

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

2021

Petra Šmejkalová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Petra Šmejkalová**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**SLEDOVÁNÍ VLIVU CHEMOTERAPIE NA  
HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY V REÁLNÉM ČASE**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D.

PLZEŇ 2021

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Petra ŠMEJKALOVÁ**  
Osobní číslo: **Z18B0144P**  
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Sledování vlivu chemoterapie na hematologické malignity v reálném čase**  
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

### Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

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

Seznam doporučené literatury:

- DOLEŽALOVÁ, Lenka, 2016. Cílená léčba u nádorových onemocnění krve. *Solen*. 133 – 137, 5.
- INDRÁK, Karel, 2014. *Hematologie a transfúzní lékařství*. Praha: Stanislav Juhaňák – TRITON. ISBN 978-7387-722-4.
- POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER, 2013. *Molekulární hematologie*. Praha 5: Galén. ISBN 978-80-7262-942-8.
- VYDRA, Jan, Jan NOVÁK a Marie LAUERMANNOVÁ, 2019. *Hematologie v kostce*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha 4: Mladá fronta a. s. ISBN 978-80-204-5140-8.
- GEORGE, Enitza D. a Richard SADOVSKY, 1999. Multiple Myeloma: Recognition and Management. *American Family Physician*. 59(7), 1885. ISSN 0002-838X, 1532-0650.

Vedoucí bakalářské práce: **MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D.**  
Katedra záchranářství, diagnostických oborů  
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **1. června 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**



**PhDr. Lukáš Štich, MBA**  
děkan



**Mgr. Stanislava Reichertová**  
vedoucí katedry

V Plzni dne 29. ledna 2021

## **Prohlášení**

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

V Plzni dne 19. 3. 2021

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Šmejkalová Petra

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů, a veřejného zdravotnictví

Název práce: Sledování vlivu chemoterapie na hematologické malignity v reálném čase

Vedoucí práce: MUDr. Miroslava Čedíková Ph.D.

Počet stran – číslované: 43

Počet stran – nečíslované: 22

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 56

Klíčová slova: AML, chemoterapie, imunoterapie, MM

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce se zabývá tematikou hemato-onkologických malignit, které představují širokou skupinu onemocnění postihující kostní dřeň a lymfatické uzliny. Cílem práce byla identifikace vhodného typu a koncentrace chemoterapie pro navazující experimenty s kombinovanou imunoterapií NK buňkami. Tato kombinace by mohla vést ke snížení užívaných dávek chemoterapie a tedy i k možnosti předcházení či snížení závažnosti nežádoucích účinků vyskytujících se při chemoterapii. V práci bylo pracováno s buněčnými liniemi, které reprezentovaly 2 onemocnění – akutní myeloidní leukémii a mnohočetný myelom. Tyto linie byly vystaveny účinkům cytrabinu, doxorubicinu, venetoclaxu a bortezomibu. Efekt jednotlivých látek byl sledován a následně analyzován na přístroji IncuCyte®.

## **Abstract**

Surname and name: Šmejkalová Petra

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

Title of thesis: Monitoring of the effect of chemotherapy on hematological malignancies in real time

Consultant: MUDr. Miroslava Čedíková, Ph. D.

Number of pages – numbered: 43

Number of pages – unnumbered: 22

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 56

Keywords: AML, chemotherapy, immunotherapy, MM

### Summary:

This bachelor thesis deals with haemato-oncological malignancies that represent a wide range of diseases that affect bone marrow and lymph nodes. The aim of the study was to identify the appropriate type and concentration for follow-up experiments use in subsequent combination immunotherapy with NK cells. This combination could result in fewer chemotherapy doses and thus less risk of side effects. In this work it was worked with cell lines which represent the two cases – acute myeloid leukemia and multiple myeloma. These lines will be exposed to the action of cytarabine, doxorubicine, venetoclax and bortezomib. The effect of each substance was monitored and then analyzed on the IncuCyte® machine.

## **Předmluva**

Domnívám se, že mé zvolené téma bakalářské práce je v dnešní době stále aktuálním a rozšiřujícím se problémem. V léčbě hematologických malignit lze uplatnit řadu postupů a jedním z nich je kombinovaná terapie.

## **Poděkování**

Děkuji MUDr. Miroslavě Čedíkové, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad, materiálních podkladů a čas, který mi věnovala. Dále děkuji Lékařské fakultě v Plzni, že jsem mohla v laboratoři nádorové biologie a imunoterapie provést svůj výzkum.



# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	12
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	13
SEZNAM TABULEK .....	14
SEZNAM ZKRATEK .....	15
ÚVOD .....	18
TEORETICKÁ ČÁST .....	19
1 HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY .....	19
1.1 Charakteristika .....	19
1.2 Klasifikace hematologických malignit .....	20
1.3 Incidence a etiologie .....	21
1.3.1 Ionizující záření .....	21
1.3.2 Chemikálie .....	21
1.3.3 Lékařská terapie a zdravotní stav .....	21
1.3.4 Genetické poruchy .....	21
1.3.5 Infekce .....	21
1.4 Diagnostika .....	22
1.5 Terapie .....	22
2 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE .....	23
2.1 Charakteristika .....	23
2.2 Krevní obraz .....	23
2.3 Incidence .....	23
2.4 Etiologie .....	24
2.5 Klinické projevy .....	24
2.6 Diagnostika .....	25
2.7 Klasifikace .....	25
2.8 Terapie .....	25
2.9 Prognóza .....	26
3 MNOHOČETNÝ MYELOM .....	27
3.1 Charakteristika .....	27
3.2 Incidence a epidemiologie .....	27
3.3 Etiologie .....	28
3.4 Klinické projevy .....	28
3.4.1 Hyperkalcémie .....	28
3.4.2 Renální selhání .....	28
3.4.3 Anémie .....	28

3.4.4	Onemocnění kostí .....	29
3.5	Diagnostika .....	29
3.6	Terapie.....	29
3.6.1	Kortikosteroidy .....	29
3.6.2	Chemoterapie .....	29
3.6.3	Monoklonální protilátky .....	30
3.7	Prognóza.....	30
4	LÉČBA HEMATOONKOLOGICKÝCH MALIGNIT.....	31
4.1	Konvenční protinádorová terapie .....	31
4.1.1	Antimetabolity .....	31
4.1.2	Klasická genotoxická cytostatika.....	34
4.1.3	Zesílení účinku genotoxických cytostatik.....	35
4.1.4	Antimitotika .....	35
4.1.5	Inhibice proteosyntézy a degradace proteinů.....	36
4.1.6	Další možné mechanismy účinku .....	36
4.1.7	Nežádoucí účinky chemoterapie .....	37
4.1.8	Rezistence k chemoterapii .....	37
4.2	Imunoterapie .....	38
4.2.1	Formy imunoterapie.....	38
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	40
5	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	40
5.1	Hlavní cíl.....	40
5.2	Dílčí cíle .....	40
6	METODIKA PRÁCE .....	41
6.1	Materiál a reagensie .....	41
6.1.1	Buněčné linie .....	41
6.1.2	Materiál .....	41
6.1.3	Reagensie.....	41
6.1.4	Přístroje.....	42
6.2	Buněčné linie.....	42
6.2.1	Linie KG – 1a .....	42
6.2.2	Linie RMPI 8226 .....	42
6.3	Rozmrazení buněk a jejich kultivace .....	42
6.4	Testování účinku chemoterapie.....	43
6.5	Přístroj IncuCyte® .....	44
6.5.1	Příprava destičky do přístroje IncuCyte® a aplikace buněk.....	45
6.5.2	Aplikace chemoterapie a fluorescenční próby.....	45

6.5.3	Analýza výsledků z přístroje IncuCyte® .....	47
7	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝLEDKŮ .....	49
	DISKUZE .....	58
	ZÁVĚR .....	61
	SEZNAM LITERATURY .....	62

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Graf závislosti počtu mrtvých buněk při různých typech chemoterapie a rozdílných koncentrací u linie KG - 1a na čase .....	50
Graf 2: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích cytarabinu u linie KG - 1a.....	50
Graf 3: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích doxorubicinu u linie KG - 1a .....	51
Graf 4: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích bortezomibu u linie KG - 1a .....	51
Graf 5: Graf počtu mrtvých buněk (rozdíl počtu mrtvých buněk mezi koncem a začátkem měření) v závislosti na jednotlivých typech chemoterapie u linie KG - 1a....	52
Graf 6: Graf závislosti počtu mrtvých buněk při různých typech chemoterapie a rozdílných koncentrací u linie RPMI 8226 na čase .....	54
Graf 7: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích cytarabinu u linie RPMI 8226.....	55
Graf 8: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích veteloclaxu u linie RPMI 8226 .....	55
Graf 9: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích bortezomibu u linie RPMI 8226 .....	56
Graf 10: Graf počtu mrtvých buněk (rozdíl počtu mrtvých buněk mezi koncem a začátkem měření) v závislosti na jednotlivých typech chemoterapie u linie RPMI 8226 .....	56

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vývoj kmenových buněk .....	19
Obrázek 2: Buňky AML v mikroskopickém nátěru kostní dřeně.....	23
Obrázek 3: Buňky MM v mikroskopickém nátěru kostní dřeně .....	27
Obrázek 4: Přístroj IncuCyte® v termostatu .....	44
Obrázek 5: Schéma finálně připravené destičky s linií KG-1a.....	46
Obrázek 6: Schéma finálně připravené destičky s linií RPMI 8226.....	46
Obrázek 7: Ukázka nastavení analýzy v softwaru IncuCyte® I. ....	47
Obrázek 8: Ukázka nastavení analýzy v softwaru IncuCyte® II.....	48
Obrázek 9: Detail označení mrtvých buněk v softwaru IncuCyte® .....	48
Obrázek 10: Efekt vybraného typu chemoterapie a její koncentrace u linie KG-1a .....	53
Obrázek 11: Efekt vybraného typu chemoterapie a její koncentrace u linie RPMI 8226 .....	57

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: WHO klasifikace hematologických malignit .....	20
Tabulka 2: Nežádoucí účinky chemoterapie .....	37

## SEZNAM ZKRATEK

5 - FU .....	5 - fluorouracil
6 - MP.....	6 - merkaptopurin
6 - thio-GMP .....	6 - thio-guanosin-menofosfát
6 - thio-IMP.....	6 - thio-ionsin-monofosfát
AICARFT.....	Aminoimidazol karboxamid ribonukleotid transferáza
AML.....	Akutní myeloidní leukemie
APL.....	Alkylfosfolipidy
ATM.....	Ataxia telangiectasia mutated
atd.....	a tak dále
ATR.....	Ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related
BER.....	Base-excision repair
BRCA.....	BReast CAncer
CAR .....	Chimérické antigenní receptory
CDK4 .....	Cyklin-dependentní proteinová kináza 4
CDKi .....	Inhibitory kináz
CDKs.....	Cyklin-dependentní proteinové kinázy
CHK 1 a 2 .....	Kontrolní body kinázy 1 a 2
CLL.....	Chronická lymfoidní leukemie
CML.....	Chronická myeloidní leukemie
CNS.....	Centrální nervová soustava
CSR .....	Class Switch Recombination

CT.....	Výpočetní tomografie
DCK .....	Deoxycytudin-kináza
DHFR .....	Dihydrofolát-reduktáza
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	Deoxyribonukleová kyselina
DSB .....	Double-strand break
dUMP .....	Deoxyuridin-monofolát
ET(A), ET(B) .....	Endoelin (A), (B)
GARFT.....	Glycinamid ribonukleotid formyltransferáza
GIT .....	Gastrointestinální trakt
HHT .....	Homoharringtonin
HPV.....	Lidský papilovirus
HR .....	Homologní rekombinace
HTLV .....	Human T-lymphotropic virus, Lidský T-lymphotropický virus
IMDM .....	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INF .....	Interferon
MDS .....	Myelodysplastický syndrom
MGUS .....	Monoklonální gamapatie nejasného významu
MHC.....	Hlavní histokompatibilní komplex
MM.....	Mnohočetný myelom
MIG .....	Monoklonální imunoglobulin
MR .....	Magnetická rezonance



MTX.....Metotrexát

např.....například

NHEJ.....Non-homologous end joining

NK.....Přirozený zabíječ (Natural Killer)

PARP .....Poly-adenozindifosfát-ribózo-polymeráza

PLA .....Pelorusid A

pRB .....Retinoblastomový protein

RFC .....Redukovaný nosič folátu

RNA .....Ribonukleová kyselina

RPA..... Replication protein A

RTG.....Rentgenové záření

SAC.....Spindle asseby checkpoints

SSB.....Singe-strand break

TIL.....Tumor infiltrujících lymfocytů

TS .....Thymidylát-syntáza

tzv.....takzvaný, takzvaně

WHO .....World Health Organization

# ÚVOD

Hematologické malignity jsou širokou skupinou nádorových onemocnění postihující lymfatické uzliny a kostní dřeň.

V léčbě hematologických malignit lze uplatnit celou řadu postupů. Vedle chemoterapie se stále častěji hovoří o možnostech využití imunoterapie či kombinované léčby (chemoterapie + imunoterapie). Výhodou této kombinované léčby je možnost užití nižších dávek chemoterapie a tedy i redukce případných nežádoucích účinků.

Akutní myeloidní leukémie je onemocnění, při kterém dochází k maligní transformaci hematopoetické buňky. Jedná se o rychle se rozvíjející onemocnění, jehož klinické příznaky jsou způsobeny přítomnou anémií, neutropenií a trombocytopenií. Léčba je agresivní a je založena na intenzivní chemoterapii nebo alogenní transplantaci krvetvorných buněk.

Mnohočetný myelom je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním krevních buněk. Jeho podstatou je klonální proliferace plazmatických buněk, které produkují monoklonální protilátku (paraprotein). Výsledkem jsou poruchy krvetvorny a imunitního systému, ale také odbourávání kostní hmoty. Léčba zahrnuje chemoterapii, imunoterapii či biologickou léčbu.

Cílem bakalářské práce bylo stanovení vhodné koncentrace chemoterapeutika pro použití v kombinaci s imunoterapií, konkrétně v kombinaci s přirozenými zabijáky, NK buňkami.

Bakalářská práce je členěna na dvě části, část teoretickou a část praktickou. Teoretická část obsahuje základní informace o hematologických malignitách a to konkrétně o akutní myeloidní leukemii a mnohočetném myelomu. Jsou zde uvedeny informace o jejich incidenci, vzniku, diagnostice či terapii. Dále je zde podrobně zpracováno téma chemoterapie s jejími mechanismy i nežádoucími účinky.

Praktická část práce se věnuje účinkům různých typů chemoterapie na zvolené buněčné linie (KG-1a, RPMI 8226) a interpretaci získaných výsledků.

Diskuze na konci srovnává výsledky analýzy s ostatními studiemi.

