roztoku Ficoll-Paque. Do předem připravených zkumavek pomocí Pasteurovy pipety se opatrně navrství 9ml naředěné suspenze krve. Zkumavky se centrifugují při 1000g 15 minut při teplotě 20°C, při pomalém rozběhu a brzdě. Po centrifugaci se odebere Pasteurovou pipetou do nové 50-ti ml zkumavky frakce mononukleárních buněk. Zkumavky se doplní do 50ml roztokem PBS a znovu centrifugují, tentokrát při 300g po dobu 8 minut při teplotě 20°C, standardní rozběh a brzda. Po centrifugaci se slije supernatant, usazená peleta na dně zkumavky se rozvolní ve 40μl RPMI.

5.3 Magnetická izolace CLL buněk

K resuspendované peletě se přidá 15μl z Biotin Antibody protilátky, mix se důkladně promíchá a nechá se 5 minut při chladničkové teplotě 2-8°C. Poté se přidá 30μl RPMI a 30μl antibiotinových magnetických mikročástic. Dostatečně se vše promíchá a inkubuje se 10 minut při chladničkové teplotě 2-8°C. Následně se pokračuje magnetickou separací buněk. Po inkubaci buněk se přidá k suspenzi 500μl PBS a přenese se na magnetickou kolonu, která se následně 2x promyje 3ml PBS. Sbírá se průtok buněk obsahující neznačené buňky, které představují B buňky. Po izolaci buňky se centrifuguje při 300g/ 6min/ 20°C.

5.4 Kultivace buněk a zamrazení buněk

Po centrifugaci se buňky rozvolní v Hybridoma médiu s 10% FBS a směsí antibiotik tak, aby byla koncentrace buněk v rozmezí 3-5x10e6/ml. Odebere se malá část vzorku na stanovení čistoty populace (barvení a značení buněk viz kapitola průtoková cytometrie 5.9). Buňky se kultivují 3-5 dnů na kultivačních láhvích 75cm². Po uplynutí doby kultivace se buňky centrifugují 300g/8min/20°C. Peleta se rozvolní v FBS tak,

aby byla koncentrace buněk $30 \times 10^6/\text{ml}$. Do jedné kryozkumavky se aplikuje 0,5ml suspenze a přidá se k ní 0,5ml vychlazeného kryomédia (FBS+20% DMSO) a ihned se vloží na led. Buňky se okamžitě mrazí pomocí programovatelného zamrazovače na programu zajišťující postupné klesání teploty (1°C za 1min) až po -80°C .

5.5 Rozmrazení buněk

Před rozmrazením buněk se nejprve vytemperuje vodní lázeň a kultivační médium na 37°C . Kultivační médium se skládá z RPMI, 10% FBS a antibiotika-antimykotika. Vyjmou se aliquoty s buňkami z tekutého dusíku a vloží se na cca 5 minut do vodní lázně a nechají se rozmrazit, dokud nezmizí veškerý led v kryozkumavce. V průběhu rozmrazování se odebere 5ml vytemperovaného kultivačního média do 15-ti ml centrifugační zkumavky. Po rozmrazení se pomalu přikapává po kapkách 1ml kultivačního média z 15-ti ml centrifugační zkumavky. Přenese se obsah z kryozkumavky do 15-ti ml centrifugační zkumavky a kryozkumavka se vypláchne 1ml kultivačního média a opět se přenese do centrifugační zkumavky. Buňky se centrifugují při 350g po dobu 5 minut při 20°C . Po centrifugaci se slije supernatant, usazená peleta na dně zkumavky se rozvolní v 6-ti ml kultivačního média. Přenese se na 12-ti popř. 24-jamkovou destičku.

5.6 Aktivace buněk

Při průběhu re-kultivace buněk bylo zjištěno, že buňky vyžadují obnovení proliferace a tudíž byly aktivovány. Pro sledování účinku chemoterapie je nutné nejprve u kryokonzervovaných buněk obnovit proliferaci. Pro navození proliferace byly testovány následující kombinace aktivačních látek:

Tab. 3 Aktivační látky a jejich kombinace

Pokeweed	Pokeweed + IL-2	Pokeweed + PMA	PMA	PMA + IL-2
Pokeweed + PMA + IL2	DSP30	DSP30 +IL2	DSP30 +PMA + IL2	DSP30 + pokeweed + IL-2

Pokeweed vždy v koncentraci $10\mu\text{g}/\text{ml}$, PMA vždy v koncentraci $2\mu\text{M}$, IL-2 vždy v koncentraci 200UI/ml a DSP30 vždy v koncentraci $10\mu\text{g}/\text{ml}$.

Buňky byly kultivovány po dobu 48hod a 72hod. Jako základní marker aktivace buněk byla testována metabolická aktivita buněk pomocí Alamar Blue (viz. kapitola. 5.8).

5.7 Testování chemoterapie

Pro testování účinku chemoterapie byly zvoleny dvě standardně užívané látky fludarabine ($1\mu\text{M}$ a $2\mu\text{M}$) a cytarabin ($1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$). Obě látky zasahují do buněčného cyklu buňky a jejich účinek byl měřen pomocí stanovení metabolické aktivity buněk s využitím Alamar Blue a detekce mrtvých buněk pomocí průtokové cytometrie.

Nejprve bylo nutné určit koncentraci buněk (WBC-white blood cell). Po určení koncentrace byl vypočten objem suspenze, ve které se musí nacházet $1,5 \times 10^6$ /l buněk, které byly nasazeny do 12-ti jamkové kultivační destičky a doplněny do 1ml kultivačním médiem. Do nadepsaných jamek se aplikuje daná látka o dané koncentraci. Po aplikaci se důkladně a opatrně promíchá. Celou dobu se pracuje ve sterilním prostředí v PCR boxu, aby nedošlo ke kontaminaci buněk. Destička s buňkami se vloží na 48 hodin do inkubátoru.

Před měřením se musí připravit 96-ti jamkovou destičku černé barvy. Do destičky se napipetuje $15\mu\text{l}$ Alamar Blue. K napipetované Alamar Blue přidáme $150\mu\text{l}$ předem kultivovaných buněk. Vzorky se aplikují v doubletu, kvůli snížení chybovosti. Celou dobu je nutné pracovat v PCR boxu a ve tmě. Destička s aplikovanými buňkami se nejprve protřepe a poté vloží do inkubátoru pro kultivaci buněk při $37\text{ }^\circ\text{C}$ na 3 hodiny. Po uplynutí inkubační doby se destička vyndá z inkubátoru a přenesení se do předem nastaveného a připraveného Readeru. Nastaví se filtry excitace 540/35 a filtry emise 590/20. Vypočítá se průměrná hodnota doubletu.

5.8 Metabolická aktivita buněk-mechanismus Alamar Blue

Mechanismus Alamar Blue je vhodný ke kvantitativnímu měření proliferace buněčných linií. Tento produkt obsahuje fluorimetrický a kolometrický indikátor, který detekuje nárůst metabolické aktivity. Oxidační redukci mění v chemické reakci barvu v důsledku buněčné proliferace. Indikátor v Alamar Blue má velmi dobré vlastnosti. První vlastností je změna kolorimetrická, popř. fluorescence, která je odrazem oxidačně redukčních dějů v průběhu buněčné metabolické aktivity. Druhou dobrou vlastností je minimální toxicita pro živé buňky.

Principem detekce Alamar Blue je udržování redukčního prostředí buňky v cytosolu. Alamar Blue obsahuje látku resaruzin, která je nefluoresceční, ale po přidání k buňkám se metabolizuje (redukuje) na látku resorufin, ten se mění na červenou

fluoreskující barvu. Tuto přeměnu mohou udělat jen živé buňky, čím více živých buněk popř. čím více jsou buňky metabolicky aktivní, tím více červené fluorescenční látky. Alamar Blue má dlouhou dobu inkubace, od jedné hodiny až po několik hodin. Delší inkubační doba je lepší pro zvýšení citlivosti metody. Výslednou fluorescenci měříme odečtem na fluorescenčním spektrofotometru. (Thermofisher, příbalové informace)

5.9 Stanovení čistoty a zastoupení mrtvých buněk – průtoková cytometrie

K buněčné suspenzi se přidá monoklonální protilátka pro detekci CLL buněk (CD19-PC7, CD5-PE, CD45-BV510) a zároveň 7AAD na rozlišení mrtvých a živých buněk. Tato látka má schopnost projít membránou mrtvých buněk s poškozenou membránou a zároveň neprochází do živých buněk. Buňky s protilátkami se inkubují 15min ve tmě a následně se jednou propláchnou 4ml PBS při centrifugaci 350g/5min. Odstraní se supernatant, peleta se rozvolní v 300 μ l PBS a ihned se měří na průtokovém cytometru. Čistota populace se určuje jako zastoupení CD19+CD5 buněk. Procento mrtvých buněk se určuje jako buňky pozitivní pro 7-AAD.

5.10 Zpracování dat – statistika

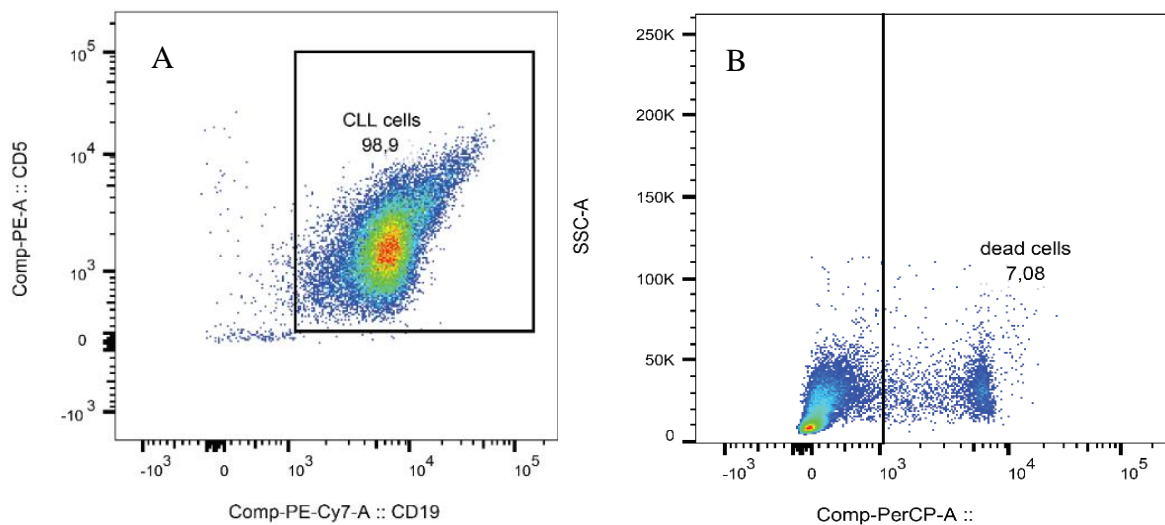
Statistické zpracování naměřených dat u vzorků po aplikaci chemoterapie bylo ve spolupráci se studentem ZČU-Fakulta aplikovaných věd, Katedra kybernetiky Bc. Martinem Lebou, který provedl statistické zhodnocení dat v programu Excel a Matlab. Pro zjištění statistického významu byl použit Mann-Whitney U Test.