# TEORETICKÁ ČÁST

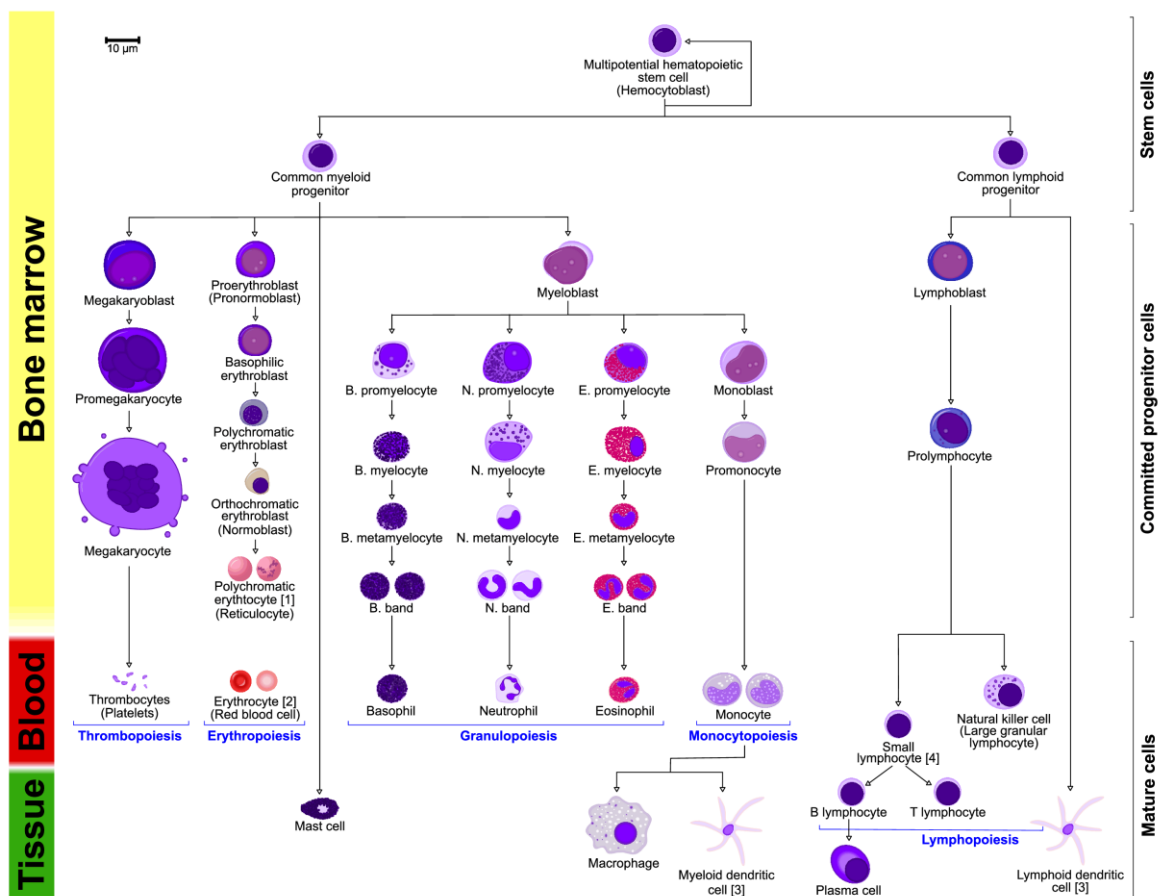
## 1 HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY

### 1.1 Charakteristika

Hematologické malignity jsou skupinou klonálních onemocnění vznikající z nezralých krevních buněk či z buněk v počátečním stádiu vývoje (Obrázek 1). Buňky se mění na klon maligních buněk, nejsou schopny apoptózy, žijí déle a utlačují zdravé buňky. (Mírka 2006)

Tyto malignity představují širokou škálu nádorových onemocnění postihující zejména kostní dřeň, poté se jedná o leukemie, a lymfatické uzliny (lymfomy). (Doležalová 2016)

Obrázek 1: Vývoj kmenových buněk



Dostupné z: <https://www.docsity.com/sr/histologija-hematopoeza/4468681/>

## 1.2 Klasifikace hematologických malignit

Klasifikace hematologických malignit podle WHO rozděluje tyto novotvary především podle diferenciační linie na myeloidní novotvary, lymfoidní novotvary, poruchy žírných buněk a histiocytární novotvary (Tabulka 1). V každé kategorii jsou různá onemocnění definována podle kombinace morfologie, imunofenotypu, genetických rysů a klinických syndromů. Cílem klasifikace je definovat entity nemoci, které se dají rozeznat a které mají klinický význam. (Harris et al. 2000)

**Tabulka 1: WHO klasifikace hematologických malignit**

Myeloidní neoplázie	Lymfoidní neoplázie	Posttransplantační lymfoproliferativní poruchy	Onemocnění žírných buněk	Histocytární malignity
Chronická myeloidní leukémie	Lymfoplazmatický syndrom	Myelom plazmatických buněk	Sarkom žírných buněk	Histocytóza z Langerhansových buněk
Chronická neutrofilní leukémie	Plazmocytom	Plazmatická hyperplázie	Systémové onemocnění žírných buněk	Sarkom dendritických buněk
Myelodiosplatický syndrom	Hodgikův lymfom	Plazmatická hyperplázie		
Akutní myeloidní leukémie				

*Zdroj: (Harris et al. 2000)*

## **1.3 Incidence a etiologie**

Incidence se v mnoha ohledech liší. Více bývají postiženi muži než ženy. Etiologie není známá, jsou však udávány rizikové vlivy podporující vznik hematologických malignit. (Mírka 2006) Mezi tyto rizikové faktory patří zejména ionizující záření, expozice chemikálií, genetická predispozice, infekce, ale i předchozí onkologická terapie.

### **1.3.1 Ionizující záření**

Několik studií o vystavování populace ionizujícímu záření poskytlo odpovídající důkaz o vztahu mezi expozicí záření určité úrovně a vývoji akutních leukémií a chronické myeloidní leukémie. Nicméně různé typy buněk mohou mít různé reakce na záření. (Rodriguez-Abreu et al. 2007)

### **1.3.2 Chemikálie**

Expozice benzenu, formaldehydu a dioxinů je spojená s větším rizikem vzniku leukémie. Organická rozpouštědla, zemědělské pesticidy a herbicidy byly také spojeny s vyšším rizikem. Kouření cigaret je známým rizikovým faktorem pro leukémii. Odhaduje se, že až 20 % akutních myeloidních leukémií (AML) může být spojeno s kouřením cigaret. (Rodriguez-Abreu et al. 2007)

### **1.3.3 Lékařská terapie a zdravotní stav**

Předchozí léčba pomocí chemoterapie a radiační terapie zvyšuje riziko sekundárních leukémií. Riziko je vyšší u kombinované modální terapie. U příjemců byly pozorovány leukémie a lymfomy po transplantaci orgánů. Aplastická anémie a myelodysplastický syndrom jsou také spojovány se zvýšeným rizikem vzniku leukémie. (Rodriguez-Abreu et al. 2007)

### **1.3.4 Genetické poruchy**

Některé genetické poruchy charakterizované chromozomálními změnami, jako je např. Klinefelterův syndrom či Downův syndrom jsou také spojené s větším rizikem vzniku leukémie. (Rodriguez-Abreu et al. 2007)

### **1.3.5 Infekce**

Onkogenní retrovirus je virus lidské T-buněčné leukémie (HTLV) typu 1 a typu 2 a byl identifikován jako související faktor k rozvoji vzácných typů leukémií a lymfomů. Virus je přenášen hlavně z matky na dítě, zejména kojením. Sexuální přenos a krevní trans-

fúze jsou další možné cesty infekce. Celoživotní riziko infekce je 0,5 % - 7 %, s nejvyšším rizikem spojeným s novorozeneckou infekcí. (Rodriguez-Abreu et al. 2007)

## **1.4 Diagnostika**

K analýze při podezření na hematologickou malignitu je nezbytný kompletní krevní obraz. Dalším vyšetřením, které je součástí diagnostiky těchto chorob, je biopsie kostní dřeně. Všechny vzorky se vyšetřují mikroskopicky, aby se stanovila povaha malignity. Řadu těchto onemocnění lze v současnosti klasifikovat i cytogeneticky (akutní myeloidní leukémie, chronická myeloidní leukémie) nebo imunofenotypizací maligních buněk (lymfom, myelom, chronická lymfocytární leukémie. (Tseng a Ng 2020)

## **1.5 Terapie**

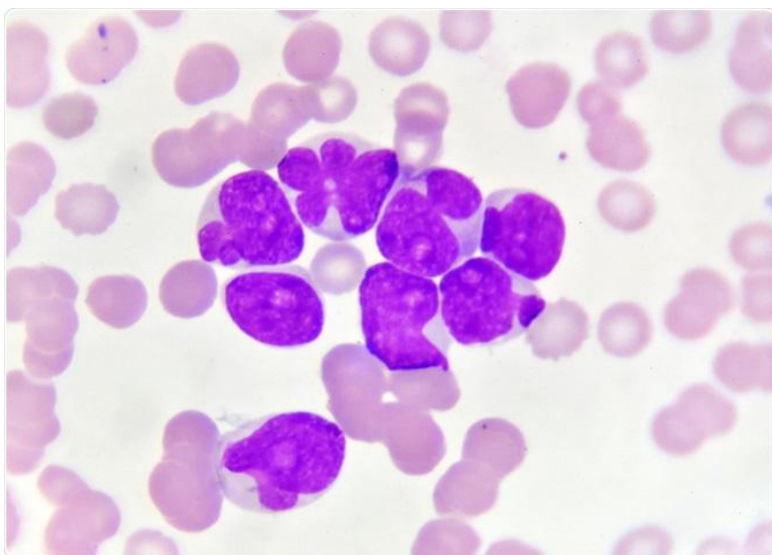
Léčba může zahrnovat symptomatickou léčbu (např. krevní transfúze u myelodysplastického syndromu). Agresivnější formy onemocnění ale vyžadují léčbu pomocí chemoterapie, radioterapie, imunoterapie a v některých případech i transplantaci kostní dřeně. (Tseng a Ng 2020)

## 2 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

### 2.1 Charakteristika

Akutní myeloidní leukemie (AML) je maligní onemocnění kostní dřeně a krvetvorby. Vyznačuje se neomezeným množením a hromaděním nezralých buněk kostní dřeně (myeloblastů), pro které je u akutní myeloidní leukemie charakteristické, že tvoří více než 20 % jaderných buněk v kostní dřeni nebo periferní krvi. (Pospíšilová et al. 2013; Rory M. Shallis et al. 2019; Vakiti a Mewawalla 2021)

**Obrázek 2: Buňky AML v mikroskopickém nátěru kostní dřeně**



Dostupné z: [https://www.news-medical.net/health/Refractory-Acute-Myeloid-Leukemia-\(AML\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Refractory-Acute-Myeloid-Leukemia-(AML).aspx)

### 2.2 Krevní obraz

Pro krevní obraz je charakteristický zvýšený počet leukocytů (leukocytóza) s vyplavováním blastů či naopak pokles počtu leukocytů v periferní krvi (leukopenie). Často může být přítomna normocytární anémie nebo také i trombocytopenie. (Vydra et al. 2019)

### 2.3 Incidence

AML se může objevit v každém věku. Incidence připadá na 2 – 3 obyvatel z 100 000 za rok. Toto číslo však narůstá u osob ve starším věku – ve skupině lidí nad 65 let je roční incidence 12 – 15 z 100 000 obyvatel. (Pospíšilová et al. 2013)

## 2.4 Etiologie

Mechanismus vzniku akutních myeloidních leukémií není dosud zcela jasný. (Rongzheng Xu et al. 1996)

Leukemogenese je vícestupňový proces, který vyžaduje citlivost hematopoetické progenitorové buňky na indukční látky. Různé podtypy AML mohou mít odlišné kauzální mechanismy, což naznačuje funkční spojení mezi konkrétní molekulární abnormalitou nebo mutací a původcem. (Crane MM et al. 1996) Většina případů AML vzniká *de novo* bez objektivní leukemogenní expozice. (Deschler a Lübbert 2006)

Vývoj AML bývá však spojován s několika rizikovými faktory a to např.:

- věk
- genetické poruchy: Downův syndrom, Klinefelterův syndrom, Li-Fraumeniho syndrom a jiné
- fyzikální a chemické expozice: benzen, drogy či pesticidy
- radiační expozice: terapeutické ionizační záření
- chemoterapie: alkylační cytostatika, inhibitory topoisomerázy II
- virová infekce

Tyto rizikové faktory byly ale identifikovány jen u malého počtu pozorovaných případů. (Sandler DP a Collman GW 1987; Aquino VM 2002; Pogoda JM et al. 2002; Pui CH 1995)

## 2.5 Klinické projevy

Typický je rychlý rozvoj a vývoj choroby a to zpravidla v horizontu několika dnů či týdnů. (Vokurka 2008)

Mezi projevy onemocnění patří především selhání kostní dřeně (infiltrace) a omezení tak krvetvorby. Dochází k hromadění nádorových buněk vlivem jejich nekontrolovatelného množení a zástavě diferenciací leukemických buněk. Bývá přítomen anemický syndrom doprovázený únavou, slabostí, bledostí kůže někdy i dušností. Pokud je přítomna trombopenie, dochází k rozvoji krvácivých stavů, které mohou vyústit často k život ohrožujícím komplikacím (např. krvácení do mozku či trávicího systému). Mezi celkové příznaky patří úbytek na hmotnosti a pocení. (Indrác 2014)



## 2.6 Diagnostika

Provádí se cytologické vyšetření kostní dřeně, kdy je stanovován procentuální obsah blastů – u akutní myeloidní leukemie je nalézáno  $\geq 20$  % blastů v kostní dřeni. Mezi další vyšetření patří průtoková cytometrie pro průkaz diferenciací myeloblastů a také je důležitá pro určení typu leukémie (odlišení od akutní lymfoblastické leukémie). (Vydra et al. 2019)

## 2.7 Klasifikace

Podle klasifikace WHO lze akutní myeloidní leukémii rozdělit do několika skupin:

- **AML s rekurentními cytogenetickými aberacemi**, tzn. je u nich prokázána jedna z možných aberací.
- **AML s víceliniovou dysplázií** – sem jsou zařazeni pacienti s předcházejícím MDS a pacienti bez předchozího MDS. Typická je dysplazie více než 50 % buněk ve 2 a více řadách.
- **AML sekundární a MDS, indukované předchozí terapií** – jedná se o AML po léčbě inhibitory topoizomerázy II (etoposid) či po léčbě alkylačními cytostatiky (melphlan). Také může jít o následek po předchozí radioterapii (Vydra et al. 2019)

## 2.8 Terapie

Pro správnou a úspěšnou léčbu AML je důležitá včasná diagnostika a zahájení terapie do několika dní po potvrzení diagnózy. (Tomášek 2015)

Léčba AML se často provádí ve 3 fázích – indukce, konsolidace a postremise. (Tomášek 2015; Reville a Kadia 2020)

Cílem indukční fáze je zničení co největšího počtu leukemických buněk v krvi a v kostní dřeni a to pomocí chemoterapie, která je podávána v cyklech. Následuje obnova krvetvorby. Tato fáze je úspěšná, pokud krevní obraz obsahuje méně než 5 % blastů a dosáhne se kompletní remise. (Tomášek 2015; Reville a Kadia 2020)

Konsolidace je fází, ve které je snaha o zabránění návratu onemocnění nebo alespoň o udržení remise. Lze provést i alogenní transplantaci u vysoce nepříznivých a rizikových typů AML. (Vokurka 2008)

Postremisní fáze nebo také udržovací léčba je klíčová pro dosažení kompletní remise onemocnění. (Vokurka 2008)

## **2.9 Prognóza**

AML je agresivní onemocnění, které může být v krátké době smrtelné. Prognóza onemocnění je ovlivněna celou řadou faktorů. Špatnou prognózu mají pacienti vyššího věku, dále ti s komplexní změnou karyotypu, sekundární AML či pacienti, kteří již dříve podstoupili protinádorovou léčbu. (Karas 2011)

## 3 MNOHOČETNÝ MYELOM

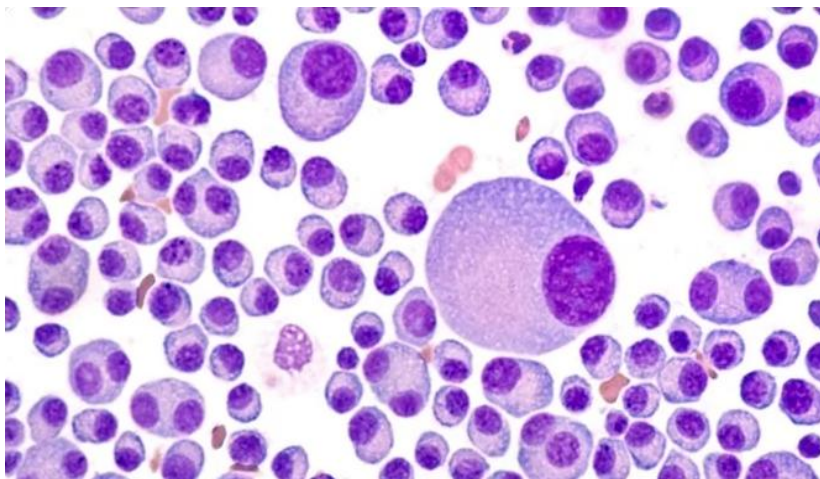
### 3.1 Charakteristika

Mnohočetný myelom (MM), nebo také plazmocytom či Kahlerova nemoc, je hematologické nádorové onemocnění kostní dřeně vycházející z nekontrolovatelného množení plazmocytů, tedy buněk produkujících obranné protilátky (imunoglobuliny). (Vokurka 2008; van de Donk et al. 2021)

Nádorové buňky tvoří jeden klon a produkují stejnou monoklonální protilátku, označovanou jako paraprotein, který je detekován v moči či v séru pacienta. (Indrák 2014)

Nádor vzniká v kostní dřeni, brání krvetvorbě, narušuje kostní hmotu, způsobuje velké bolesti kostí, může vést k vzniku patologických fraktur a osteolytických ložisek ve skeletu (Adam et al. 2008). Dalším postiženým orgánem bývají ledniny, kde se paraprotein ukládá jako tzv. amyloid. (Vokurka 2008)

#### Obrázek 3: Buňky MM v mikroskopickém nátěru kostní dřeně



Dostupné z: <https://www.news-medical.net/health/Multiple-Myeloma-Imaging-Strategies.aspx>

### 3.2 Incidence a epidemiologie

Incidence MM silně souvisí s věkem a téměř polovina nových případů jsou lidé ve věku 75 let a více. Onemocnění je častější u mužů než u žen. Ročně je nově diagnostikováno u 3 až 4 osob na 100 000 obyvatel. (Adam et al. 2008; Bird a Boyd 2019)

### 3.3 Etiologie

Přesná etiologie mnohočetného myelomu (MM) zůstává dosud neznámá.

Jsou prokázány případy, kdy vzniku MM předcházela premaligní či zcela benigní tzv. monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS). (Vydra et al. 2019), (Vokurka 2008)

Je možné, že faktory způsobující změny v genetické informaci buňky (například ionizující záření, pesticidy, herbicidy, benzen a jiné) mohou přispět k rozvoji myelomu, stejně jako je tomu i u jiných malignit.

V posledních letech byla u tohoto onemocnění identifikována celá řada genetických abnormalit, které ovlivňují i jeho výslednou prognózu. Jedná se např. o translokaci t(4;14) a t(14;16) a delecii 17p. (Cardona-Benavides et al. 2021)

### 3.4 Klinické projevy

Typické projevy shrnuje zkratka z počátečních písmen symptomů – CRAB.

- C (calcium; vápník) – hyperkalcémie
- R (renal failure) – renální selhání
- A (anemia) – anémie
- B (bone; kost) – postižení kostí (Vydra et al. 2019)

#### 3.4.1 Hyperkalcémie

Hyperkalcémie je stav, při kterém je zvýšena hladina vápníku v krvi. Vzniká vysokou aktivitou osteoklastů. Příliš mnoho vápníku v krvi může oslabit kosti. Mezi její příznaky řadíme i únavu, zácpu a sníženou psychomotoriku. (Vydra et al. 2019; van de Donk et al. 2021)

#### 3.4.2 Renální selhání

Dochází k němu, když ledviny náhle nemohou filtrovat odpadní produkty z krve. Hlavní příčinou je přítomnost paraproteinu, který narušuje funkci nefronu. Dále dochází i poškození ledvin vlivem ukládání amyloidu. (Vydra et al. 2019; van de Donk et al. 2021)

#### 3.4.3 Anémie

Je to stav, ke kterému dochází vlivem infiltrace kostní dřeně myelomovými buňkami. Následkem je potlačení krvetvorby, narušení přenosu kyslíku a živin. Tento stav bývá

ještě umocněn vlivem poruchy tvorby erythropoetinu při narušené funkci ledvin. (van de Donk et al. 2021)

#### **3.4.4 Onemocnění kostí**

Vzniká na základě nerovnoměrné aktivity mezi osteoblasty a osteoklasty. Hrozí vznik patologických fraktur. (Vydra et al. 2019)

### **3.5 Diagnostika**

Prvním příznakem bývá často nález monoklonálního proteinu (paraprotein) v séru nebo moči pacienta. V krvi a moči je dále stanovována koncentrace vápníku, močoviny, kreatininu atd.. Minimální kritéria pro diagnostiku mnohočetného myelomu zahrnují nález alespoň 10 % abnormálních plazmatických buněk. (Robert A. Kyle 1992)

Při diagnostice jsou nepostradatelné i zobrazovací metody a to jak rentgenové vyšetření, tak počítačová tomografie i magnetická rezonance. Demonstrují rozsah onemocnění, přítomnost přidružených kompresních zlomenin a ukazují růst nádoru. (Angtuaco et al. 2004)

### **3.6 Terapie**

#### **3.6.1 Kortikosteroidy**

Steroidy zůstávají jedním ze základních léků v léčbě MM. Glukokortikoidy jako jediné působí proti myelomovým buňkám a působí podporou široké škály protizánětlivých a imunosupresivních aktivit. Vedlejší účinky steroidů, které zahrnují např. změny nálady, nespavost, slabost svalů, zvýšené riziko infekce, mohou být problematické zejména u starších pacientů. (Bird a Boyd 2019)

#### **3.6.2 Chemoterapie**

Chemoterapie působí prostřednictvím různých mechanismů (viz dále) a používá se k ošetření širokého spektra hematologický malignit včetně mnohočetného myelomu. Tato terapie má tendenci více ovlivňovat maligní buňky než zdravé buňky, protože maligní buňky proliferují rychleji a mají snížené schopnosti opravovat chyby v DNA. (Bird a Boyd 2019)

### **3.6.3 Monoklonální protilátky**

Lidská monoklonální protilátka se zaměřuje na buněčný povrchový protein CD38, který je všeobecně exprimován na maligních plazmatických buňkách. Monoklonální protilátka indukuje buněčnou smrt prostřednictvím řady mechanismů, jako je buněčná fagocytóza a apoptóza závislá na protilátce. Utéto terapie bylo prokázáno, že dramaticky zlepšuje míru odezvy na léčbu a navozuje remisi. V současnosti se jedná o neúčinnější terapii. (Bird a Boyd 2019; van de Donk et al. 2021)

### **3.7 Prognóza**

MM je druhou nejčastější hematologickou malignitou, což představuje 10 – 15 % všech nových diagnóz. Střední doba přežití je v současné době 4 – 8 let v závislosti na věku. Přežití za posledních 40 let se výrazně zlepšilo. (Bird a Boyd 2019)

## 4 LÉČBA HEMATOONKOLOGICKÝCH MALIGNIT

### 4.1 Konvenční protinádorová terapie

Chemoterapie je jedním z léčebných postupů při léčbě nádorových onemocnění. Užívané látky, tzv. cytostatika, která jsou buď synteticky vytvořená, nebo jsou přirozeného původu, zastavují nebo zpomalují růst rakovinných buněk. Nevýhodou je, že tento efekt mají i na zdravé buňky. (Klener 2011)

Historie chemoterapie sahá do 40. let 20. století a to konkrétně k použití dusíkatých yperitů. (Klener jr. a Klener 2013)

Dusíkatý yperit se používal jako chemická bojová látka, později se ukázal účinný v léčbě rakoviny. Pitvy obětí naznačovali, že po expozici yperitem došlo k potlačení růstu lymfomů a myelomů. (Klener jr. a Klener 2013)

Metotrexát byl objeven po 2. světové válce. Sidney Farber studoval účinky kyseliny listové na pacientech s leukémií – metotrexát se stal prvním lékem vyvolávající remisi u dětí s akutní lymfoidní leukémií. Z toho vyplynulo, že antifoláty jsou schopné potlačit proliferaci maligních buněk. (Klener jr. a Klener 2013)

Cisplatina je sloučenina na bázi platiny a byla objevena Barnettem Rosenberem. Jednalo se o náhodný objev při studiu účinku elektrického pole na růst bakterií *Escherichia coli*. Rosenber pozoroval, že se bakterie po umístění do elektrického pole přestaly dělit. Původně se domníval, že je to efekt elektrického pole, později ale zjistil, že se jednalo o elektrolýzu platinové elektrody než o vliv elektrického pole. Tento náhodný objev zahájil řadu výzkumů, které vyvrcholily syntézou cisplatiny. (Klener jr. a Klener 2013)

*Paklitaxel* je rostlinný alkaloid patřící mezi skupinu taxanů, jedná se o látku izolovanou z tisu západoamerického. V 80. letech 20. století bylo zjištěno, že je účinný při léčbě rakoviny vaječnicků. (Klener jr. a Klener 2013)

#### 4.1.1 Antimetabolity

Antimetabolity jsou malé molekuly, které jsou nespecifické pro buněčný cyklus. Jejich efekt je inhibice klíčových enzymů metabolismu DNA, což vede k následnému zastavení dělení buňky a její smrti. Antimetabolity jsou dále členěny do několika skupin a to na

antifoláty, fluoropyrimidiny a deoxynukleosidová analoga. (Tewari 2007; Klener jr. a Klener 2013)

#### **4.1.1.1 Antifoláty – inhibitory dihydrofolát reduktázy**

*Metotrexát* (MTX) se používá v chemoterapii již více než 30 let. Je to inhibitor dihydrofolát-reduktázy (DHFR). DHFR je odpovědná za přeměnu dihydrofolátu na tetrahydrofolát (THF) a následně na 10-formyl tetrahydrofolát. Poslední sloučenina poskytuje formyl skupinu pro glycinamid ribonukleotid formyltransferázu (GARFT) a aminoimidazol karboxamid ribonukleotid formyl transferázu (AICARFT). Výsledkem DHFR je vyčerpání intracelulárních zásob redukovaných folátů a nakonec snížení syntézy purinů a pyrimidinů. (Klener jr. a Klener 2013; Kaye 1998)

Převládající mechanismus účinku metotrexátu je nejistý, protože polyglutamované formy léčiva také inhibují tymidylát-sytázu (TS) a AICARFT. (Kaye 1998; Klener jr. a Klener 2013)

Rezistence na metotrexát vzniká různými mechanismy, mezi které patří zhoršený transport prostřednictvím redukovaného folátového nosiče. (Kaye 1998; Klener jr. a Klener 2013) To inspirovalo hledání dalších inhibitorů DHFR a následně vedlo k objevu několika analogů methotrexátu včetně *trimetrexátu*. Trimetrexát je lipofilnější než methotrexát a jeho vstup do buňky není závislý na redukovaném folátovém nosiči (RFC). To vede k vyšší koncentraci trimetrexátu v buňce. (Kaye 1998; Klener jr. a Klener 2013)

Další inhibitor DHFR, který má prokázanou aktivitou u lidí, je *piritrexim*. Jedná se o další látku, která se nespolehá na RFC, ale vstupuje do buňky pomocí pasivní difúze. (Kaye 1998; Klener jr. a Klener 2013)

Vedlejší účinky pozorované u této třídy léčiv, stejně jako u většiny antimetabolitů, spočívají hlavně v toxicitě pro rychle se dělící buňky, proto jsou společným znakem myelosuprese a trombocytopenie. Tyto účinky jsou obvykle reverzibilní a v chemoterapii lze pokračovat, jakmile se krevní obraz vylepší. Je známo, že současné podávání redukovaných folátů, jako například *leukovorinu* (5-formyl-THF – kyselina foliniová), může snížit tyto toxické účinky na přijatelnou úroveň. (Kaye 1998), (Klener jr. a Klener 2013)



#### **4.1.1.2 Antinukleotidy**

Antinukleotidy inhibují hlavně syntézu nukleotidů a mohou se i v některých případech včlenit do DNA, která poté není schopná případné další replikace. (Wilhelm 2020)

#### **Thiopuriny**

Thiopuriny jsou purinové antimetabity široce používané při léčbě akutních leukémií, autoimunitních onemocnění (např. Crohnova choroba a revmatoidní artritida) a u příjemců orgánů. (Zaza et al. 2010)

Jedním z prvních antinukleotidů byl *6-merkaptopurin* (6-MP). Dalším zástupcem je jeho protilátka, azathioprin. (Klener jr. a Klener 2013)

Cytotoxických účinků thiopurinových léčiv je dosaženo zabudováním thio-deoxyguanosin trifosfátu do DNA a thioguanosin trifosfátu do RNA, inhibicí syntézy *de novo* purinů pomocí methylmerkaptopurinových nukleotidů a inhibicí proteinu Rac1. (Zaza et al. 2010)

#### **Fluoropyrimidiny**

Jsou další podskupinou antinukleotidů. Zástupcem této skupiny je *5-fluorouracil* (5-FU), který je analogem uracilu (složka RNA). V buňce je metabolizován a jeho metabolit blokuje enzym tymidylátsyntetázu. Tento enzym je podstatný pro syntézu tymidinu a jeho bloádou je narušena syntéza DNA. (Klener jr. a Klener 2013; Kaye 1998)

Fluorouracil má uplatnění zejména při léčbě nádorů trávicího traktu – kolorektální karcinom, karcinom žaludku, slinivky břišní, jater, ale i u dalších typů malignit např. plic, prsu, močového měcháře apod. (Klener jr. a Klener 2013; Kaye 1998)

#### **Deoxynukleosidová analoga**

Analoga deoxynukleosidů mají také široké uplatnění v chemoterapii. Nejdéle užívaným analogem je cytosin arabinosid (*cytarabin*), běžně používaný v léčbě akutní leukémie a některých lymfomů. Jeho mechanismem účinku je nejspíše inhibice DNA-polymerázy a tím narušení syntézy DNA. (Kaye 1998; Klener jr. a Klener 2013)

Mezi vedlejší účinky léčby cytarabinem patří pancytopenie, nevolnost, zvracení, horečka a bolest na hrudi. (Kaye 1998; Klener jr. a Klener 2013)

Dalším analogem je *gemcitabin*. Jeho mechanismus účinku je podobný jako u cytarabinu. Oproti němu byla ale prokázána jeho vyšší aktivita u solidních nádorů a z toho důvodu nachází uplatnění např. v terapii nádorů slinivky břišní, prsu, ale i některých hematologických malignit. (Klener jr. a Klener 2013)

Mezi další látky této skupiny patří například *decitabin*, který má uplatnění hlavně v léčbě MDS a AML. (Kaye 1998; Klener jr. a Klener 2013)

#### **4.1.2 Klasická genotoxická cytostatika**

U této skupiny látek dochází k přímému poškození již hotových nukleotidových kyselin. K tomuto poškození může dojít několika mechanismy:

- alkylací
- interkalací
- poškozením molekuly DNA
- inhibicí topoizomeráz (Klener jr. a Klener 2013)

##### **4.1.2.1 Alkylační látky**

Alkylační činidla se řadí mezi nejcennější léky dostupné v léčbě pacientů s rakovinným onemocněním. Narušují buněčnou funkci vlivem alkylace, tzn. vytvářením kovalentních vazeb s bázemi DNA (adenin, cytosin a nejčastěji guanin) a alkylačním činidlem. (Klener jr. a Klener 2013)

Základní látkou je dusíkatý yperit, ze kterého jsou odvozeny jeho deriváty jako např. cyklofosfamid či ifosfamid. Dalšími zástupci této skupiny je např. melfalan (využití při léčbě mnohočetného myelomu), chlorambucil (léčba chronické lymfatické leukémie), bendamustin (kromě alkylačního účinku má i antimetabolickou aktivitu) a platinové deriváty. (Klener jr. a Klener 2013)

#### **4.1.2.2 Interkalační látky**

U této skupiny dochází ke vzniku nekovalentní vazby cytostatika na strukturu DNA, konkrétně na vodíkové můstky. Výsledným efektem je zástava procesů replikace i transkripce. Významným zástupcem této skupiny jsou antracykliny (antracyklinová antibiotika), kam patří např. doxorubicin. (Mridha Priyanka et al. 2014; Klener jr. a Klener 2013; Klener 2011)

#### **4.1.2.3 Látky působící rozštěpení DNA**

Zlomky na jednom či na dvou řetězcích DNA způsobují například glykopeptidové antibiotikum (*bleomycin*). Díky své podobnosti s mechanismem působení ionizujícího záření, se někdy označují jako radiomimetika. (Klener jr. a Klener 2013)

#### **4.1.2.4 Inhibitory topoizomeráz DNA**

DNA-topoizomerázy jsou klíčovými enzymy pro zajištění správného průběhu replikace. Při bloádě jejich funkce nedojde k opětovnému spojení řetězců DNA, což má pro buňku letální účinek. (Holm et al. 1989; Oksuzoglu et al. 2008)

Na základě funkčních mechanismů byly DNA topoizomerázy rozděleny do dvou typů. Topoizomeráza DNA typu I rozštěpuje pouze jedno vlákno dvoušroubovice a mezi zástupce patří např. *topotekan* či *irinotekan*. U topoizomeráz typu II dochází k rozštěpení obou vláken dvoušroubovice a zástupci jsou např. *etoposid* či *teniposid*. (Holm et al. 1989; Oksuzoglu et al. 2008; Klener jr. a Klener 2013)

### **4.1.3 Zesílení účinku genotoxických cytostatik**

Inhibice opravných procesů DNA může vést k zvýšení citlivosti nádorových buněk vůči účinkům ionizujícího záření či genotoxických látek. Zástupci této skupiny jsou např. inhibitory PARP (poly (ADP-ribose)-polymerase), jejichž enzymatická aktivita je nezbytná pro opravu jednořetězcových zlomů (SSB - *single-strand break*) cestou základní opravy excize (BER – *base-excision repair*). Cílená inhibice PARP vede k senzitivaci nádorových buněk vůči chemoterapii či radioterapii a to zvláště u nádorů s defekty v homologní rekombinaci DNA v důsledku mutací genů BRCA1 / 2. (Ibrahim et al. 2012) Dalším zástupcem této skupiny jsou inhibitory checkpoint kináz. (Zabludoff et al. 2008)

#### **4.1.4 Antimitotika**

Proti rychle se dělícím nádorovým buňkám působí tzv. antimitotika - antiproliferační cytostatika. Antimitotika působí jen na ty nádorové buňky, které se nachází ve fázi

mitózy, ostatní látku zmetabolizují a dále proliferují. (van Vuuren et al. 2015; Klener jr. a Klener 2013)

Antimitotika lze rozdělit do několika skupin a to na antimikrotubulární látky, které narušují strukturu a funkci mikrotubulů, inhibitory aurora kináz, inhibitory polo-like kináz, dále inhibitory kinezinů a cyklin-dependentních kináz. (Klener jr. a Klener 2013; van Vuuren et al. 2015)