6 Výsledky

6.1 Izolace a kultivace buněk

Po izolaci byly buňky sledovány na čistotu zastoupení znaků CD5+CD19+ buněk a v průběhu kultivace bylo stanoveno zastoupení mrtvých buněk. Čistota vyizolovaných buněk se pohybovala v rozmezí 90-100% (obr.4A). V průběhu kultivace u některých vzorků pacientů postupně klesala viabilita buněk a zvyšovalo se zastoupení mrtvých buněk. Viabilita se u vzorků ale vždy pohybovala nad 80% (obr. 4B)

Obr. 4 Výsledná čistota a viabilita buněk po izolaci a kultivaci.



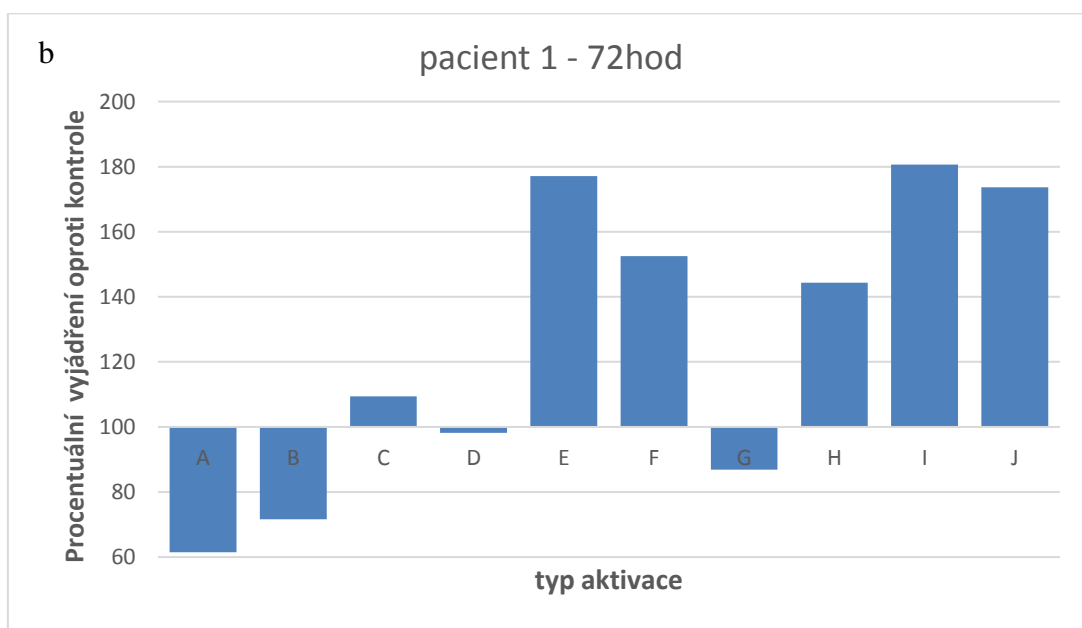
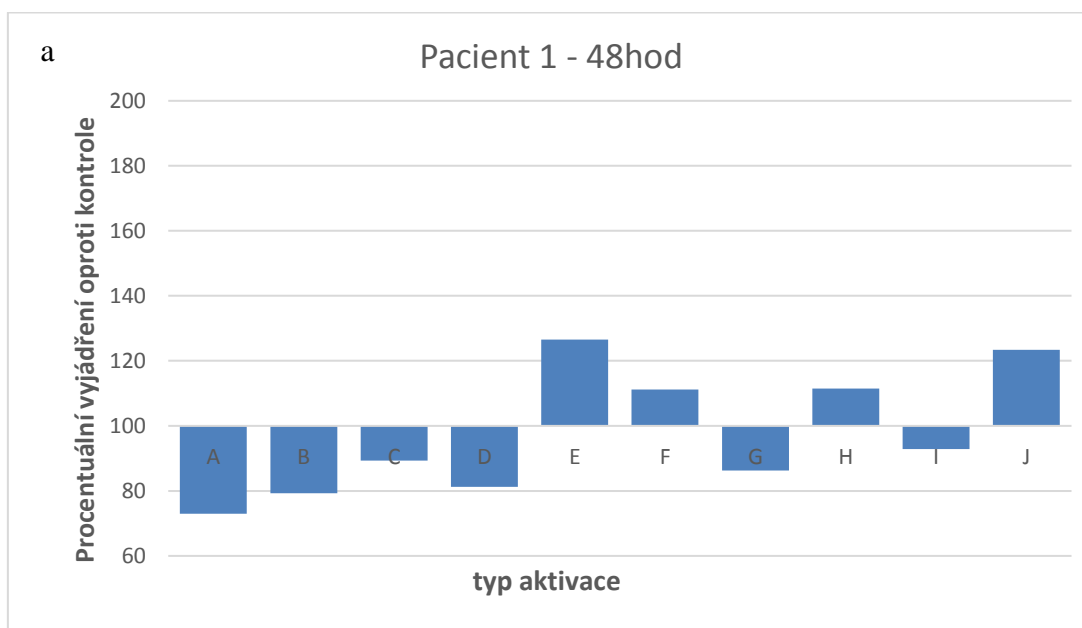
6.2 Aktivace buněk po rozmrazení

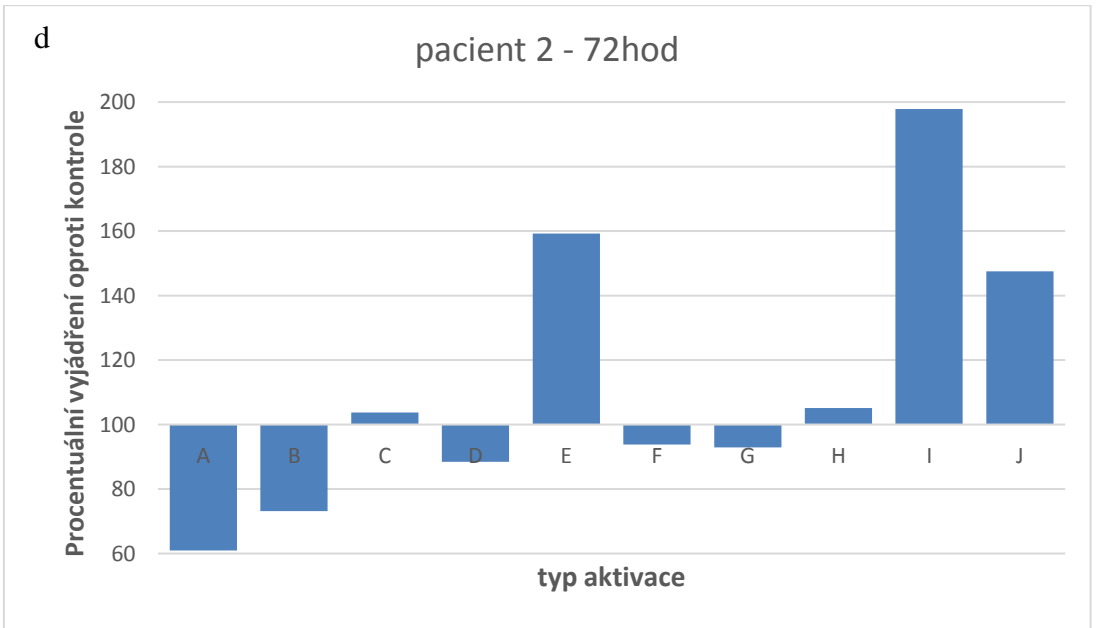
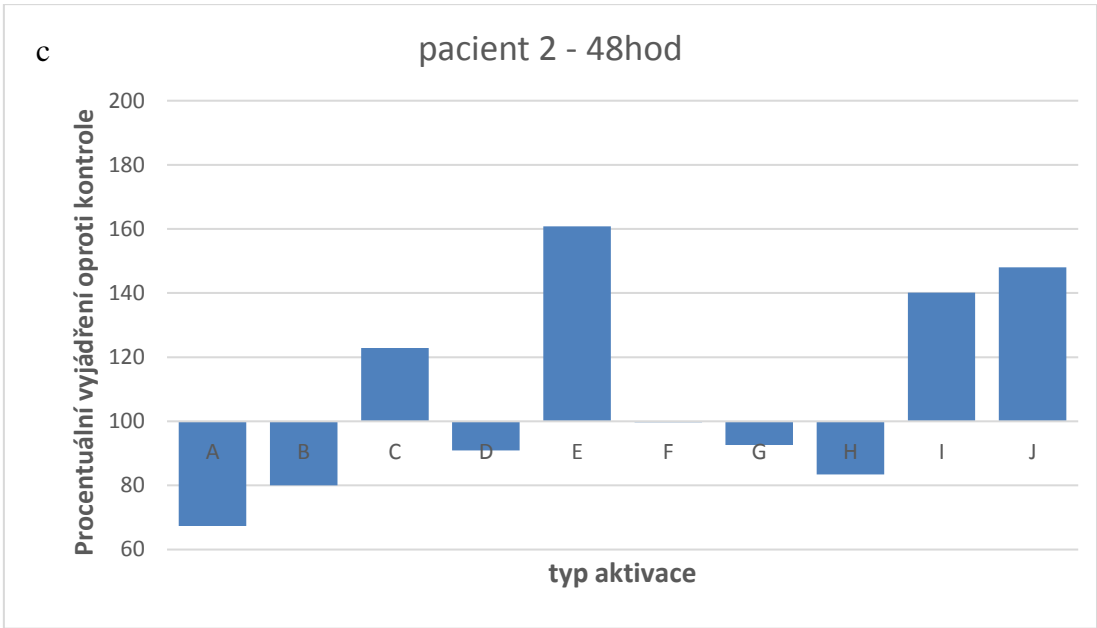
V prvním experimentu se u čtyř pacientů hledala nejvhodnější kombinace látek pro následné testování. Bylo nutné stanovit si optimální kombinaci a optimalizovat kultivační podmínky. U těchto pacientů se neprovádělo statistické zpracování, protože se jednalo o velmi malou skupinu a pouze o pilotní testování. Nejoptimálnější kombinaci po 48 hodinách vykazovalo použití kombinací s DSP30. Nejlepší kombinace DSP30+Pokeweed +IL-2 se prokázala u 3 ze 4 vzorků pacientů. Další možnou vhodnou kombinací bylo použití DSP30+IL-2, kdy u jednoho z pacientů byla aktivace velmi vysoká, u dvou průměrná, ale u jednoho nedosahovala takových dobrých výsledků. Poslední možnou kombinací se jevila kombinace PMA +IL-2, tato kombinace byla u 2 ze 4 velmi účinná. Po 72 hodinách se zdála jako nejoptimálnější kombinací DSP30+Pokeweed +IL-2, ta se prokázala u 3 ze 4 vzorků pacientů. Další možnou vhodnou kombinací bylo použití DSP30+PMA+IL-2, tato kombinace dosahovala stejných hodnot jako předchozí

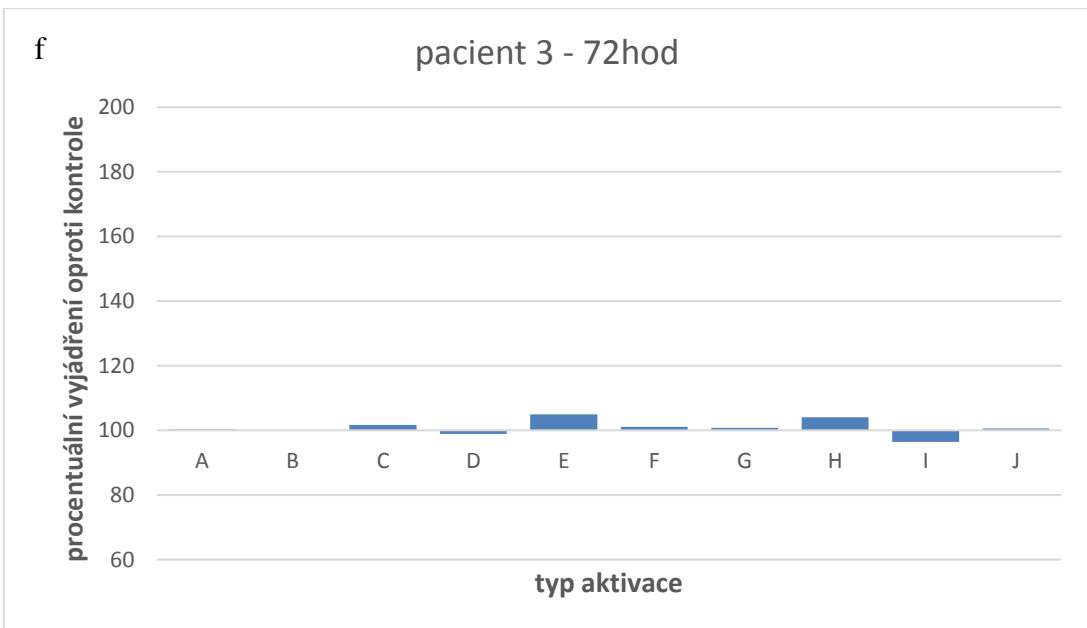
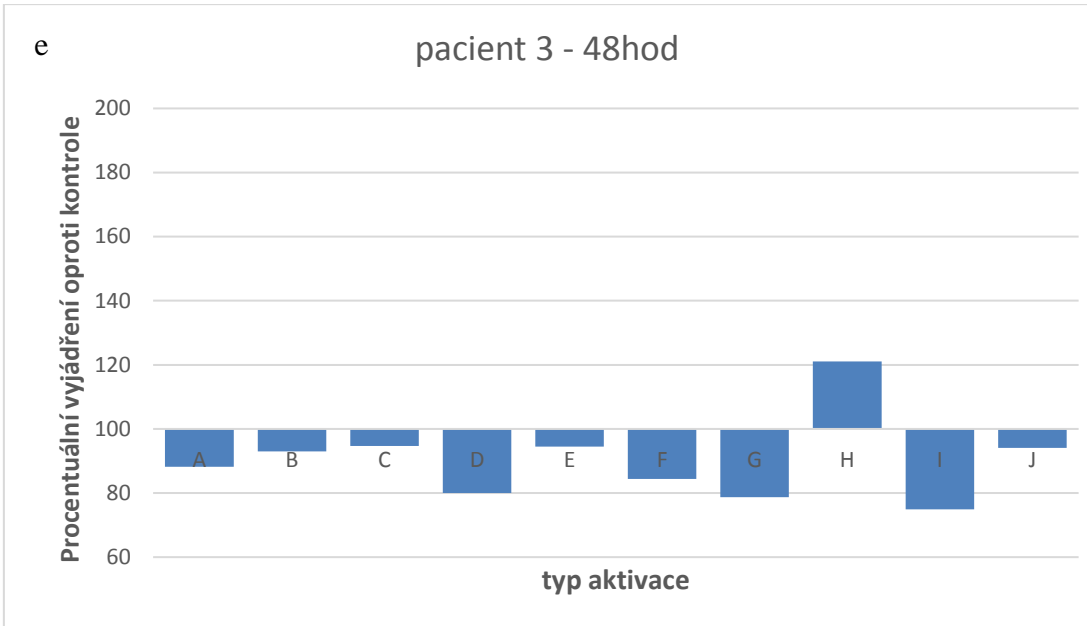
kombinace, kdy 3 ze 4 vzorků pacientů reagovalo velmi dobře. Další vhodnou kombinací se jevila i PMA+IL-2, kde všechny vzorky pacientů dosahovaly k průměrným hodnotám. Prokázalo se u čtyř pacientů s diagnózou CLL, že pro každého pacienta může být nejoptimálnější jiná látka (viz graf. 1a-h).

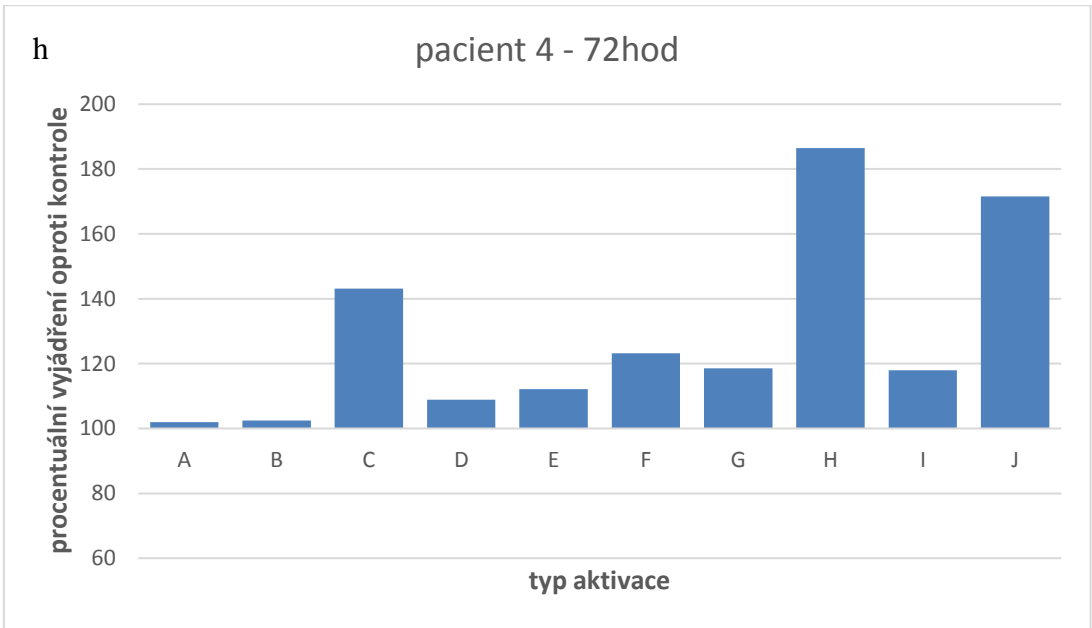
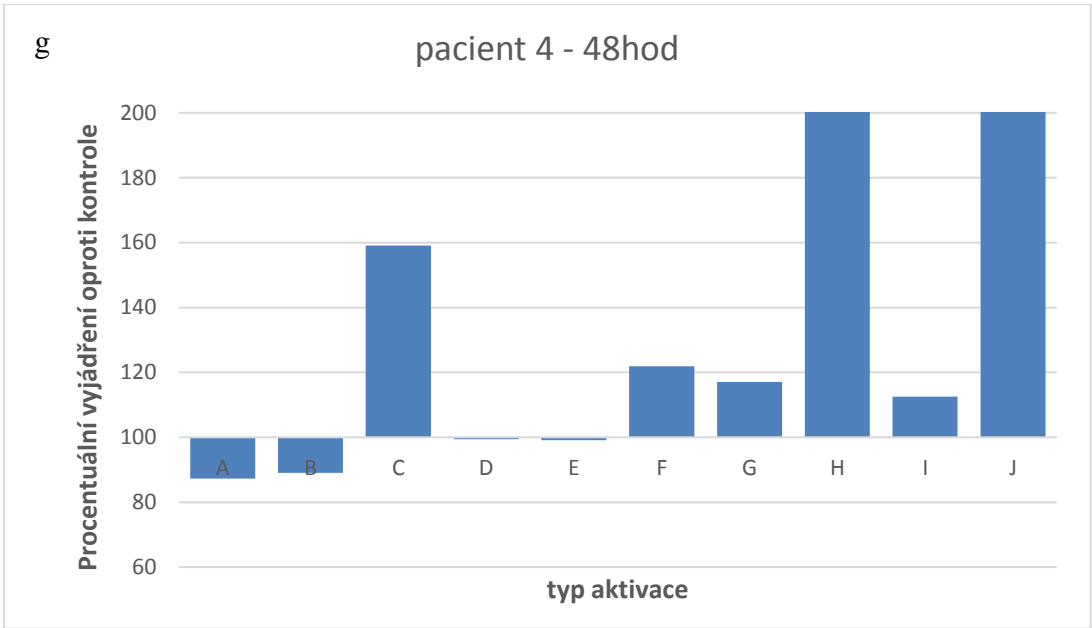
Označení aktivačních látek grafů: A- Pokeweed, B- Pokeweed + IL-2, C- Pokeweed + PMA, D- PMA, E- PMA+IL-2, F- Pokeweed + PMA + IL2, G- DSP30, H - DSP30 +IL2, I- DSP30 +PMA + IL2, J- DSP30 + pokeweed + IL-2