#### **4.1.5 Inhibice proteosyntézy a degradace proteinů**

##### **4.1.5.1 Inhibice proteosyntézy**

Inhibice proteosyntézy představuje zastavení tvorby bílkovin. Mezi látky takto působící patří *L-asparagináza*. Jejích vlastností se využívá v léčbě akutní lymfoblastické leukémie či u T-lymfomů. (Klener jr. a Klener 2013)

##### **4.1.5.2 Inhibice degradace proteinů**

Extracelulární a intracelulární proteiny jsou pomocí *26S proteazomu* degradovány v konjugaci s *ubikvitinem* a jsou nahrazovány proteiny novými. V nepoškozené buňce je přítomna rovnováha mezi degradací a syntézou nových proteinů. (Klener jr. a Klener 2013; Matějíková et al. 2013)

Bortezomib je modifikovaný analog kyseliny boronové, který se selektivně a reverzibilně váže na proteasom 26S. Indukuje stabilizaci celé řady proapoptotických a antiproliferačních molekul, čímž dochází k navození jeho silného protinádorového efektu. Využití má zejména v léčbě mnohočetného myelomu a lymfomu z plášťových buněk. (Curran a McKeage 2009; Klener jr. a Klener 2013)

#### **4.1.6 Další možné mechanismy účinku**

##### **4.1.6.1 Syntetické alkylfosfolipidy**

Syntetické alkylfosfolipidy (APL) jsou protinádorová léčiva s antiproliferativními vlastnostmi, která se chemicky dělí do dvou hlavních skupin: alkyl-lysofosfolipidy a alkylfosfocholiny. Skupina protinádorových lipidů také zahrnuje glykosylované protinádorové lipidy a glykosidované fosfolipidy, které se vyznačují přítomností cukerné skupiny. (Ríos-Marco et al. 2017)

Alkylfosfolipidy působí jako biomodulátory, kdy interagují s buněčnou membránou a narušují její metabolismus včetně umožnění vazby specifických ligandů či narušení buněčné signalizace. (Ríos-Marco et al. 2017; Klener jr. a Klener 2013)

#### 4.1.6.2 *Blokáda endotelinových receptorů*

Endoteliny jsou vazoaktivní peptidy produkované endotelem. Mají povahu růstových faktorů. (Kawanabe a Nauli 2011; Klener jr. a Klener 2013)

#### 4.1.7 *Nežádoucí účinky chemoterapie*

Vedlejší účinky chemoterapie lze rozdělit na krátkodobé a dlouhodobé účinky. Tabulka 2 shrnuje některé z těchto nežádoucích účinků. Krátkodobé účinky se obvykle vyskytují v průběhu léčby a odezní po jejím dokončení. Naopak dlouhodobé účinky mohou přetrvávat a k jejich nástupu může dojít až s odstupem několika let po dokončení chemoterapie. (Partridge et al. 2001) Některé z těchto dlouhodobých účinků, například předčasné ovariální selhání, jsou běžně pozorovány u určitých podskupin pacientů. Jiné, jako je sekundární leukémie, jsou extrémně vzácné. Tyto vzácné účinky však musejí být brány v úvahu při rozhodování se potenciálním přínosu terapie. (Partridge et al. 2001)

**Tabulka 2: Nežádoucí účinky chemoterapie**

NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	
KRÁTKODOBÉ	DLOUHODOBÉ
Zvracení	Předčasná menopauza/nepłodnost
Nevolnost	Přírůstek hmotnosti
Stomatitida	Srdeční dysfunkce
Alopecie	Leukémie/MDS
Neuropatie	
Únava	

*Zdroj: (Partridge et al. 2001)*

#### 4.1.8 *Rezistence k chemoterapii*

Rezistence rakovinných buněk na chemoterapii je stále velkým problémem, který zhoršuje prognózu léčby. Jedná se o výsledek četných genetických a epigenetických změn vyskytujících se v rakovinných buňkách. Nejčastěji dochází ke vzniku strukturálních a

funkčních změn v nádorové buňce – změněná aktivita enzymů, narušená intracelulární distribuce cytostatika či jeho transport skrze membránu. Dalšími mechanismy vzniku rezistence nádorových buněk jsou např. změny ve farmakokinetice cytostatika, kdy může docházet k jeho snížené resorpci, rychlejší inaktivaci či urychlenému vylučování. (Rebucci a Michiels 2013)

## **4.2 Imunoterapie**

Imunitní systém hraje v boji proti nádorovým buňkám nezastupitelnou a klíčovou úlohu. Cílem imunoterapie je posílit či aktivovat složky přirozené protinádorové imunity. Mezi buňky s přirozenou protinádorovou aktivitou patří zejména cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky (přirození zabíječi). Tyto buňky svými mechanismy eliminují nádorové buňky vysoce selektivně a bez závislosti na fázi jejich buněčného cyklu.

Formy imunoterapie jsou různé a patří sem např. cílené protilátky, vakcíny, T-lymfocyty s chimerickým antigenním receptorem, alogenní transplantace kostní dřeně či infuze dárcovských lymfocytů či NK buněk. (Klener jr. a Klener 2013)

### **4.2.1 Formy imunoterapie**

#### **4.2.1.1 Nespecifická stimulace imunitního systému**

Imunitní systém lze stimulovat pomocí nejrůznějších cytokinů, kam patří interferony či interleukiny.

#### **4.2.1.2 Pasivní (adoptivní) imunoterapie**

Adoptivní buněčná terapie, známá také jako buněčná imunoterapie, je formou léčby, při které se používají efektorové buňky imunitního systému či specifické monoklonální protilátky k eliminaci nádorových buněk. Imunokompetentní buňky (autologní či alogenní) jsou množeny *ex vivo*. Nejčastěji se jedná o mononukleární buňky periferní krve, které se inkubují s IL-2 a následně jsou vpraveny do těla pacienta. Tento typ terapie může být kombinován s chemoterapií, u které je pak možné snížení podávané dávky. (Klener jr. a Klener 2013)

Daší terapeutickou možností spadající do této skupiny je i autologní či alogenní transplantace kostní dřeně.

#### **4.2.1.3 Aktivní imunoterapie**

Do této skupiny patří tzv. nádorové vakcíny. Příkladem jsou např. vakcíny proti lidským papilomavirům (HPV), které mohou vést k rozvoji karcinomu děložního čípku. Dále sem může být řazena vakcína proti viru hepatitidy B nebo infekci *Helicobacter pylori*. Tyto vakcíny omezují rozvoj infekce, a tedy omezují vznik hepatocelulárního karcinomu respektive karcinomu žaludku. (Klener jr. a Klener 2013)

#### **4.2.1.4 CAR-T-lymfocyty**

Chimerický antigenní receptor (CAR) je rekombinantní připravený fúzní protein složený z části T-buněčného receptoru a monoklonální protilátky cílené proti konkrétnímu povrchovému nádorovému antigenu. (Klener jr. a Klener 2013) Struktura CARů je modulární a jednotlivé komponenty lze přizpůsobovat tak, aby byla optimalizována funkce receptoru pro daný typ nádoru. (Lysák 2015) Tento typ léčby je v současné době užíván u některých hemato-onkologických malignit.

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 5.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem práce bylo porovnat účinky různých typů chemoterapie na buněčné linie KG - 1a (akutní myeloidní leukémie) a RPMI 8226 (mnohočetný myelom).

### 5.2 Dílčí cíle

1. Stanovit nejúčinnější koncentraci Cytarabinu, Doxorubicinu a Bortezomibu u linie KG-1a.
2. Stanovit nejúčinnější koncentraci Cytarabinu, Venetoclaxu a Bortezomibu u linie RPMI 8226.
3. U nejúčinnější chemoterapie stanovit koncentraci, která by byla vhodná v kombinaci s imunoterapií (koncentrace s efektivitou alespoň 30 %).



## 6 METODIKA PRÁCE

Praktická část práce byla zpracovávána v Biomedicínském centru Lékařské fakulty v Plzni. Veškerá příprava a měření byla provedena ve speciální laboratoři uzpůsobené a vybavené pro práci s buněčnými liniemi. Hlavní část experimentu byla zpracována na přístroji IncuCyte, který umožňuje sledování buněčných parametrů (např. viability, proliferace) v reálném čase.

### 6.1 Materiál a reagencie

#### 6.1.1 Buněčné linie

- KG-1a – neadherentní buněčná linie, akutní myeloidní leukémie
- RPMI 8226 – neadherentní buněčná linie, mnohočetný myelom

#### 6.1.2 Materiál

- 2x 96-ti jamková destička, čirá (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- běžný materiál: nastavitelné pipety a jednorázové špičky, zkumavky (Eppendorf)

#### 6.1.3 Reagencie

- Poly-L-lysine (SigmaAldrich, Missouri, USA)
- RPMI médium – viz dále
- KG1a médium – viz dále
- chemoterapie: cytarabin (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0  $\mu\text{M}$ )
- doxorubicin (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0  $\mu\text{M}$ )
- venetoclax (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0  $\mu\text{M}$ )
- bortezomib (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 nM)
- fluorescenční próba IncuCyte® CytoTox Red Reagent (Essen BioScience, Ltd., Velká Británie)

#### **6.1.4 Přístroje**

- CO<sub>2</sub> termostat
- Centrifugy
- Laminární box

### **6.2 Buněčné linie**

#### **6.2.1 Linie KG – 1a**

Jedná se o linii, která vznikla izolací nediferencovaných buněk pacienta s akutní myeloidní leukémií (Koeffler et al. 1980). KG-1a linie se kultivuje v médiu, které je složeno ze základního média IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), které je doplněno o fetální bovinní sérum (10%) a 1% antibiotika (penicilin + streptomycin). IMDM médium používá pufrovací systém s hydrogenuhličitanem sodným (3,024 g/l), a proto k udržení fyziologického pH vyžaduje prostředí s 5 – 10% CO<sub>2</sub>.

#### **6.2.2 Linie RPMI 8226**

Tato linie byla izolována z buněk pacienta s mnohočetným myelomem (Moore a Kitamura 1968). Médium, ve kterém je tato linie kultivována, je tvořeno základním RPMI médiem, které je unikátní v tom, že neobsahuje redukční činidlo glutathion. K médiu je přidáván 20% podíl fetálního bovinního séra a 1% podíl antibiotik (penicilin a streptomycin). RPMI používá pufrovací systém s hydrogenuhličitanem sodným (2 g/l), a proto k udržení fyziologického pH vyžaduje prostředí s 5 – 10% CO<sub>2</sub>.

### **6.3 Rozmrazení buněk a jejich kultivace**

Dva týdny před samotným experimentem byly rozmrazeny výše zmiňované buněčné linie a kultivovány v pro ně vhodných podmínkách – kultivační médium, 5% CO<sub>2</sub> a teplota 37°C. V průběhu kultivace došlo k namnožení buněk do dostatečného počtu pro následný experiment.

Při rozmrazování buněk je nutné postupovat velice rychle, aby byla zabezpečena co nejvyšší životaschopnost buněk. Zkumavky s buněčnými liniemi byly uskladněny v tekutém dusíku. Po jejich vyjmutí z dusíku byly zkumavky umístěny do vodní lázně o teplotě 37°C. Aby se snížila možnost kontaminace, udržuje se víčko mimo vodu. Jakmile se obsah zkumavky rozmrazí, lahvička se vyjme z vodní lázně, očistí roztokem 70% etano-

lu a přenese do laminárního boxu. Následně je k buňkám opatrně přikapán 1 ml temperovaného (37°C) vhodného kultivačního média. Celý obsah této zkumavky je přenesen do 15ml zkumavky s dalšími 4 ml temperovaného média. Teplota média je prováděna v inkubátoru s 5% CO<sub>2</sub> po dobu nejméně 15 minut při 37°C, aby médium dosáhlo svého normálního pH (7 až 7,6).

Dalším krokem je centrifugace buněk, která byla prováděna při rychlosti 350g po dobu 6 minut. Tímto krokem došlo k oddělení buněčné pelety od média, ve kterém byly přítomny zbytky dimethyl sulfoxidu (DMSO) ze zamrazovacího média.

Po stočení buněk bylo odstraněno veškeré médium nad buněčnou peletou, ta se následně rozvolnila v médiu určeném pro konkrétní buněčnou linii a to v takovém množství, aby koncentrace dosahovala hodnot 300 000 buněk/1 ml média. Buňky v médiu se přepipetovaly do kultivační láhve o vhodné velikosti a nechaly se růst do dosažení dostatečného množství buněk. V intervalu cca 3x týdně během 14ti dnů bylo měněno buňkám médium za čerstvé.

V průběhu kultivace byly buňky pravidelně a pečlivě kontrolovány, zda nejsou patrné známky mikrobiální kontaminace.

#### **6.4 Testování účinku chemoterapie**

Pro testování vlivu chemoterapie byly zvoleny již dříve zmíněné látky (cytarabin, doxorubicin, venetoclax a bortezomib).

KG-1a linie byla vystavena účinkům cytarabinu a doxorubicinu při koncentracích 0,5 μM, 1,0 μM, 2 μM, 4 μM a 8 μM. Pro bortezomid byly použity nižší koncentrace a to 0,5 nM, 1,0 nM, 2 nM, 4 nM a 8 nM.

Linie RPMI 8226 byla vystavena opět cytarabinu, dále pak venetoclaxu a bortezomibu. Použité koncentrace byly shodné s linií KG-1a, tj. pro cytarabin a venetoclax 0,5 μM, 1,0 μM, 2 μM, 4 μM a 8 μM a pro bortezomib 0,5 nM, 1,0 nM, 2 nM, 4 nM a 8 nM.

Cytarabin je účinný chemoterapeutický prostředek k léčbě akutní myeloidní leukémie a lymfocytárních leukémií. Jelikož je cytarabin léčivem specifickým pro S-fázi buněčného cyklu, je pro dosažení maximální cytotoxické aktivity rozhodující prodloužená expozice buněk cytotoxickým koncentracím. Aktivita cytarabinu je ale na druhou stranu snížena

jeho rychlou deaminací na biologicky neaktivní metabolit uracil arabinosid. (Hamada et al. 2002)

Doxorubicin je léčivo antracyklinového typu, typicky získaný ze *Streptomyces Peucetius*. (Darani et al. 2020)

Venetoclax je látka, která se zaměřuje na apoptotický protein BCL – 2 a může představovat účinnou terapeutickou možnost pro pacienty, kteří jsou nezpůsobilí k intenzivní chemoterapii. (Wei et al. 2018; Deeks 2016) Venetoclax je také využíván k terapii chronické lymfocytární leukémie, non – Hodgkinových lymfomů, akutní myeloidní leukémie, mnohočetného myelomu, systémového lupus erythematoses či rakoviny prsu. (Wei et al. 2018; Deeks 2016)

Bortezomib je inhibitor proteazomu, který se zaměřuje nejen na myelomové buňky, ale působí také v mikroprostředí kostní dřeně, inhibuje vazbu buněk myelomu na stromální buňky kostní dřeně a vykazuje anabolické účinky na kost. (Curran a McKeage 2009)

Detekce mrtvých buněk byla analyzována pomocí přístroje IncuCyte® (Essen BioScience, Velká Británie) s použitím fluorescenčního barviva Cytotox Red Reagent® (Essen BioScience, Velká Británie).

## 6.5 Přístroj IncuCyte®

Přístroj IncuCyte® (Obrázek 4) umožňuje vizualizaci buněk v reálném čase a to díky možnosti snímání plochy kultivačních nádob v předem definovaných časových intervalech. Snímání je možné v řádu minut, hodin, ale i dní či týdnů. Zároveň software přístroje umožňuje následnou analýzu získaných dat, vytvoření grafů, fotografií či video souborů.

**Obrázek 4: Přístroj IncuCyte® v termostatu**



Dostupné z: <https://www.essenbioscience.com/en/research-areas/>

### **6.5.1 Příprava destičky do přístroje IncuCyte® a aplikace buněk**

Pro práci s neadherentními buněčnými liniemi v přístroji IncuCyte®, je nutné ošetřit povrch kultivačního plastu Poly-L-lysinem, aby došlo k adhezi buněk k povrchu kultivační destičky a bylo tak umožněno kvalitní kontinuální snímání tohoto povrchu přístrojem IncuCyte®.

Do 96 jamkové destičky byl napipetován Poly-L-lysin v koncentraci 5mg/ml v množství 50 µl na jamku. Po 10 minutové inkubaci byla odsána přebytečná tekutina a destička byla ponechána 1 hodinu v laminárním boxu, aby došlo k jejímu vyschnutí. Takto byla destička připravena pro aplikaci buněk pro experiment. Pro každou buněčnou linii byla připravena jedna destička.

Pomocí Bürkerovy komůrky byla stanovena koncentrace buněk v kultivačních lahvičkách. Buňky byly naředěny tak, aby do každé jamky 96 jamkové destičky bylo aplikováno 15 000 buněk ve 100 µl kultivačního média. Destička s již přidanými buňkami byla umístěna přes noc do inkubátoru.

### **6.5.2 Aplikace chemoterapie a fluorescenční próby**

Po 24 hodinách inkubace byly destičky vyndány z inkubátoru. Bylo odsáto médium a nahrazeno médiem s konkrétním typem chemoterapie o výše zmíněných koncentracích.

Jako marker mrtvých buněk byla použita fluorescenční próba IncuCyte Cytotox Red Reagent® o koncentraci 0, 125 µM.

Kontrolu tvořily buňky bez přidané chemoterapie. Koncentrace buněk byla také 15 000 buněk/jamka, k těmto buňkám byla také přidána fluorescenční próba pro detekci mrtvých buněk a to o identické koncentraci, tj. 0, 125 µM.

Celý pokus byl prováděn v dubletech. Připravené destičky byly vloženy do přístroje IncuCyte® a zde ponechány 72 hodin. Schéma finální podoby destiček je zobrazeno na obrázcích 5 a 6. Přístroj IncuCyte® v pravidelných 2 hodinových intervalech zdokumentoval vzhled destiček a záznam uložil pro následnou analýzu.

**Obrázek 5: Schéma finálně připravené destičky s linií KG-1a**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			Cytarabine 8 μM KG1a (1) 15K / well	Cytarabine 2 μM KG1a (1) 15K / well	Doxorubicin 8 μM KG1a (1) 15K / well	Doxorubicin 1 μM KG1a (1) 15K / well	Bortezomib 8 μM KG1a (1) 15K / well	Bortezomib 1 μM KG1a (1) 15K / well				
C												
D												
E		KG1a (1) 15K / well	Cytarabine 4 μM KG1a (1) 15K / well	Cytarabine 0.5 μM KG1a (1) 15K / well	Doxorubicin 4 μM KG1a (1) 15K / well	Doxorubicin 0.5 μM KG1a (1) 15K / well	Bortezomib 4 μM KG1a (1) 15K / well	Bortezomib 0.5 μM KG1a (1) 15K / well				
F												
G			Cytarabine 2 μM KG1a (1) 15K / well		Doxorubicin 2 μM KG1a (1) 15K / well		Bortezomib 2 μM KG1a (1) 15K / well					
H												

*Zdroj: vlastní*

**Obrázek 6: Schéma finálně připravené destičky s linií RPMI 8226**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			Cytarabine 8 μM KG1a (1) 15K / well	Cytarabine 2 μM KG1a (1) 15K / well	Venetoclax 8 μM KG1a (1) 15K / well	Venetoclax 1 μM KG1a (1) 15K / well	Bortezomib 8 μM KG1a (1) 15K / well	Bortezomib 1 μM KG1a (1) 15K / well				
C												
D												
E		KG1a (1) 15K / well	Cytarabine 4 μM KG1a (1) 15K / well	Cytarabine 0.5 μM KG1a (1) 15K / well	Venetoclax 4 μM KG1a (1) 15K / well	Venetoclax 0.5 μM KG1a (1) 15K / well	Bortezomib 4 μM KG1a (1) 15K / well	Bortezomib 0.5 μM KG1a (1) 15K / well				
F												
G			Cytarabine 2 μM KG1a (1) 15K / well		Venetoclax 2 μM KG1a (1) 15K / well		Bortezomib 2 μM KG1a (1) 15K / well					
H												

*Zdroj: vlastní*

### 6.5.3 Analýza výsledků z přístroje IncuCyte®

Po 72 hodinách byl pokus ukončen. Destičky byly vyndány z přístroje IncuCyte® a získaná data byla analyzována pomocí softwaru IncuCyte®. V softwaru byly nastaveny parametry tak, aby přístroj dokázal identifikovat mrtvé buňky a spočítal jejich počet. Ukázka nastavení analyzačního softwaru je uvedena na obrázku 7, 8 a 9. Výsledky analýzy byly následně graficky zpracovány.

#### Obrázek 7: Ukázka nastavení analýzy v softwaru IncuCyte® I.

Červená barva – mrtvé buňky

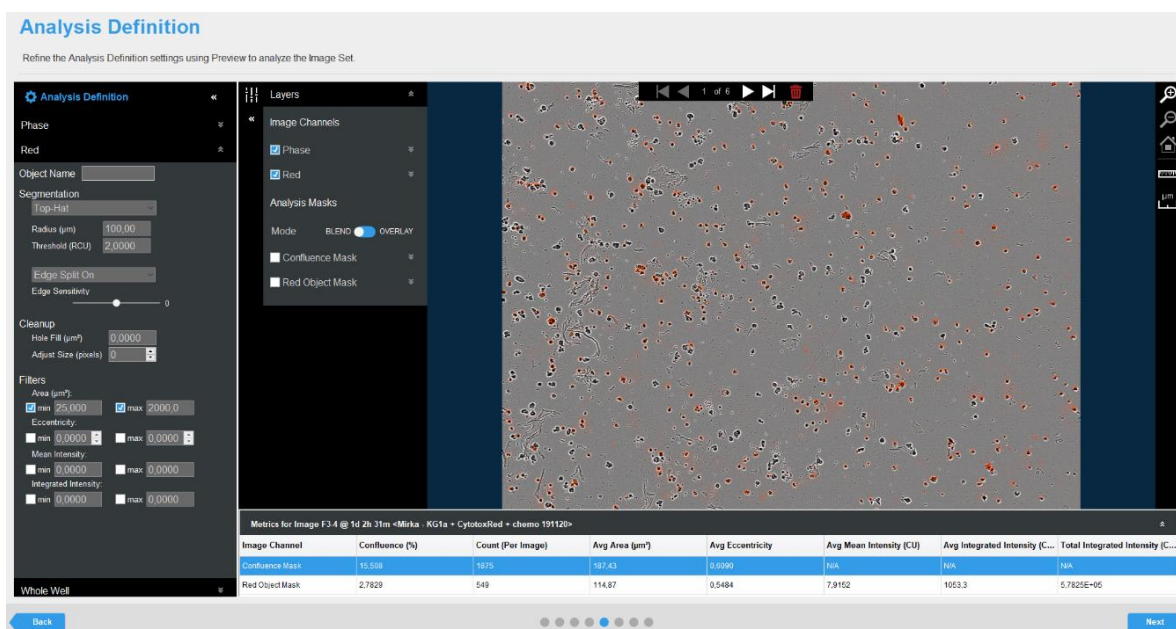


Image Channel	Confluence (%)	Count (Per Image)	Avg Area (µm <sup>2</sup> )	Avg Eccentricity	Avg Mean Intensity (CU)	Avg Integrated Intensity (C...	Total Integrated Intensity (C...
Confluence Mask	15.558	1875	187.43	0.6090	N/A	N/A	N/A
Red Object Mask	2.7829	548	114.87	0.5484	7.9152	1053.3	5.7825E+05

Zdroj: vlastní

## Obrázek 8: Ukázka nastavení analýzy v softwaru IncuCyte® II.

Software detekoval mrtvé buňky, jejichž počet bude následně analyzovat.

Analysis Definition

Refine the Analysis Definition settings using Preview to analyze the Image Set.

Phase

Red

Object Name

Segmentation

Top Hat

Radius (µm) 100.00

Threshold (RCU) 2.0000

Edge Split On

Edge Sensitivity

Cleanup

Hole Fill (µm²) 0.0000

Adjust Size (pixels) 0

Filters

Area (µm²)

min 25.000  max 2000.0

Eccentricity

min 0.0000  max 0.0000

Mean Intensity

min 0.0000  max 0.0000

Integrated Intensity

min 0.0000  max 0.0000

Whole Well

Layers

Image Channels

Phase

Red

Analysis Masks

Mode BLEND OVERLAY

Confluence Mask

Red Object Mask

Metrics for Image F3-4 @ 1d 2h 31m «Mirka - KG1a - CytotoxRed - chemo 191120»

Image Channel	Confluence (%)	Count (Per Image)	Avg Area (µm²)	Avg Eccentricity	Avg Mean Intensity (CU)	Avg Integrated Intensity (C...	Total Integrated Intensity (C...
Confluence Mask	15.508	1675	167.43	0.6990	NA	NA	NA
Red Object Mask	2.7829	549	114.87	0.5484	7.8152	1053.3	5.7825E+05

Zdroj: vlastní

## Obrázek 9: Detail označení mrtvých buněk v softwaru IncuCyte®

Analysis Definition

Refine the Analysis Definition settings using Preview to analyze the Image Set.

Phase

Red

Object Name

Segmentation

Top Hat

Radius (µm) 100.00

Threshold (RCU) 2.0000

Edge Split On

Edge Sensitivity

Cleanup

Hole Fill (µm²) 0.0000

Adjust Size (pixels) 0

Filters

Area (µm²)

min 25.000  max 2000.0

Eccentricity

min 0.0000  max 0.0000

Mean Intensity

min 0.0000  max 0.0000

Integrated Intensity

min 0.0000  max 0.0000

Whole Well

Layers

Image Channels

Phase

Red

Analysis Masks

Mode BLEND OVERLAY

Confluence Mask

Red Object Mask

Metrics for Image F3-4 @ 1d 2h 31m «Mirka - KG1a - CytotoxRed - chemo 191120»

Image Channel	Confluence (%)	Count (Per Image)	Avg Area (µm²)	Avg Eccentricity	Avg Mean Intensity (CU)	Avg Integrated Intensity (C...	Total Integrated Intensity (C...
Confluence Mask	15.508	1675	167.43	0.6990	NA	NA	NA
Red Object Mask	2.7829	549	114.87	0.5484	7.8152	1053.3	5.7825E+05

Zdroj: vlastní



## 7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Při experimentu byly vystaveny 2 buněčné linie účinkům různých chemoterapií. Linie KG-1a, která představuje buňky akutní myeloidní leukémie, byla vystavena cytarabinu, doxorubicinu a bortezomibu. Druhá linie RPMI 8226, která představuje buňky mnohočetného myelomu, byla vystavena opět cytarabinu, dále venetoclaxu a bortezomibu. Použité koncentrace pro cytarabin, doxorubicin a venetoclax byly 0,5  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$  a 8  $\mu\text{M}$ . Pro bortezomid byly použity nižší koncentrace a to 0,5 nM, 1,0 nM, 2 nM, 4 nM a 8 nM.

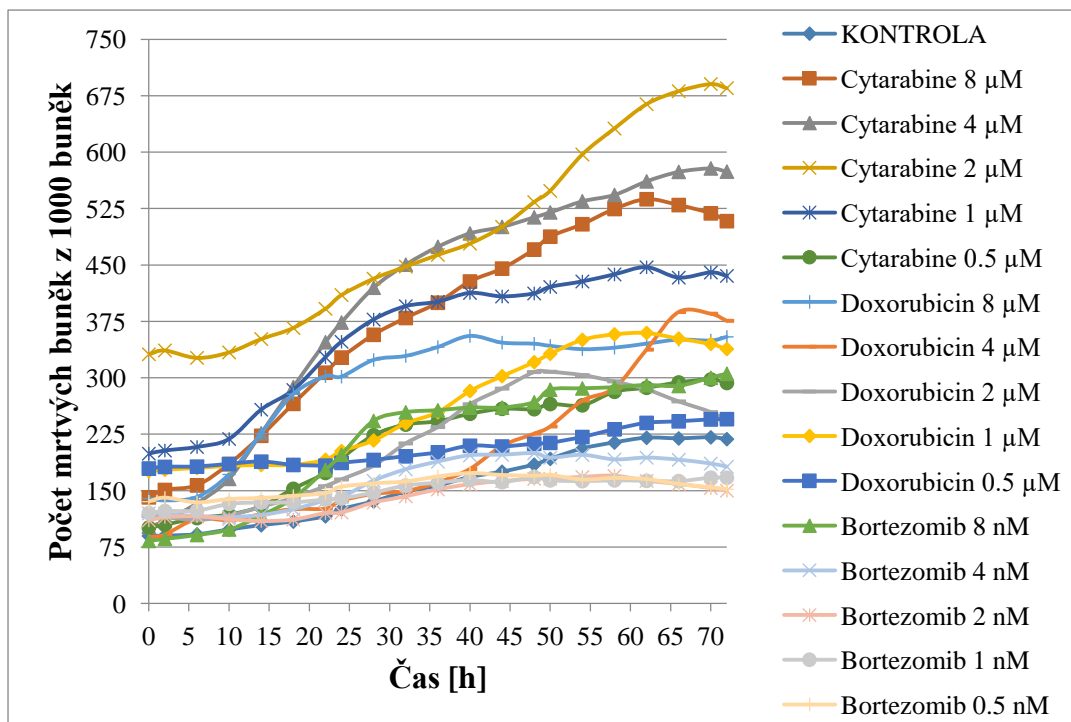
Výsledky efektu chemoterapie u linie KG-1a shrnují grafy 1 až 5.

Graf 1 zobrazuje nárůst počtu mrtvých buněk v čase u všech použitých látek ve všech koncentracích. Z grafu vyplývá, že nejvyšší efekt u této linie prokazoval cytarabin.

Pro lepší přehlednost byly jednotlivé chemoterapie rozděleny do samostatných grafů (graf 2 zobrazuje efekt cytarabinu; graf 3 efekt doxorubicinu a graf 4 bortezomibu).

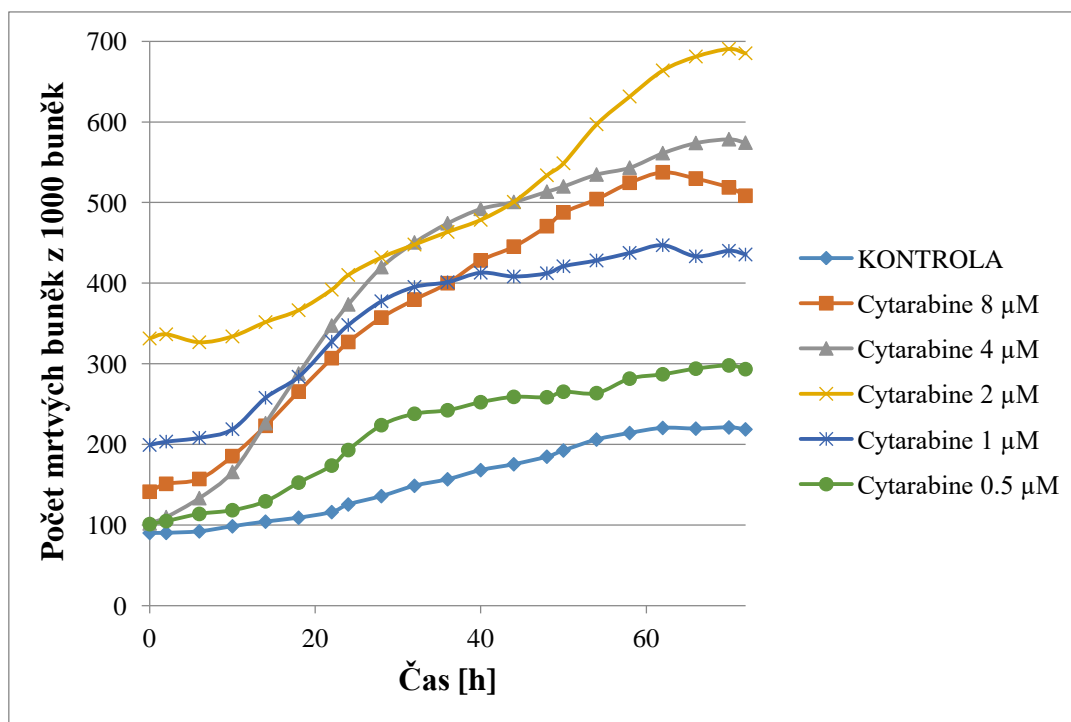
Jelikož výchozí stav mrtvých buněk se u každého typu koncentrace mírně lišil, byl spočítán rozdíl mezi počtem mrtvých buněk v čase 0 a po 72 hodinách (na začátku a na konci experimentu). Tyto výsledky shrnuje graf 5. Z tohoto grafu vyplývá, že nejvyššího efektu u linie KG-1a dosahoval cytarabin a to v koncentraci 4  $\mu\text{M}$  (počet mrtvých buněk dosáhl hodnoty 472,375 z 1000 buněk), dále vysokého efektu dosahoval i cytarabin v koncentraci 8  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$  (hodnoty mrtvých buněk byly 367,175 a 353,75 mrtvých buněk z 1000). U doxorubicinu byl pozorován nejvyšší efekt v koncentraci 4  $\mu\text{M}$  (počet mrtvých buněk 287,621 z 1000). Bortezomib byl nejméně účinný a vyššího efektu dosahovala pouze nejvyšší koncentrace 8 nM (počet mrtvých buněk 222,208 z 1000). I tak se ale jedná o vysoký efekt, jelikož použitá koncentrace bortezomibu byla v nM. Jako vhodná chemoterapie do kombinace s imunoterapií byla u této linie vybrána látka cytarabin v koncentraci 2  $\mu\text{M}$  – byla zde více než 30% účinnost (konkrétně 35 %) a zároveň nejnižší koncentrace v porovnání s ostatními. Obrázek 10 zobrazuje rozdíl mezi kontrolním vzorkem a vzorkem s chemoterapií, u které jsme dosáhli nejvyšší účinnosti (cytarabin 4  $\mu\text{M}$ ) a koncentrací vybranou pro následné použití v kombinované terapii (cytarabin 2  $\mu\text{M}$ ).