Graf 1 Testování aktivačních látek a jejich kombinace (4 pacienti) a-h



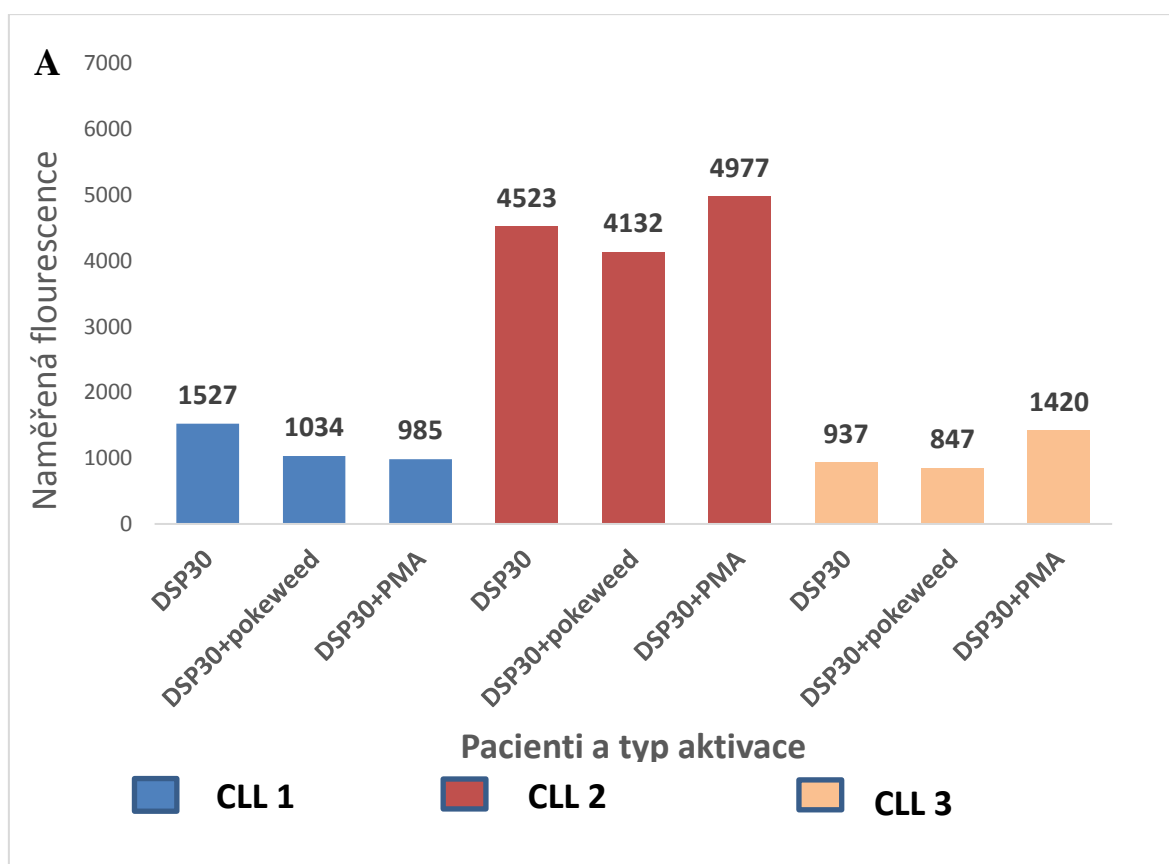


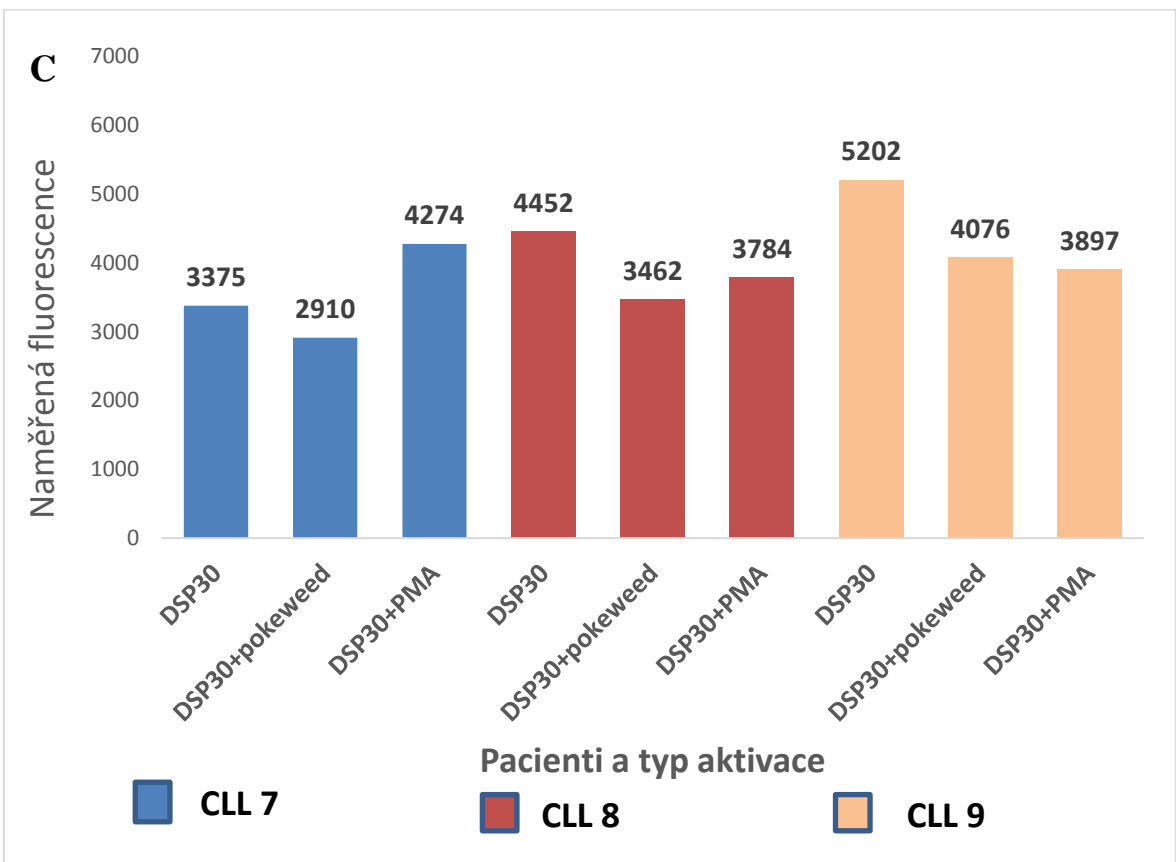
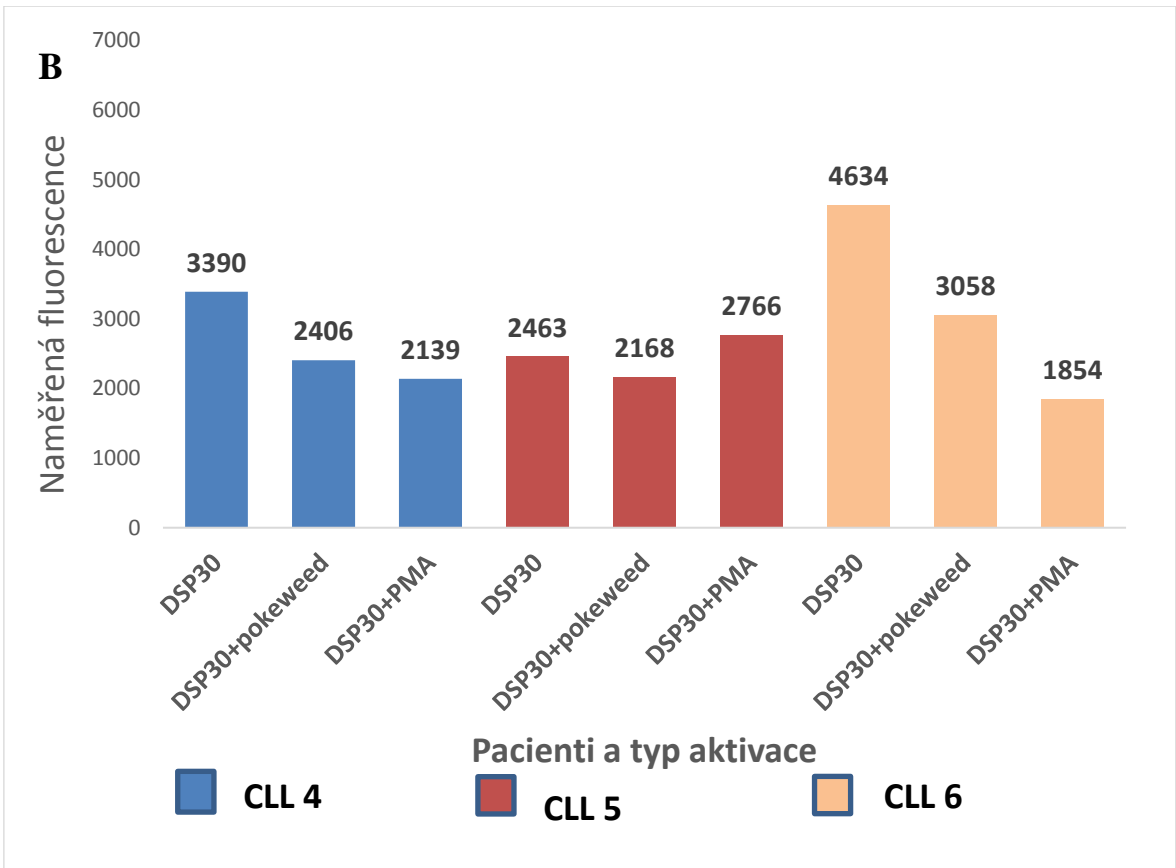


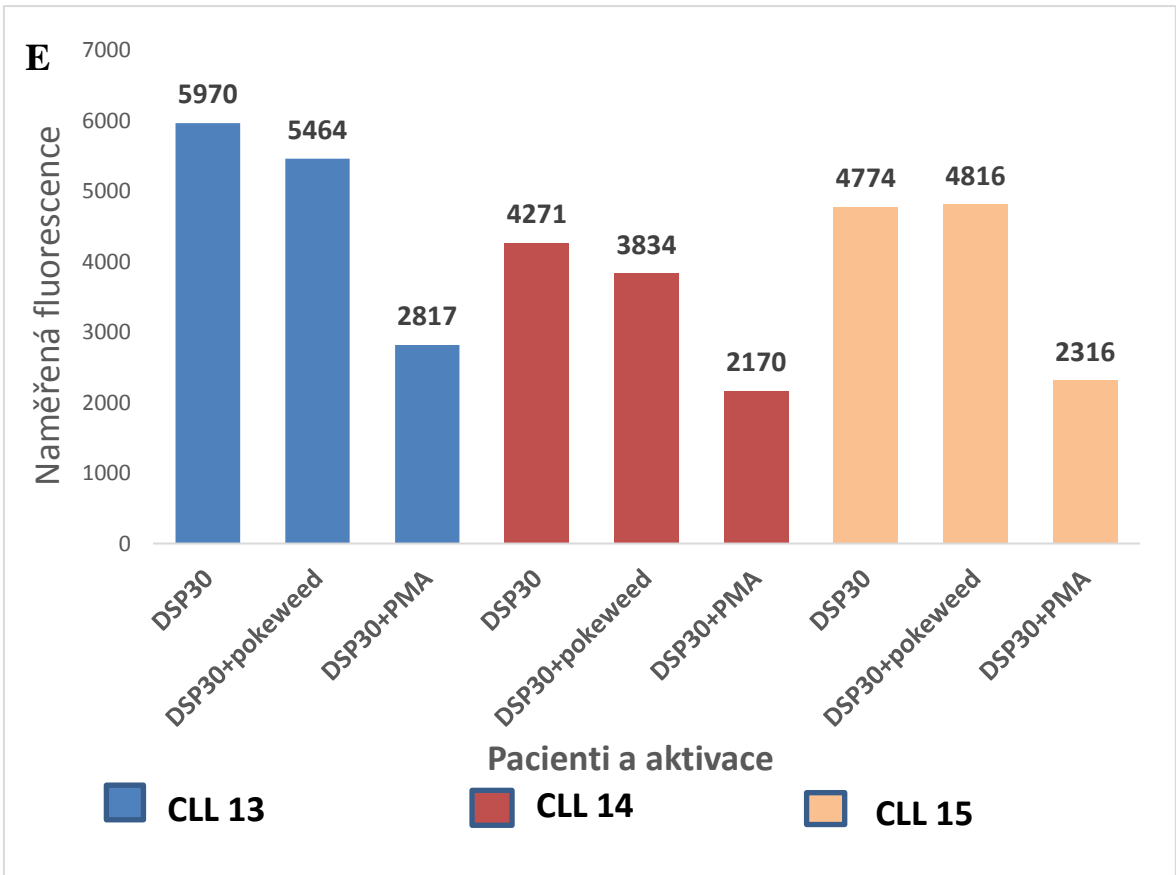
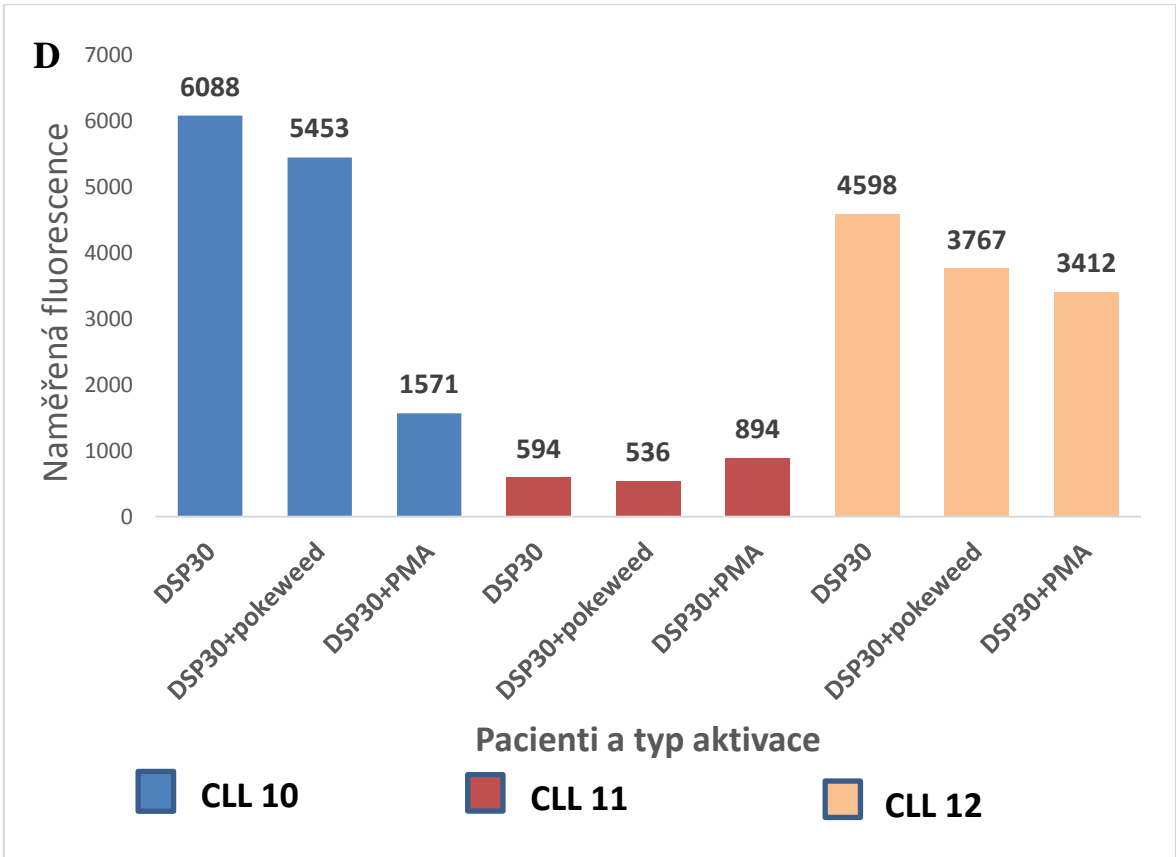


Při druhém experimentu bylo důležité si určit, které vzorky pacientů vykazovaly tak velkou metabolickou aktivitu, aby bylo možné je dále testovat a zařadit k testování chemoterapie. Po aktivaci bylo vybráno 8 nejlepších vzorků pacientů, které byly dále testovány. Tyto vzorky byly nejvhodnější, protože vykazovaly metabolickou aktivitu buď velmi vysokou (++), anebo vysokou (+). Konkrétně: CLL2 (++), CLL5 (+), CLL6 (++), CLL7 (+), CLL8 (++), CLL13 (++), CLL14 (++), CLL15 (++). S těmito vzorky pacientů bylo dále pracováno při dalším testování. Ukázalo se, že nejvíce konzistentními látkami pro aktivaci je DSP30 v kombinaci s IL-2. Proto byla tato kombinace použita pro testování chemoterapie. Výsledky jsou znázorněny na grafu 2A-E u patnácti pacientů s diagnózou CLL

Graf 2 Testování vybraných aktivačních látek a jejich kombinace (15 pacientů) A-E





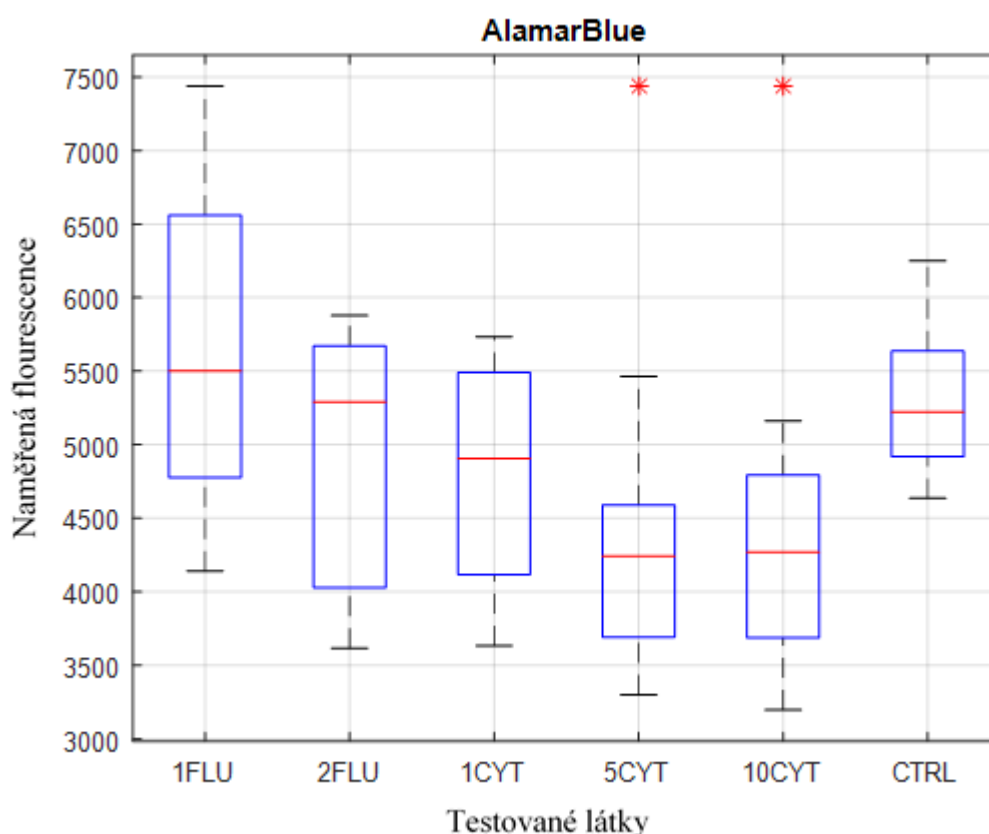


6.3 Testování chemosenzibilizace

Pokles nebo nárůst metabolické aktivity byl sledován u 8 pacientů s CLL. Výsledky byly porovnány vůči kontrole, která neobsahovala chemoterapeutikum, ale pouze testované buňky pacientů.

Pro hodnocení metabolické aktivity byla určena hodnota kontroly jako 100%. Poté se sledovalo, zda je hodnota v jamce s chemoterapií vyšší či nižší. Median změny metabolické aktivity u sledovaných pacientů po podání 1 μ M fludarabinu byl vyšší než kontrola o 10,3% (\pm 20,5%). U vyšší koncentrace, a to u 2 μ M fludarabinu se metabolická aktivita zvýšila o pouze 2% (\pm 16,6%). Podání 1 μ M cytarabinu zapříčinilo pokles metabolické aktivity o 3,3% (\pm 14,4). U koncentrace 5 μ M cytarabinu byl zpozorován již vyšší pokles o 18,2% (\pm 14,5%) a nejvyšší pokles byl zaznamenán u cytarabinu 10 μ M, který snížil metabolickou aktivitu o 21,1% (\pm 13,6). Poslední dva výsledky jsou statisticky významné na hladině $p < 0,05$.