**Graf 1: Graf závislosti počtu mrtvých buněk při různých typech chemoterapie a rozdílných koncentracích u linie KG - 1a na čase**



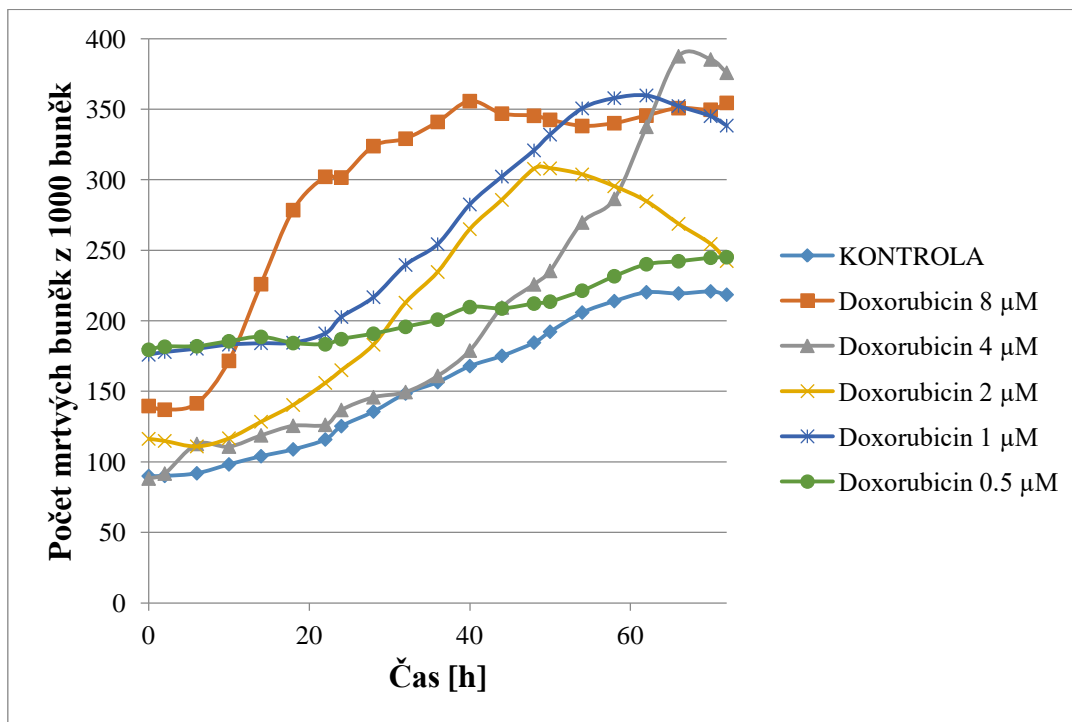
Zdroj: vlastní

**Graf 2: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích cytarabinu u linie KG - 1a**



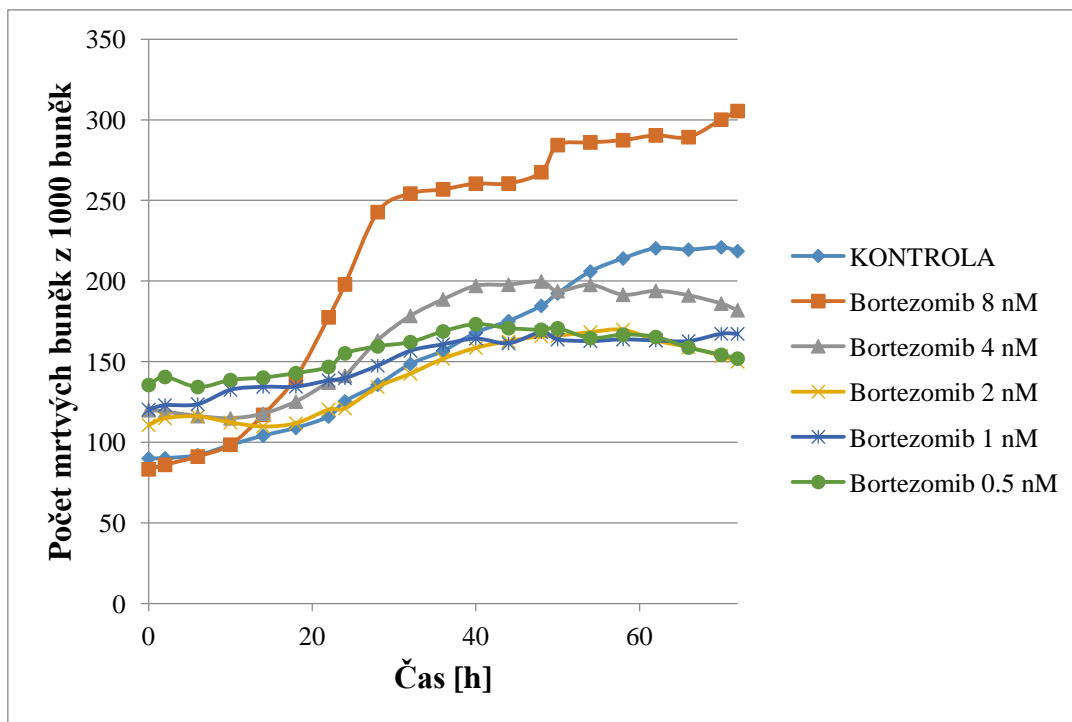
Zdroj: vlastní

**Graf 3: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích doxorubicinu u linie KG - 1a**



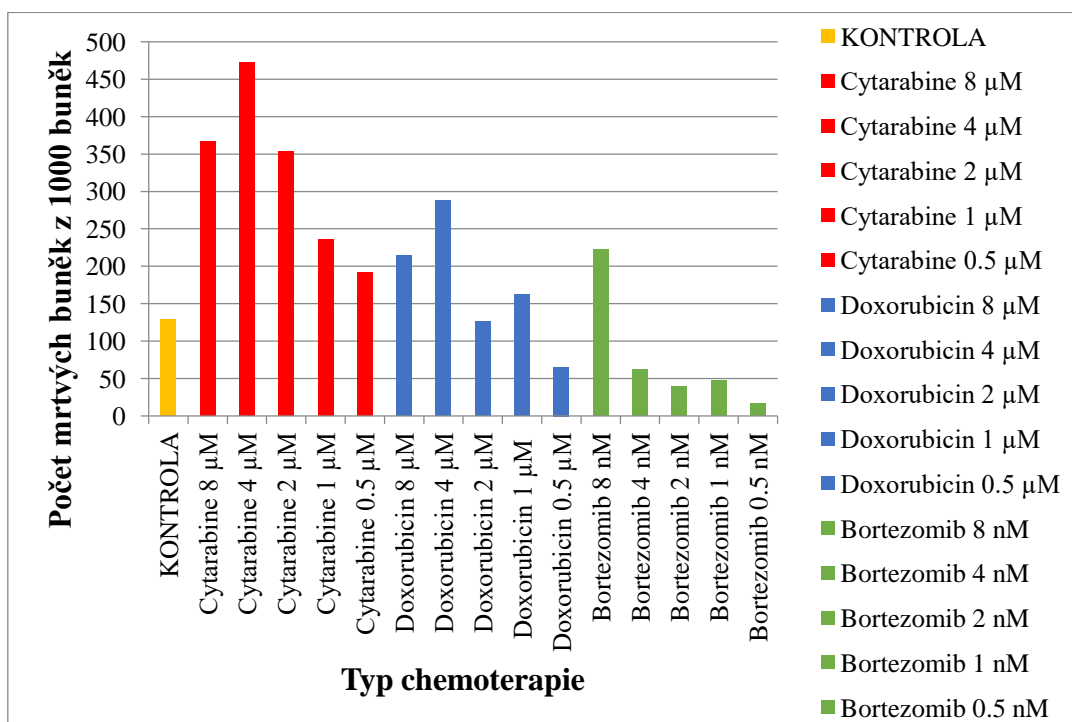
Zdroj: vlastní

**Graf 4: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích bortezomibu u linie KG - 1a**



Zdroj: vlastní

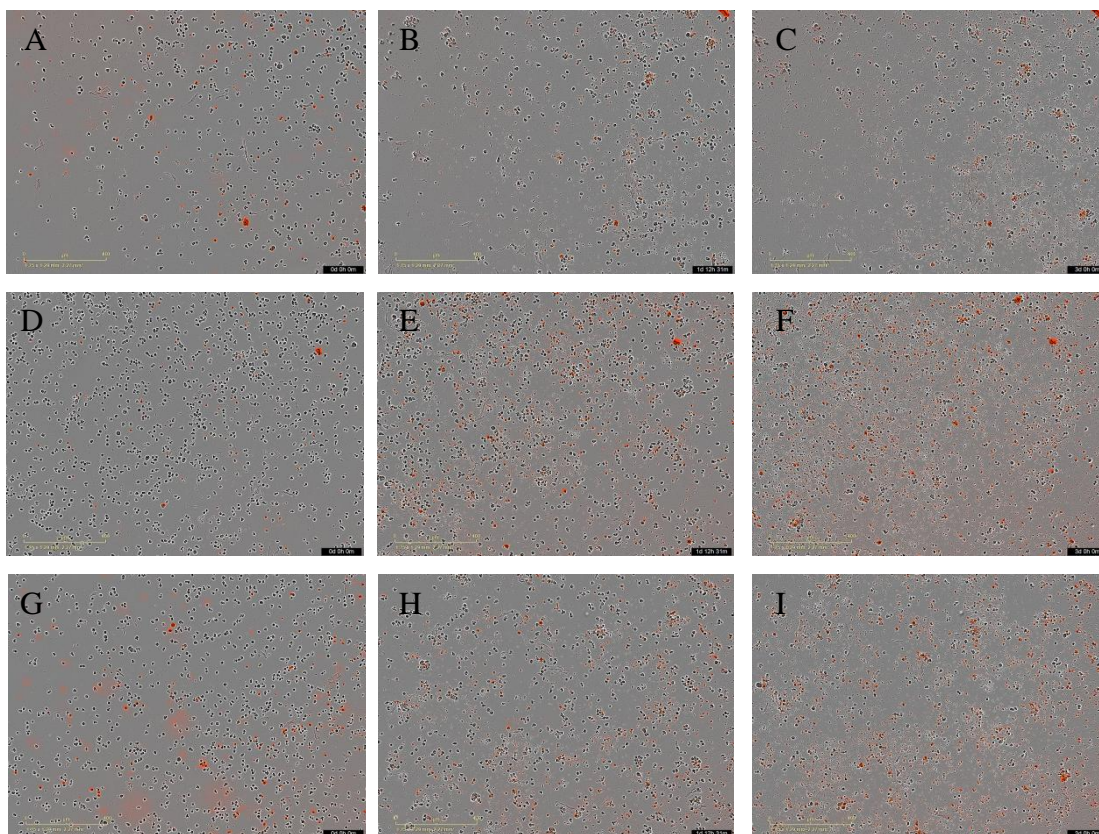
**Graf 5: Graf počtu mrtvých buněk (rozdíl počtu mrtvých buněk mezi koncem a začátkem měření) v závislosti na jednotlivých typech chemoterapie u linie KG - 1a**



*Zdroj: vlastní*

### Obrázek 10: Efekt vybraného typu chemoterapie a její koncentrace u linie KG-1a

A, B, C – neovlivněné buňky (bez chemoterapie) v čase 0; 36 a 72 hod. D, E, F- efekt cytarabinu o koncentraci 4  $\mu\text{M}$  v čase 0; 36 a 72 hod (koncentrace s nejvyšším účinkem). G, H, I - efekt cytarabinu o koncentraci 2  $\mu\text{M}$  v čase 0; 36 a 72 hod (nejvhodnější koncentrace pro kombinaci s imunoterapií).



*Zdroj: vlastní*

U druhé linie RPMI 8226 výsledky účinnosti chemoterapie zobrazují grafy 6 – 10.

Graf 6 zachycuje souhrně účinnost všech použitých chemoterapií ve všech užitých koncentracích. Pro přehlednost byly jednotlivé chemoterapie zpracovány do samostatných grafů - Graf 7 zachycuje efekt cytarabinu, graf 8 účinek venetoclaxu a graf 9 bortezomibu.

Graf 10 dále zobrazuje rozdíl v počtu mrtvých buněk na začátku a na konci experimentu (0 a 72 hodin).

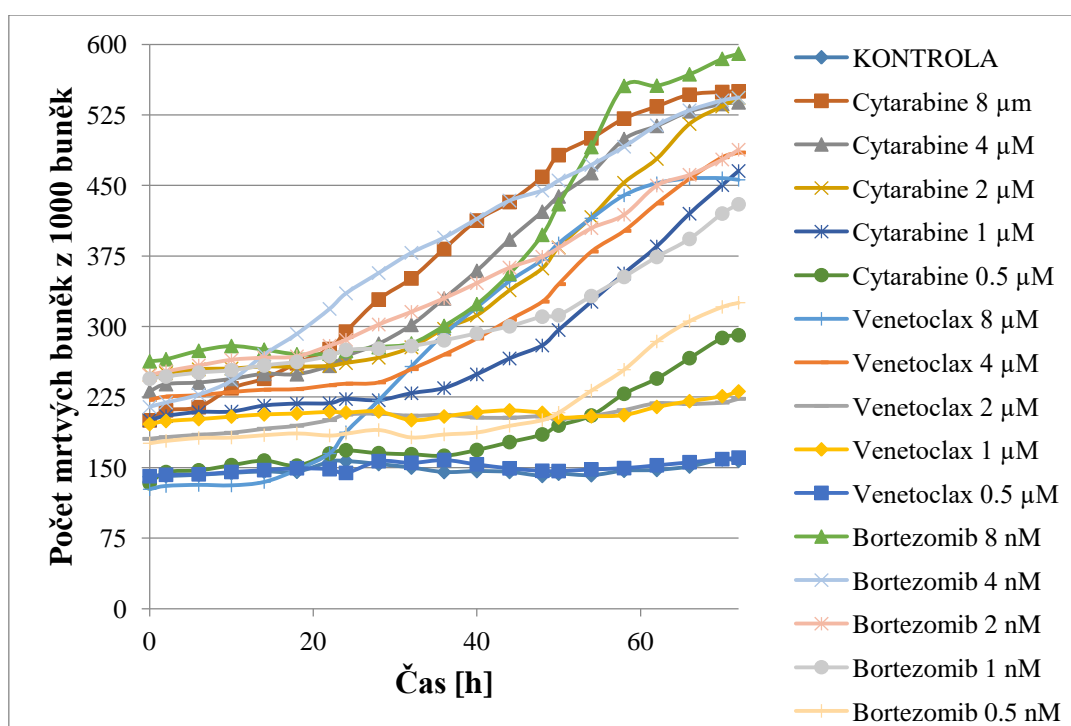
Z grafů vyplívá, že u této linie měla nejvyšší efekt u cytarabinu koncentrace 8  $\mu\text{M}$  (349,925 mrtvých buněk z 1000), u venetoclaxu také koncentrace 8  $\mu\text{M}$  (329,00 mrtvých buněk z 1000) a u bortezomibu 4 nM (328,875 mrtvých buněk z 1000). Vysokého efektu

(více než 30 % mrtvých buněk) ale dosahovaly i další koncentrace a to u cytarabinu 4  $\mu\text{M}$  a u bortezomibu 8 nM.

Jako nejvhodnější chemoterapie v kombinaci s imunoterapií byl vybrán bortezomib v koncentraci 4 nM, kde byla prokázána vysoká efektivita v kombinaci s minimální koncentrací.