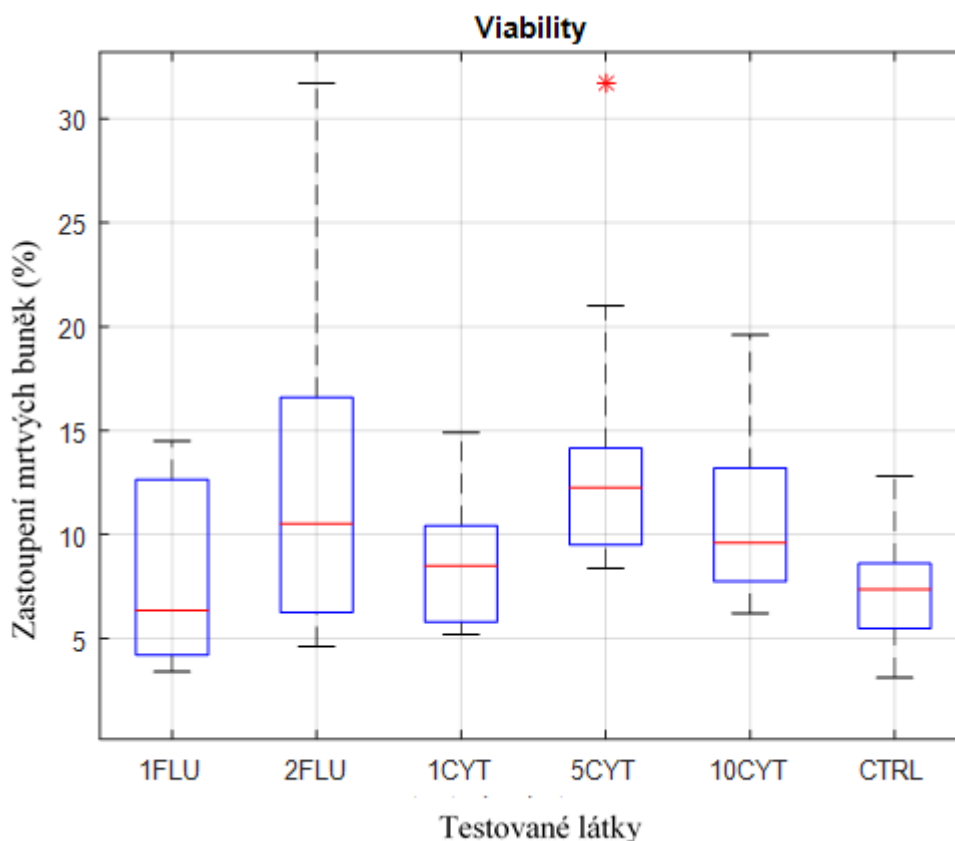
Graf 3 Hodnocení metabolické aktivity pomocí AlamarBlue



Viabilita buněk byla určena pomocí průtokové cytometrie. Od každé naměřené hodnoty ve vzorku s chemoterapií se odečetlo zastoupení mrtvých buněk v kontrolní jamce (tzv. bazální smrt) a sledovalo se zastoupení těchto buněk po aplikaci různé chemoterapie.

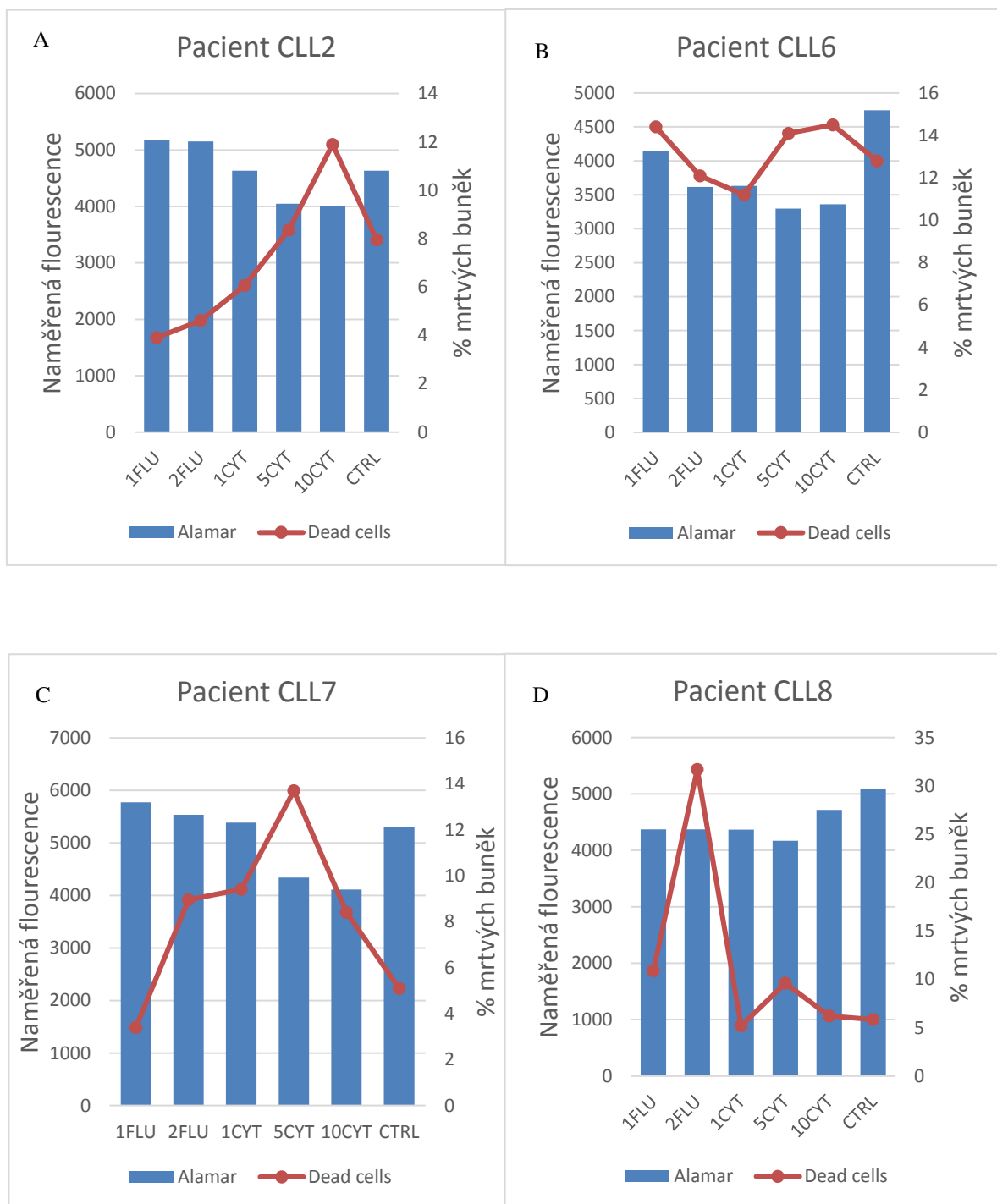
Po aplikaci 1 μ M fludarabinu došlo k zanedbatelnému zvýšení počtu zastoupení mrtvých buněk o 0,6% ($\pm 3,3\%$). Při vyšší koncentraci (2 μ M) se počet mrtvých buněk lehce zvýšil 3,7% oproti kontrole ($\pm 9,4\%$). U cytarabinu o koncentraci 1 μ M se také počet mrtvých buněk téměř nezměnil a vykazoval nárůst pouze o 0,9% ($\pm 3,2$). U 5 μ M koncentrace cytarabinu došlo k nárůstu mrtvých buněk o 5,4% ($\pm 4,1$) a u nejvyšší koncentrace 10 μ M cytarabinu se zásadně nezměnil pouze o 2,7% ($\pm 3,6$). Statisticky signifikantní výsledek byl pouze rozdíl mezi kontrolou a aplikací cytarabinu o koncentraci 5 μ M ($p < 0,05$).

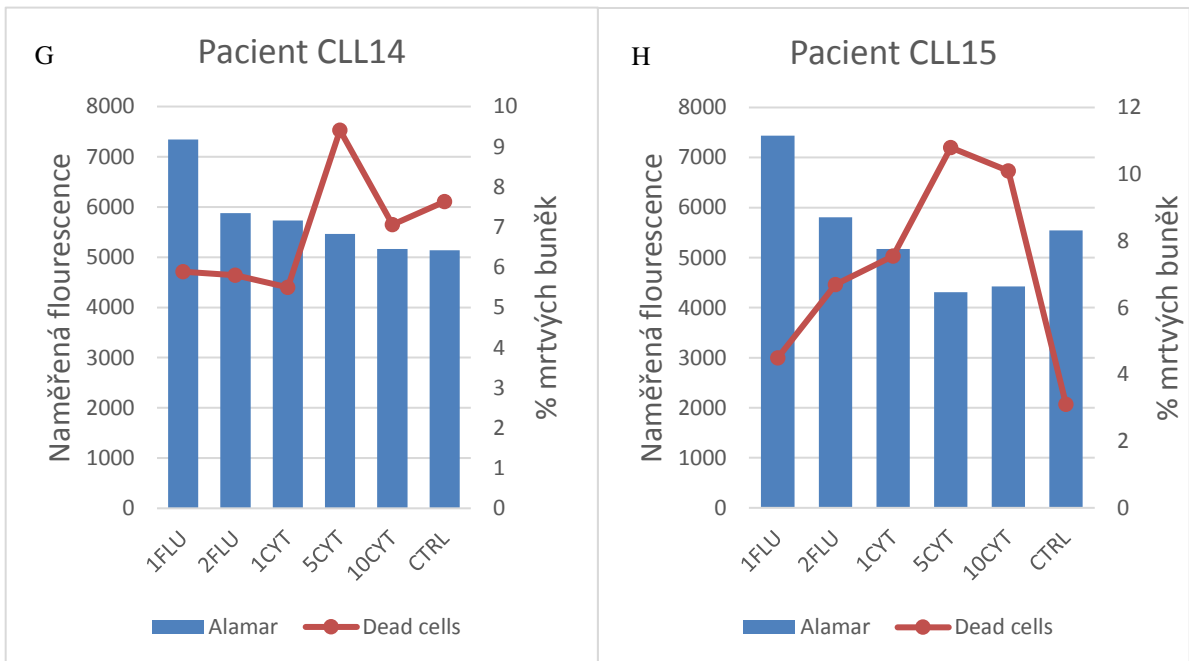
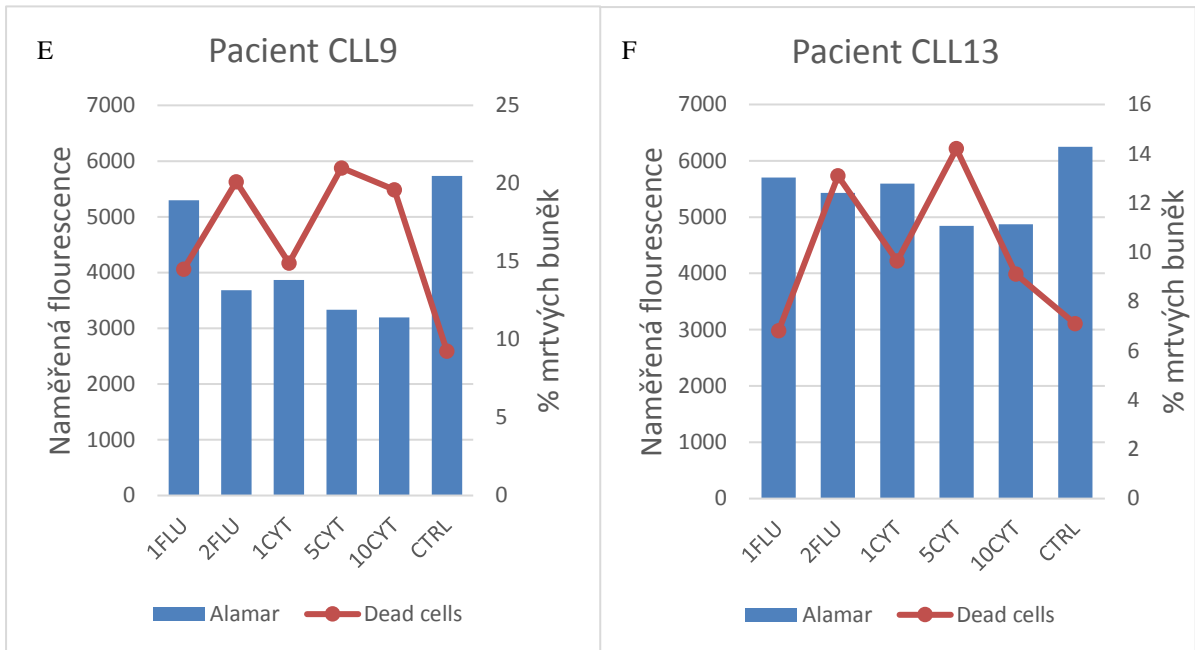
Graf 4 Hodnocení viability buněk



Byl vypočítán korelační koeficient ($R = -0,5$), který neprokázal souvislost mezi metabolickou aktivitou a zastoupením mrtvých buněk.

Graf 5 Výsledky jednotlivých pacientů jsou znázorněny níže na obrázku-A-H





7 Diskuze

Kombinace nízkých dávek chemoterapie a imunoterapie je jednou z možných alternativ, jak lze léčit některé hematologické malignity. Tato kombinace umožňuje aplikaci pouze malých dávek chemoterapie a tím eliminaci jejich nežádoucích účinků. Nízké dávky chemoterapie mohou senzibilizovat nádorové buňky a tím je zviditelnit pro imunitní systém (Nars a kol., 2013, str. 2471–2478). V bakalářské práci jsme se zabývali senzibilací buněk chronické lymfocytární leukemie, což je jedna z nejčastějších hematologických malignit u dospělých jedinců. Pro jejich úspěšné testování musí být buňky nejprve aktivovány, neboť se v kultuře bez aktivátoru nemnoží. V rámci naší práce jsme použili kombinaci několika látek, které jsou běžně používány, jako například pokeweed-mitogen izolovaný z rostliny Líčidlo americké, která slouží jako proliferaci stimulací látka. Po její aplikaci jsme u našich buněk nepozorovali nárůst metabolické aktivity pozorované u mononukleárních buněk (Norian a kol., 2015, str. 265 - 271) a bylo nutné použít kombinaci s DSP30. Stejná zjištění byla zaznamenána u PMA, který aktivuje proteinkinázu C, hrající důležitou roli pro přežívání CLL buněk (Dun a kol., 2018, str. 97-106). Stejně jako u jiných studií je pro proliferaci obvykle potřeba PMA v kombinaci s jinými látkami (Miyamoto a kol., 2000, str. 28 - 42), jako například s oligonukleotidy, které jsme používali v naší studii. DSP30 je směs oligonukleotidů, která je schopna stimulovat proliferaci a zároveň IL-2 receptor, proto v kombinaci s IL-2 působí jako silný mitogen (Struski a kol., 2009, str. 617-619).

Z literatury vyplývá, že IL-2 má navíc protiapoptický efekt (Decker a kol., 2010, str. 1125–1132), čímž zabraňuje narůstání zastoupení mrtvých buněk v kultuře. Tato kombinace bývá často používána při cytogenetických vyšetřeních (Liaw a kol., 2014, str. 545–553; Dun a kol., 2018, str. 260–267). Tyto dvě látky jsme následně používali při testování dvou běžně používaných chemoterapeutik v dávce, která buňky ovlivní, ale nezabije.

Fludarabin je nejčastěji využívaným chemoterapeutikem při léčbě hematologických malignit. Běžně je využíván pro léčbu chronické lymfocytární leukemie (CLL). Funguje na principu blokace transkripce a translace. Začleňuje se do RNA a inhibuje svými metabolity DNA polymerázu a ribonukleotidreduktázu. Dojde k porušení translace, kdy nemůže dojít k syntéze DNA z RNA a dochází k apoptóze buňky (Pettitt a kol., 2003, str. 692–702). Dalším námi testovaným chemoterapeutikem byl cytarabin, tento analog cytosinu se v těle přeměňuje na cytosin arabinosid-3-P. Metabolit cytarabinu blokuje DNA

polymerázu, která nemůže prodlužovat řetězec při replikaci, a tím se poruší buněčný cyklus buňky (Sampath a kol., 2003, str. 9063–9074). Nejčastěji je používán u chronických forem hematologických malignit nebo u pacientů v remisi. Při podání chemoterapeutik může docházet ke zvýšení exprese stresu asociovaných molekul (Landreneau a kol., 2015, str. 57–64; Zingoni a kol., 2017) a ke zviditelnění takto poškozených buněk pro imunitní dozor.

Stresem, který na buňky působí při aplikaci chemoterapeutik, se stane, že buňka v sobě začíná vytvářet a hromadit nesmyslné a nefunkční proteiny a molekuly. Stres velmi zatěžuje buňku, ta není schopna sebereparace a může dojít až k jejímu úmrtí. Tyto molekuly bývají často spojeny se stresem mitochondriálním (Schaefer, 2014, str. 35237-35245), a tím se dá předpokládat, že dojde také k porušení metabolismu i v případě, že nedochází k úmrtí buňky. Naše data ukázala, že pouze cytarabin ve vyšší koncentraci je schopen indukovat změny metabolismu, který se projevil snížením signálů Alamar Blue o přibližně 20% ve srovnání s kontrolou. Tento jev nebyl pozorován u viability, kde v případě nejvyšší koncentrace nebyl zaznamenán rozdíl mezi kontrolou a ošetřeným vzorkem, což se dá vysvětlit rozpadem umírajících buněk a jejich nemožností detekce. Proto se jeví Alamar Blue jako přesnější nástroj na sledování reakce buněk na chemoterapeutika. Její využití ve studiu cytotoxického efektu využili i jiné studie, kde bylo prokázáno, že Alamar Blue je účinný nástroj pro testování reakce buněk (Rampersad, 2012, str. 12347-12360; O'Brien a kol., 2000, str. 5421-5426, 15).

V běžné klinické praxi se bohužel nepoužívá testování in vitro pro sledování účinku chemoterapie. V kulturách je velmi dobře vidět, jak buňka prospívá či naopak neprospívá. Také je dobře znatelné, jaké chemoterapeutikum o určité dávce na buňky nejlépe působí. Výsledky ukázaly, co přesně se v jednotlivých kulturách po přidání buďto aktivačních látek, nebo nízkých dávek chemoterapie, děje. Každý vzorek pacienta byl jedinečný a proto je nutné testovat primárně vzorky oproti komerčním liniím. Pouze tyto výsledky mohou specifikovat podmínky pro použití kombinace imunoterapie a nízkých dávek chemoterapie.

8 Závěr

Z našich výsledků vyplývá, že aplikace nízkých dávek chemoterapie ovlivňuje buněčný metabolismus bez výrazného vlivu na viabilitu buněk. Ovlivnění buněk nízkými dávkami chemoterapie může být nástroj pro zvýšení účinnosti buněčné imunoterapie bez zvyšování nežádoucích účinků nesespecifických látek. Naše hypotéza byla potvrzena.

Tato práce byla podpořena grantem MZČR č15-30661A.

SEZNAM LITERATURY

ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H. H., PILLAI, Shiv. (2015) *Cellular and Molecular Immunology*. 8.vydání, Philadelphia: Elsevier, ISBN 9780323316149

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK, (2008) *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, ISBN 9788024725024.

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK, (2010) *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén, ISBN 9788072626489.

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK, (2011) *Obecná onkologie*. Praha: Galén, ISBN 9788072627158.

ALKAN, Serhan, HUANG Qin, ERGIN Melek, DENNING, Mitchell F. a kol. (2005) Survival Role of Protein Kinase C (PKC) in Chronic Lymphocytic Leukemia and Determination of Isoform Expression Pattern and Genes Altered by PKC Inhibition. *American Journal of Hematology*, 79:97–106. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ajh.20352>

BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK, (2011) *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, ISBN 978-80-247-3533-7.

BEARE Alice, STOCKINGER Hannes, ZOLA Heddy, NICHOLSON Ian, (2008) *The CD system of leukocyte surface molecules*. Current Protocols in Immunology. Supplement 80, Appendix 4A. DOI: 10.1002/0471142735.ima04as80

BRYCHTOVÁ, Yvona, Anna PANOVSÁ a Michael DOUBEK, (2016) *Chronická lymfocytární leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké*. Brno: Pro Českou leukemickou skupinu-pro život (CELL) vydalo nakladatelství Kmen, spol., ISBN 9788090621251.

DE VRIES, JF, JH FALKENBURG, R WILLEMZE a RM BARGE. (2016) The Mechanisms Of Ara-C-Induced Apoptosis Of Resting B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Haematologica* [online]. Itálie: Ferrata Storti Foundation, [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <http://www.haematologica.org/content/91/7/912>

DECKER, Thomas, BOGNER, Christian, OELSNER, Madlen, PESCHEL, Christian, RINGSHAUSEN, Ingo (2010) Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors. *Ann Hematol* 89: 1125. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00277-010-0994-1>

DUN, Karen A., RILEY, Louise A., DIANO Giuseppe, ADAMS, Leanne B., CHIU Eleanor, SHARMA Archana. (2018) DSP30 and interleukin- 2 as a mitotic stimulant in B- cell disorders including those with a low disease burden. *Genes Chromosomes Cancer* 57(5):260-267 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/gcc.22527>

FABER, Edgar, (2012) *Základy hematologické diagnostiky*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, ISBN 9788024429359..