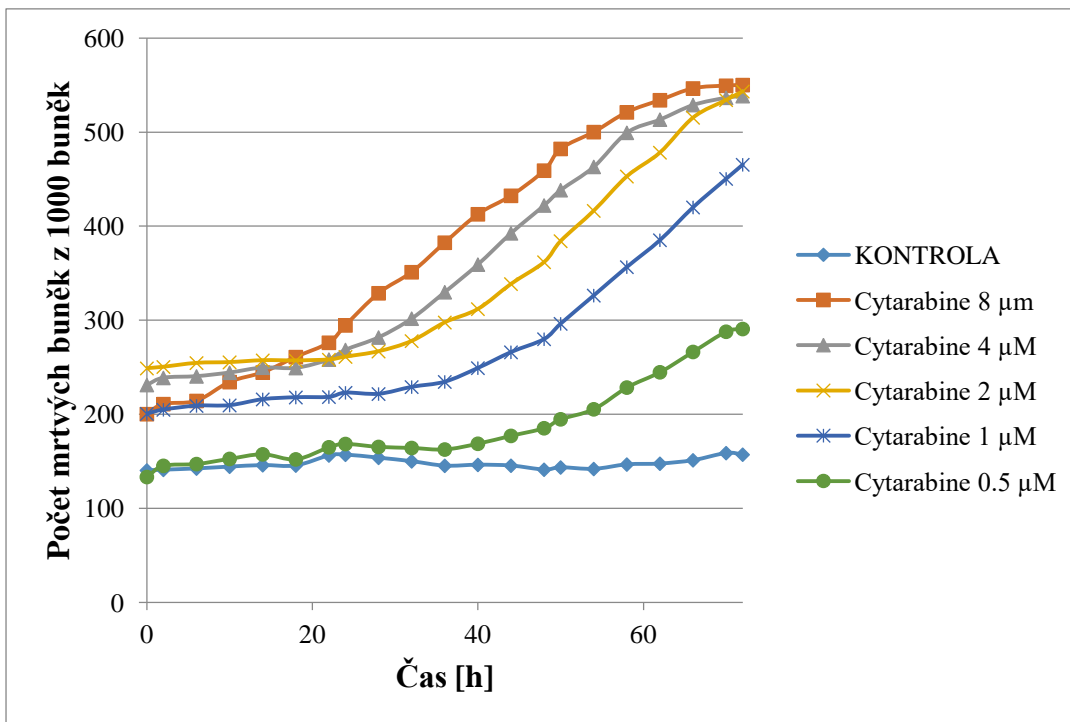
Obrázek 11 zobrazuje rozdíl mezi kontrolním vzorkem a vzorkem s chemoterapií, u které jsme dosáhli nejvyšší účinnosti (cytarabin 8  $\mu\text{M}$ ) a koncentrací vybranou pro následné použití v kombinované terapii (bortezomib 4 nM).

**Graf 6: Graf závislosti počtu mrtvých buněk při různých typech chemoterapie a rozdílných koncentrací u linie RPMI 8226 na čase**



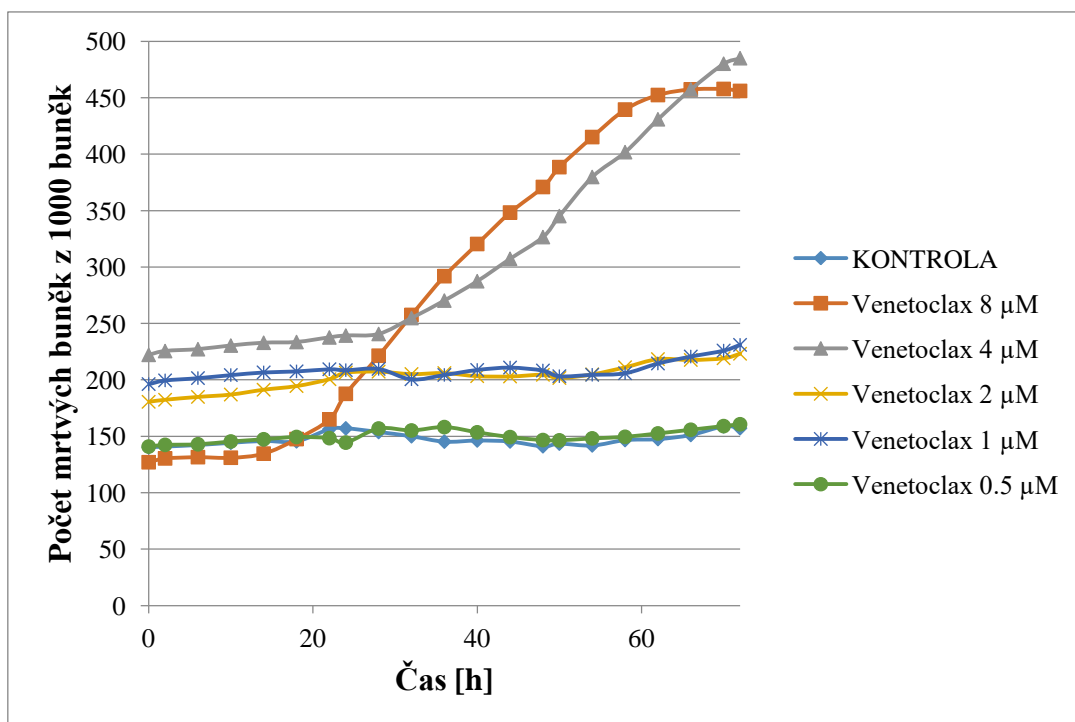
Zdroj: vlastní

**Graf 7: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích cytarabinu u linie RPMI 8226**



Zdroj: vlastní

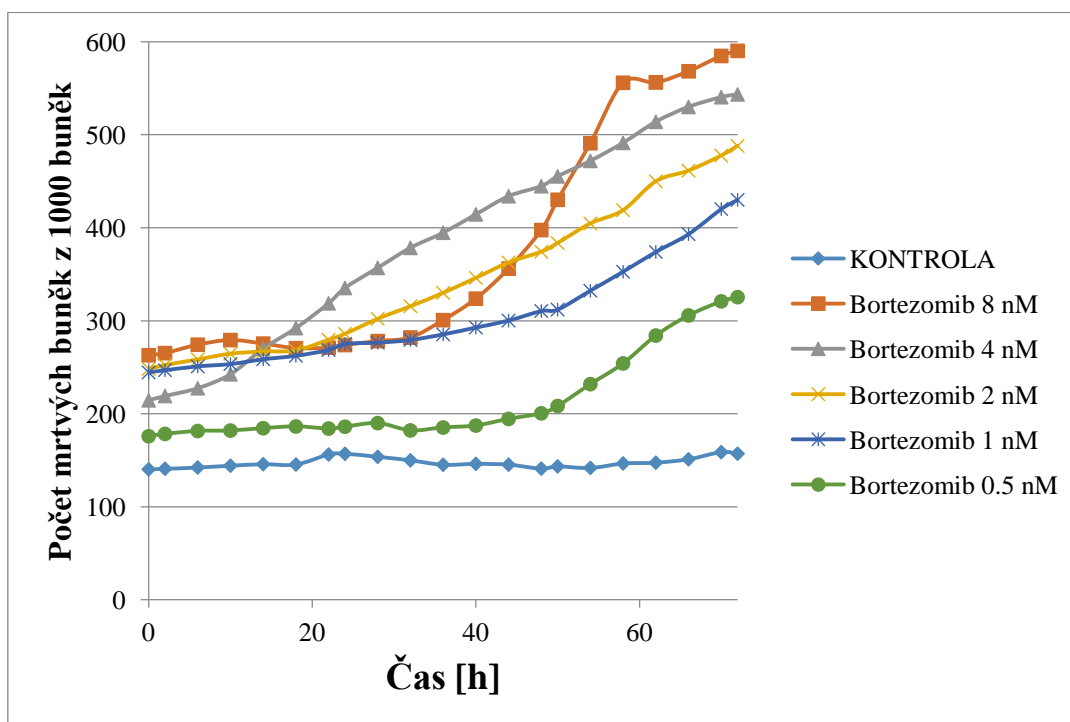
**Graf 8: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích venetoclaxu u linie RPMI 8226**



Zdroj: vlastní

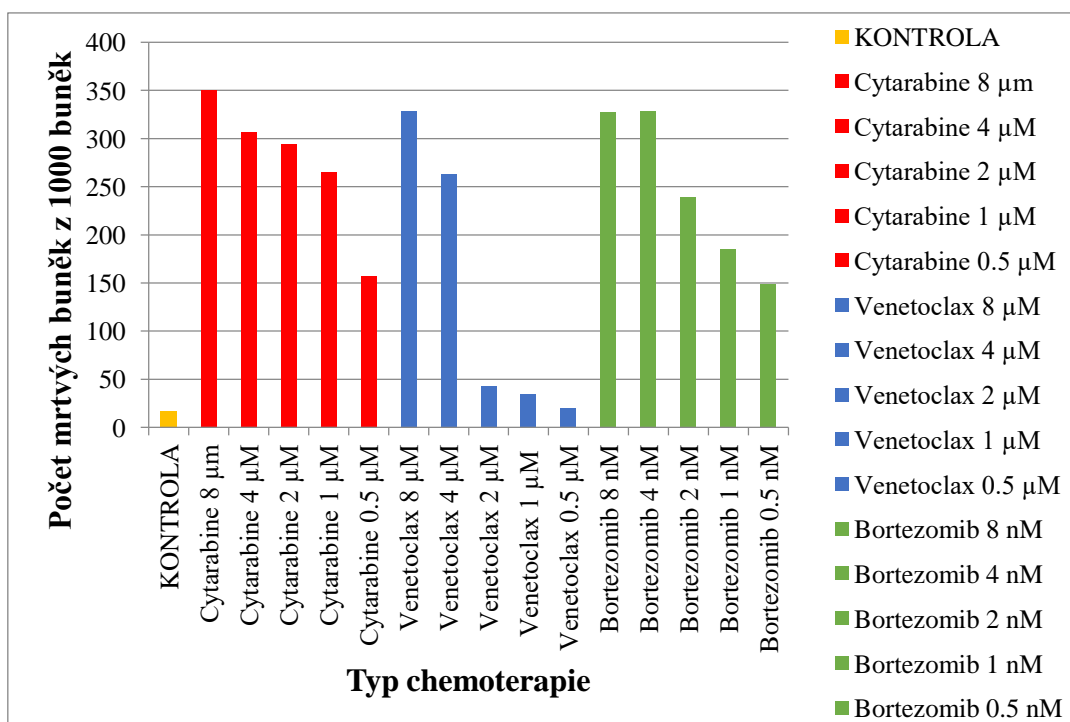


**Graf 9: Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase při různých koncentracích bortezomibu u linie RPMI 8226**



Zdroj: vlastní

**Graf 10: Graf počtu mrtvých buněk (rozdíl počtu mrtvých buněk mezi koncem a začátkem měření) v závislosti na jednotlivých typech chemoterapie u linie RPMI 8226**

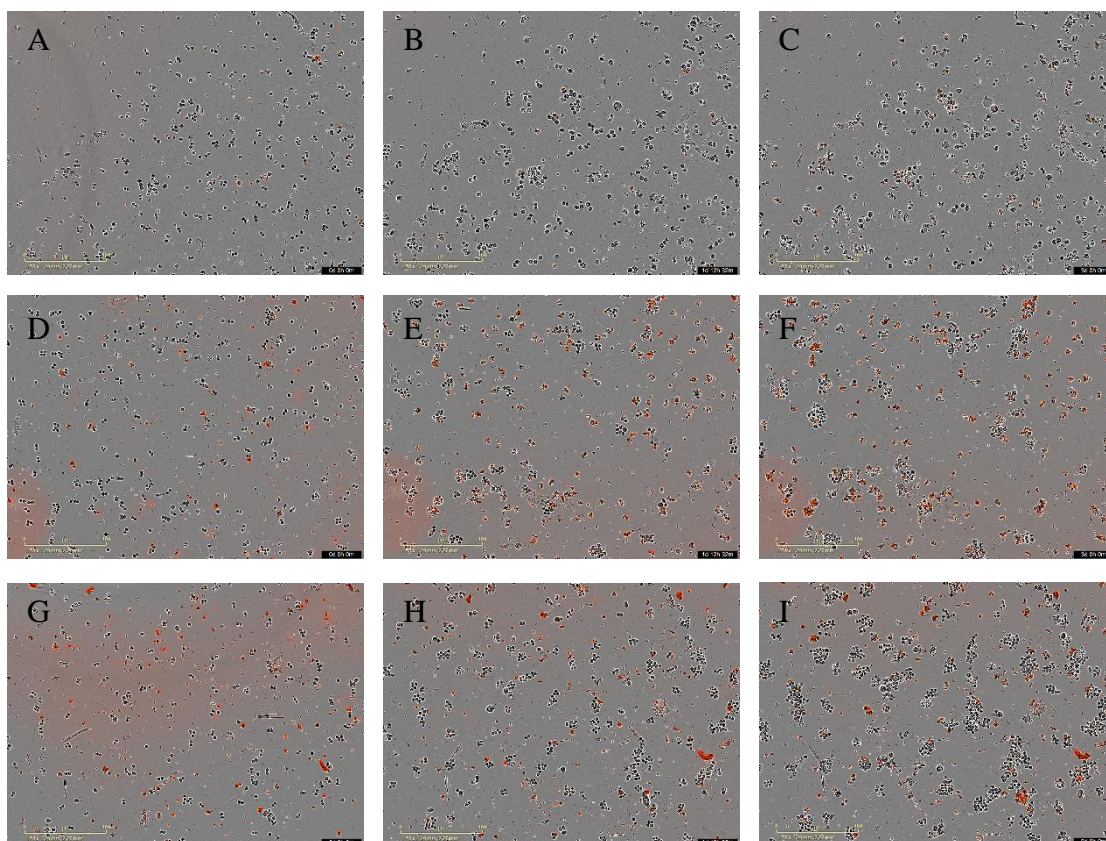


Zdroj: vlastní



**Obrázek 11: Efekt vybraného typu chemoterapie a její koncentrace u linie RPMI 8226**

A, B, C – neovlivněné buňky (bez chemoterapie) v čase 0; 36 a 72 hod. D, E, F – efekt cytarabinu o koncentraci 8  $\mu\text{M}$  v čase 0; 36 a 72 hod (koncentrace s nejvyšším účinkem). G, H, I – efekt bortezomibu o koncentraci 4 nM v čase 0; 36 a 72 hod (nejvhodnější koncentrace pro kombinaci s imunoterapií).



*Zdroj: vlastní*

## DISKUZE

Hlavním cílem bakalářské práce bylo porovnat účinky různých typů chemoterapie na buněčné linie a to konkrétně na linii KG-1a, která představovala onemocnění akutní myeloidní leukemie a linii RPMI 8226, která zastupovala onemocnění mnohočetného myelomu.

Jedná se o velice častá a závažná hemato-onkologická onemocnění, jejichž léčba je složitá, pro pacienta náročná a doprovázená řadou nežádoucích účinků. Tyto účinky by mohly být eliminovány nebo alespoň zmírněny, kdyby v rámci terapie mohl být použit co nejúčinnější typ chemoterapie a v co nejnižší dávce. Toho by bylo možné dosáhnout v kombinované imunoterapii. Kdyby chemoterapie byla kombinována s přirozenými protinádorovými imunitními mechanismy, tj. např. s NK buňkami.

Několik studií ukázalo, že infiltrace NK buněk do maligních nádorů byla spojena s lepšími klinickými výsledky, pokud je chemoterapie a imunoterapie aplikována současně. (Markasz et al. 2007)

V naší studii jsme se zaměřili na identifikaci vhodného typu a koncentrace chemoterapie, se kterou bychom mohli dále pracovat při experimentech s kombinovanou imunoterapií. Zaměřili jsme se na porovnání účinnosti cytarabinu, doxorubicinu a bortezomibu u linie KG-1a a cytarabinu, venetoclaxu a bortezomibu u linie RPMI 8226. Koncentrace jednotlivých typů chemoterapie byly pro cytarabin, doxorubicin a venetoclax 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1,0  $\mu\text{M}$ ; 2,0  $\mu\text{M}$ ; 4,0  $\mu\text{M}$  a 8,0  $\mu\text{M}$ . Pro bortezomib byly použity koncentrace nižší a to 0,5 nM; 1,0 nM; 2,0 nM; 4, nM; a 8 nM.

Cytarabin je hojně využíván v léčbě určitých hematologických malignit. Jeho vysoké dávky ale mohou způsobit záchvaty či mozkovou dysfunkci. (Baker et al. 2016) Doxorubicin je široce používán v chemoterapii kvůli své účinnosti v boji proti širokému spektru, jako jsou sarkomy či karcinomy. Toto léčivo však negativně ovlivňuje například mozek, ledviny a játra. (Carvalho et al. 2009) Bortezomib se zaměřuje nejen na myelomové buňky, ale působí i v prostředí kostní dřeně, inhibuje vazbu buněk myelomu na stromální buňky kostní dřeně a prokazuje anabolické účinky na kost. (Curran a McKeage 2009) Venetoclax indukuje buněčnou smrt v buňkách mnohočetného myelomu.

Prvním z cílů bylo stanovit neúčinnější koncentraci cytarabinu, doxorubicinu a bortezomibu u linie KG-1a. U linie KG-1a byla identifikována jako neúčinnější kombinace cytarabinu v koncentraci 4  $\mu$ M, kde počet mrtvých buněk z 1000 dosáhl hodnoty 472, 375 buněk. Vysokého efektu dosahovala i koncentrace 4 $\mu$ M u doxorubicinu (počet mrtvých buněk dosáhl hodnoty 287, 621 buněk). U bortezomibu se ukázala neefektivnější koncentrace 8 nM (počet mrtvých buněk byl 222, 208).