FARSA, Oldřich (2013). Terapeutické monoklonální protilátky v léčbě a vývoji. *Chem.Listy* 464-470. [cit. 2018-03-13] Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_06_464-470.pdf

FORETOVÁ, Lenka, Marek SVOBODA a Ondřej SLABÝ, (2014) *Molekulární genetika v onkologii*. Praha: Mladá fronta - Medical Services, Aeskulap. ISBN 9788020432360..

HAFERLACH, Torsten, (2014) *Kapesní atlas hematologie: překlad 6., přepracovaného vydání*. Praha: Grada, ISBN 9788024747873.

HOŘEJŠÍ, Václav, (2013) *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, ISBN 9788073877132.

JANÍKOVÁ, A., MICHALKA, J., ŠÁLEK, J., FABIAN, P., MOULIS, M., KRÁL, Z., MAYER (2011). *Folikulární lymfom a další indolentní B-lymfomy*. *Postgraduální medicína* 03/2011. , [cit. 2018-03-13]

JÍLEK, Petr (2016). *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada, ISBN 978802477792

KLENER, Pavel, (1996) *Protinádorová chemoterapie*. Praha: Galén, ISBN 8085824361

KLENER, Pavel, (2010) *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada, ISBN 9788024728087

KLENER, Pavel, (2011) *Základy klinické onkologie*. Praha: Galén, ISBN 9788072627165.

LANDRENEAU, Joshua P., SHURIN, Michael R., AGASSANDIAN, Marianna V., a kol. (2015). Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy. *Cancer Microenvironment*, 8(2), 57–64. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1007/s12307-013-0141-3>

LIAW, Fiona Pui San, LAU, Lai Ching, LIM, Alvin Soon Tionget a kol. (2014) CpG Oligonucleotide and Interleukin 2 stimulation enables higher cytogenetic abnormality detection rates than 12-o-tetradecanolyphorbol-13-acetate in Asian patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *International Journal of Hematology* 100:545–553 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12185-014-1681-0>

MAYER, Jiří, a kol. (2016) *Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. Praha: Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně, ISBN 9788026097181.

MIYAMOTO, Suzanne, KIMBAL, L Scot R., SAFER Brian. (2000) Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1494: 28-42. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00208-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00208-6)

NARS Mariana, S. a KANENO Ramon. (2013) Immunomodulatory effects of low dose chemotherapy and perspectives of its combination with immunotherapy. *International Journal of Cancer.*, (132), 2471–2478. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ijc.27801>

NAVRÁTIL, Leoš a kol. (2008) *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotní obory*. Praha: Grada, ISBN 9788024723198.

NORIAN, Reza., DELIREZH, Nowruz, AZADMEHR, Abbas. (2015). Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Research Forum*, 6(4), 265–271. [cit. 2018-03-13] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4769330/>

O'BRIEN, John, WILSON, Ian, ORTON, Terry, POGNAN, François (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *The FEBS Journal*. 267(17):5421-6. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

PANOVSKÁ, Anna a Michael DOUBEK,(2013) Chronická lymfocytární leukemie – diagnostika a léčba. *Onkologie*[online]. Brno: Solen, [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://onkologiecs.cz/pdfs/xon/2013/03/04.pdf>

PARHAM, Peter. (2015) The immune system. New York, Garland Science Taylor & Francis Group LLC, ISBN 9780815344667

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, (2011) *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, ISBN 9788024734590

PETTITT, Andrew R. (2003) Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of Haematology* 121(5):692-702. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04336.x>

POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER, (2013) *Molekulární hematologie*. Praha: Galén, ISBN 9788072629428.

RAMPERSAD, Sephra N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(9), 12347–12360. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <http://doi.org/10.3390/s120912347>

RICCI, Francesca, TEDESCHI, Alessandra, MORRA, Enrica, MONTILLO, Marco (2009). Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 5, 187–207. [cit. 2018-03-13]

ROTH , Christine G. a ROTH, Kaaren K REICHARD (2012). Subtle bone marrow involvement by large B-cell lymphoma with pronormoblast-like morphology and prominent but not exclusive sinusoidal distribution. *American Journal of Blood Research*, 2(2), 113–118. , [cit. 2018-03-13]

SAMPATH, Deepa, RAO, V Ashutosh., PLUNKETT William. (2003) Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 22, 9063–9074 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/1207229>

SCHAEFER, Liliana. (2014). Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35237-35245. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1074/jbc.R114.619304>

SCHROERS R, GRIESINGER F, TRÜMPER L., a kol. (2005) Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Front Leukemia*, publ. 19, part 750-758, [15.1.18] Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/2403707>

STRUSKI S, GERVAIS C, HELIAS C, a kol. (2009) Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities. *Leukemia* 23, 617–619 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/leu2008252>

VOKURKA, Samuel, (2008) *Základní hemato-onkologická onemocnění a jejich charakteristiky*. Praha: Nakladatelství Galén, ISBN 9788072625536.

VORLÍČEK, Jiří, a kol., (2012) *Onkologie*. Praha: Triton, Lékařské repetitorium. ISBN 9788073876036.

VYDRA, Jan a Petr CETKOVSKÝ, (2015) *Hematologie v kostce*. Praha: Mladá fronta, Aeskulap. ISBN 9788020436986.

ZILFOU, Jack T., LOWE, Scott W. (2009). Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), a001883. [cit. 2018-03-13] <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a001883>

ZINGONI, Alessandra, FIONDA, Cinzia, BORRELLI, Cristiana, a kol. (2017). Natural Killer Cell Response to Chemotherapy-Stressed Cancer Cells: Role in Tumor Immunosurveillance. *Frontiers in Immunology*, 8, 1194. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01194>

PŘÍLOHY

Příloha 1 Charakterizace souboru pacientů

ID ve studii	Diagnóza	Konfirmace FACS?	Cytogenetika	stupeň dle Raie	Ročník	pohlaví
CLL1	C911	ANO	del.13q	3	1948	žena
CLL2	C911	ANO	bez aberací	2	1973	muž
CLL3	C911	ANO	del.13q	4	1942	muž
CLL4	C911	ANO	trisomie chromosomu 2	0	1942	muž
CLL5	C911	ANO	cytogen. t(1;14), t(2;14)	4	1949	muž
CLL6	C911	ANO	t(14;19)(q32;q13)	1	1955	muž
CLL7	C911	ANO	der(12)t(6;12); trisomií chromosomu 12	2	1950	muž
CLL8	C911	ANO	del 13q	0	1961	žena
CLL9	C911	ANO	komplexní karyotyp	3	1947	muž
CLL10	C911	ANO	der(18)t(4;18)(q1?2;p11.?2);del(6)(q21q22)	1	1949	muž
CLL11	C911	ANO	del.13q14	2	1953	muž
CLL12	C911	ANO	del(10)(q22)	1	1937	žena
CLL13	C911	ANO	nevyšetřeno	3	1947	muž
CLL14	C911	ANO	delecí lokusu D13S319 (13q14)	0-1	1941	muž
CLL15	C911	ANO	nevyšetřeno	0	1955	žena

vlastní data Hematologicko-onkologického oddělení, FN Plzeň

Příloha 2 Prognóza podle mutací

Nepříznivá prognóza	Nemutovaný IgVH gen, delece 11q, delece 17p
Standartní prognóza	Trisomie 12, normální genetický nález
Příznivá prognóza	Delece 13q

Zdroj: Foretová, Svoboda, Slabý, 2014, str. 33

Příloha 3 Povolení sběru informací FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 09668666 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní
Pavčina Mrázová
Studentka oboru Zdravotní laborant
Fakulta zdravotnických studií - Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných na *Hematologicko-onkologickém oddělení (HOO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Testování chemosenzitivity leukemických buňek*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní sestra HOO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a **pod přímým vedením** oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **Mgr. Monika Holubová, Ph. D., db. prac. v laboratorních metodách HOO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

25. 10. 2017

SEZNAM ZKRATEK

7-AAD – 7-aminoactinomycin D

ATB – Antibiotika

ATM gen – ataxie telangiectasia gene

BCR – B-buněčný receptor pro antigen (B-cell receptor)

CLL – chronická lymfocytární leukemie (chronic lymphocytic leukemia)

CO₂ – oxid uhličitý

ČR – Česká Republika

DLBCL – Difuze Large B-Cell Lymphoma

DMSO - Dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)

DSP30 – aktivační látka

FBS – Fetal Bovine Serum

FISH – Fluorescenční insitu hybridizace

FMC-7 - protilátka detekující antigen exprimovaný B buňkami

FN- Fakultní nemocnice

IgM – imunoglobulin

IL - interleukin

MLL gen – myeloid/lymphoid leukemia or mixed lineage leukemia

NK buňky - přirození zabíječi (natural killer)

NUNC - firma

PBS – fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)

PCR – polymerázová řetězová reakce

PMA – Phorbol-12-Myristate-13-Acetate

RNA – ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid)

RPMI – kultivační médium pro leukemické buňky (Roswell Park Memorial Institute)

TPP – destička

USA – Spojené státy Americké (United States of America)

WBC – White blood cell

ZČU – Západočeská univerzita

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Vývoj krevních buněk	12
Obr. 2 Buňky CLL v mikroskopickém nátěru kostní dřeně	20
Obr. 3 Ukázka detekce CLL buněk	20
Obr. 4 Výsledná čistota a viabilita buněk po izolaci a kultivaci.	32

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Příklady typických znaků pro dané leukocytární subpopulace	13
Tab. 2 Přehled lokalizace a funkce imunoglobulinových tříd	16
Tab. 3 Aktivační látky a jejich kombinace	29

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Testování aktivačních látek a jejich kombinace (4 pacienti) a-h	33
Graf 2 Testování vybraných aktivačních látek a jejich kombinace (15 pacientů) A-E.....	37
Graf 3 Hodnocení metabolické aktivity pomocí AlamarBlue	40
Graf 4 Hodnocení viability buněk	41
Graf 5 Výsledky jednotlivých pacientů jsou znázorněny níže na obrázku-A-H.....	42

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Charakterizace souboru pacientů	52
Příloha 2 Prognóza podle mutací.....	52
Příloha 3 Povolení sběru informací FN Plzeň	53