Druhým cílem práce bylo stanovit neúčinnější koncentraci cytarabinu, venetoclaxu a bortezomibu u linie RPMI 8226. Výsledky tak prokázaly, že neúčinnější koncentrací u cytarabinu se jeví koncentrace 8  $\mu$ M (počet mrtvých buněk z 1000 dosáhl hodnoty 350, 00 buněk). U venetoclaxu to byla též koncentrace 8  $\mu$ M (počet mrtvých buněk byl 329, 00 buněk z 1000) a u bortezomibu se jednalo o koncentrace 4 a 8 nM (hodnoty mrtvých buněk dosahovaly 328, 875 a 327, 20 buněk z 1000).

Žádná z použitých koncentrací ale nedosahuje alespoň 50% účinku na nádorové buňky. To ale v našem experimentu nebylo nutné, jelikož naším dalším cílem, konkrétně třetím, bylo najít nejnižší koncentraci u dané chemoterapie s minimálně 30% efektivitou pro možnost jejího využití do kombinované léčby s NK buňkami. Pro linii KG-1a byla jako nejvhodnější látka a koncentrace vybrán cytarabin v 2  $\mu$ M koncentraci, kde účinnost dosáhla 35 %. Pro kombinovanou terapii u linie RPMI 8226 byl zvolen bortezomib s 4 nM koncentrací, jehož účinnost také přesahovala 30 %.

Nové studie naznačují, že několik běžných chemoterapeutických látek může vykazovat přímé stimulační účinky na imunitní buňky, i když jsou aplikovány ve velmi nízkých koncentracích. Nedávná charakteristika mechanismů protinádorové léčby s použitím kombinované terapie naznačuje, že by mohla vést k novému paradigmatu léčby hematologických onemocnění. (Landreneau et al. 2015)

Námi získané výsledky poslouží pro navazující studie, kde již budou tyto konkrétní vytypované typy chemoterapie a jejich vhodné koncentrace užity v kombinaci s NK buňkami a bude sledován jejich efekt na nádorové buňky. Efekt bude nejprve sledován u komerčních buněčných linií (KG-1a a RPMI 8226), ale hlavním cílem je nastavení kombinované imunoterapie u primárních nádorových buněk od konkrétních pacientů.

Přístroj IncuCyte® se z našich závěrů jeví jako vhodná metoda pro studium těchto pochodů a dějů. Jeho velkou výhodou je, že nám umožňuje kontinuální sledování dějů při experimentu a toto sledování může být i zpětné.

## ZÁVĚR

Má bakalářská práce měla za úkol stanovit nejvhodnější koncentraci cytostatika pro použití v kombinaci s imunoterapií, konkrétně s NK buňkami, což by v následné léčbě hematologických malignit mohlo mít za následek snížení nebo dokonce i eliminaci nežádoucích účinků chemoterapie. Stanovené cíle této bakalářské práce byly splněny a získané výsledky poslouží pro navazující studie.

## SEZNAM LITERATURY

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK, 2008. *HEMATOLOGIE - přehled maligních hematologických nemocí*. 2. doplněné a zcela přepracované vydání. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-2502-4.

ANGTUACO, Edgardo J. C., Athanasios B. T. FASSAS, Ronald WALKER, Rajesh SE-THI a Bart BARLOGIE, 2004. Multiple Myeloma: Clinical Review and Diagnostic Imaging. *Radiology* [online]. **231**(1), 11–23. ISSN 0033-8419. Dostupné z: doi:10.1148/radiol.2311020452

AQUINO VM, 2002. Acute myelogenous leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 32: 50-58.

BAKER, W. J., G. L. Royer JR a R. B. WEISS, 2016. Cytarabine and neurologic toxicity. *Journal of Clinical Oncology* [online]. [vid. 2021-02-20]. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.1991.9.4.679

BIRD, Sarah Anne a Kevin BOYD, 2019. Multiple myeloma: an overview of management. *Palliative Care & Social Practice* [online]. Vol: 13: 1-13. Dostupné z: doi:10.1177/117822421986B235

CARDONA-BENAVIDES, Ignacio J., Cristina DE RAMÓN a Norma C. GUTIÉRREZ, 2021. Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells* [online]. **10**(2). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10020336

CARVALHO, Cristina, Renato X. SANTOS, Susana CARDOSO, Sonia CORREIA, Paulo J. OLIVEIRA, Maria S. SANTOS a Paula I. MOREIRA, 2009. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry* [online]. **16**(25), 3267–3285. Dostupné z: doi:10.2174/092986709788803312

CRANE MM, STROM SS, STROM SS a ET AL., 1996. Correlation between selected environmental exposures and karyotype in acute myelocytic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 5: 639-644.

CURRAN, Monique P. a Kate MCKEAGE, 2009. Bortezomib. *Drugs* [online]. **69**(7), 859–888. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200969070-00006

DARANI, Samaneh Fathi, Farzaneh Ghazizadeh AHSAIE, Gholamreza PAZUKI a Shiva ABDOLRAHIMI, 2020. Aqueous two-phase systems based on thermo-separating copolymer for partitioning of doxorubicin. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 114542. ISSN 0167-7322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2020.114542

DEEKS, Emma D., 2016. Venetoclax: First Global Approval. *Drugs* [online]. **76**(9), 979–987. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-016-0596-x

DESCHLER, Barbara a Michael LÜBBERT, 2006. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer* [online]. **107**(9), 2099–2107. ISSN 1097-0142. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.22233

DOLEŽALOVÁ, Lenka, 2016. Cílená léčba u nádorových onemocnění krve. *Solen*. 133-137, 5.

HAMADA, Akinobu, Takeo KAWAGUCHI a Masahiro NAKANO, 2002. Clinical Pharmacokinetics of Cytarabine Formulations. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. **41**(10), 705–718. ISSN 1179-1926. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200241100-00002

HARRIS, Nancy Lee, Elaine S JAFFE, Jacques DIEBOLD, Georges FLANDRIN, H. Konrad MULLER-HERMELINK, James VARDIMAN, T. Andrew LISTER a Clara D BLOOMFIELD, 2000. The World Health Organization Classification of Hematological Malignancies Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Modern Pathology* [online]. **13**(2), 193–207. ISSN 0893-3952, 1530-0285. Dostupné z: doi:10.1038/modpathol.3880035

HOLM, Christine, Joseph M. COVEY, Donna KERRIGAN a Yves POMMIER, 1989. Differential Requirement of DNA Replication for the Cytotoxicity of DNA Topoisomerase I and II Inhibitors in Chinese Hamster DC3F Cells. *Cancer Research*. **49**(22), 6365–6368. ISSN 0008-5472, 1538-7445.

IBRAHIM, Yasir H., Celina GARCÍA-GARCÍA, Violeta SERRA, Lei HE, Kristine TORRES-LOCKHART, Aleix PRAT, Pilar ANTON, Patricia COZAR, Marta GUZMÁN, Judit GRUESO, Olga RODRÍGUEZ, Maria Teresa CALVO, Claudia AURA, Orland DÍEZ, Isabel T. RUBIO, José PÉREZ, Jordi RODÓN, Javier CORTÉS, Leif W. ELLISEN, Maurizio SCALTRITI a José BASELGA, 2012. PI3K Inhibition Impairs BRCA1/2 Expression and Sensitizes BRCA-Proficient Triple-Negative Breast Cancer to PARP Inhibition. *Cancer Discovery* [online]. **2**(11), 1036–1047. ISSN 2159-8274, 2159-8290. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0348

INDRÁK, Karel, 2014. *Hematologie a transfúzní lékařství*. Praha: Stanislav Juhaňák - TRITON. ISBN 978-7387-722-4.

KARAS, Michal, 2011. Akutní myeloidní leukemie u nemocných nad 60 let, možnosti její léčby a potenciální role alogenní transplantace krvetvorných buněk. *Onkologie*. **5**(2), 91–95. ISSN 18024475, 18035345.

KAWANABE, Yoshifumi a Surya M. NAULI, 2011. Endothelin. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **68**(2), 195–203. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-010-0518-0

KAYE, SB, 1998. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *British Journal of Cancer*. 7.

KLENER JR., Pavel a Pavel KLENER, 2013. *Principy systémové protinádorové léčby*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s. ISBN 978-80-247-4171-0.

KLENER, Pavel, 2011. *Základy Klinické Onkologie*. První vydání. Praha 5: Galén. ISBN 978-80-7262-716-5.

KOEFFLER, HP, R BILLING, AJ LUSIS, R SPARKES a DW GOLDE, 1980. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood* [online]. **56**(2), 265–273. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V56.2.265.265

LANDRENEAU, Joshua P., Michael R. SHURIN, Marianna V. AGASSANDIAN, Anton A. KESKINOV, Yang MA a Galina V. SHURIN, 2015. Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy. *Cancer Microenvironment* [online]. **8**(2), 57–64. ISSN 1875-2284. Dostupné z: doi:10.1007/s12307-013-0141-3

LYSÁK, Daniel, 2015. Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů. *Onkologie*. **9**(1), 13–18. ISSN 18024475, 18035345.

MARKASZ, Laszlo, Gyorgy STUBER, Bruno VANHERBERGHEN, Emilie FLABERG, Eva OLAH, Ennio CARBONE, Staffan EKSBORG, Eva KLEIN, Henriette SKRIBEK a Laszlo SZEKELY, 2007. Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. **6**(2), 644–654. ISSN 1535-7163, 1538-8514. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0358

MATĚJKOVÁ, Jana, Lenka BEŠŠE, Lenka SEDLAŘÍKOVÁ, Anna POTÁČKOVÁ, Roman HÁJEK a Sabina ŠEVČÍKOVÁ, 2013. Degradation of Proteins by Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Klinická onkologie* [online]. **26**(4), 251–256. ISSN 0862495X, 18025307. Dostupné z: doi:10.14735/amko2013251

MÍRKA, Hynek, 2006. *MOŽNOSTI VÝPOČETNÍ TOMOGRAFIE S VYSOKOU ROZLIŠOVACÍ SCHOPNOSTÍ V DIAGNOSTICE PLICNÍCH KOMPLIKACÍ HEMATOONKOLOGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ*. 2006. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze Lékařská fakulta v Plzni Radiodiagnostická klinika.

MOORE, G. E. a H. KITAMURA, 1968. Cell line derived from patient with myeloma. *New York State Journal of Medicine*. **68**(15), 2054–2060. ISSN 0028-7628.

MRIDHA PRIYANKA, Pal PALLABI a Roy KUNAL, 2014. Chemometric modelling of triphenylmethyl derivatives as potent anticancer agents. *Molecular Simulation* **40**:15. 1218–1235.

OKSUZOGLU, Emine, Betul TEKINER-GULBAS, Sabiha ALPER, Ozlem TEMIZ-ARPACI, Tugba ERTAN, Ilkay YILDIZ, Nuran DIRIL, Esin SENNER-AKI a Ismail YALCIN, 2008. Some benzoxazoles and benzimidazoles as DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. **23**(1), 37–42. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756360701342516

PARTRIDGE, Ann H., Harold J. BURSTEIN a Eric P. WINER, 2001. Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Early-Stage Breast Cancer. *JNCI Monographs* [online]. **2001**(30), 135–142. ISSN 1052-6773. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003451

POGODA JM, PRESTON-MARTIN S, NICHOLS PW a ROSS RK, 2002. Smoking and risk of acute myeloid leukemia: results from a Los Angeles County case-control study. *Am J Epidemiol*. **155**: 546-553.

POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER, 2013. *Molekulární hematologie*. Praha 5: Galén. ISBN 978-80-7262-942-8.

PUI CH, 1995. Childhood leukemias. *N Engl J Med*. **332**:1618-1630.



REBUCCI, Magali a Carine MICHIELS, 2013. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology* [online]. **85**(9), 1219–1226. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2013.02.017

REVILLE, Patrick K. a Tapan M. KADIA, 2020. Maintenance Therapy in AML. *Frontiers in Oncology* [online]. **10**, 619085. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.619085

RÍOS-MARCO, Pablo, Carmen MARCO, Xiomara GÁLVEZ, José M. JIMÉNEZ-LÓPEZ a María P. CARRASCO, 2017. Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. **1859**(9, Part B), Membrane Lipid Therapy: Drugs Targeting Biomembranes, 1657–1667. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2017.02.016

ROBERT A. KYLE, 1992. Diagnostic Criteria of Multiple Myeloma, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 347–358. ISSN 0889-8588.

RODRIGUEZ-ABREU, D., A. BORDONI a E. ZUCCA, 2007. Epidemiology of hematological malignancies. *Annals of Oncology* [online]. **18**, i3–i8. ISSN 09237534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdl443

RONGZHENG XU, QIKANG GAO, SHIJIONG WANG, HSIAOHSIAN KAN, LIYING SHENG, CUIQUING LI, XIAOHONG ZHANG, GENBO XU a KEQI ZHANG, 1996. Human acute myeloid leukemias may be etiologically associated with new human retroviral infection. *Leukemia Research*. 449–455. ISSN 0145-2126.

RORY M. SHALLIS, RONG WANG, AMY DAVIDOFF, XIAOMEI MA a (RORY M. SHALLIS, RONG WANG, AMY DAVIDOFF, XIAOMEI MA, AMER M. ZEIDAN, 2019. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*. 70–87. ISSN 0268-960X.

SANDLER DP a COLLMAN GW, 1987. Cytogenetic and environmental factors in the etiology of the acute leukemias in adults. *Am J Epidemiol*. 126: 1017-1032.

TEWARI, Krishnansu S., 2007. Chapter 16 - Cancer in Pregnancy. In: Philip J. DISAIA a William T. CREASMAN, ed. *Clinical Gynecologic Oncology (Seventh Edition)* [online]. Edinburgh: Mosby, s. 467–531 [vid. 2020-09-06]. ISBN 978-0-323-03978-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-032303978-9.50019-8

TOMÁŠEK, Jiří, 2015. *Onkologie - minimum pro praxi*. První vydání. Praha: Axonite CZ, s.r.o. ISBN 978-80-88046-01-1.

TSENG, Yolanda D. a Andrea K. NG, 2020. Hematologic Malignancies. *Hematology/Oncology Clinics of North America* [online]. **34**(1), 127–142. ISSN 1558-1977. Dostupné z: doi:10.1016/j.hoc.2019.08.020

VAKITI, Anusha a Prerna MEWAWALLA, 2021. Acute Myeloid Leukemia. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2021-02-28]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>

VAN DE DONK, Niels W. C. J., Charlotte PAWLYN a Kwee L. YONG, 2021. Multiple myeloma. *Lancet (London, England)* [online]. **397**(10272), 410–427. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(21)00135-5

VAN VUUREN, Rustelle Janse, Michelle H. VISAGIE, Anne E. THERON a Annie M. JOUBERT, 2015. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. **76**(6), 1101–1112. ISSN 1432-0843. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-015-2903-8

VOKURKA, Samuel, 2008. *Základní hemato - onkologická onemocnění a jejich charakteristiky*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-553-6.

VYDRA, Jan, Jan NOVÁK a Marie LAUERMANNOVÁ, 2019. *Hematologie v kostce*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha 4: Mladá fronta a. s. ISBN 978-80-204-5140-8.

WEI, Andrew, Stephen A. STRICKLAND, Jing-Zhou HOU, Walter FIEDLER, Tara L. LIN, Roland B. WALTER, Anoop K. ENJETI, Wan-Jen HONG, Brenda CHYLA, Relja POPOVIC, Kaffa FAKOUHI, Tu XU, John HAYSLIP a Gail J. ROBOZ, 2018. Venetoclax with Low-Dose Cytarabine Induces Rapid, Deep, and Durable Responses in Previously Untreated Older Adults with AML Ineligible for Intensive Chemotherapy. *Blood* [online]. **132**(Supplement 1), 284–284. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2018-99-118729

WILHELM, Marek, 2020. Vliv cytochromů P450 na metabolismus protinádorových léčiv vázaných v apoferritinové nanočástici [online]. [vid. 2021-03-05]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/119809>

ZABLUDOFF, Sonya D., Chun DENG, Michael R. GRONDINE, Adam M. SHEEHY, Susan ASHWELL, Benjamin L. CALEB, Stephen GREEN, Heather R. HAYE, Candice L. HORN, James W. JANETKA, Dongfang LIU, Elizabeth MOUCHET, Shannon READY, Judith L. ROSENTHAL, Christophe QUEVA, Gary K. SCHWARTZ, Karen J. TAYLOR, Archie N. TSE, Graeme E. WALKER a Anne M. WHITE, 2008. AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. **7**(9), 2955–2966. ISSN 1535-7163, 1538-8514. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0492

ZAZA, Gianluigi, Meyling CHEOK, Natalia KRYNETSKAIA, Caroline THORN, Gabriele STOCCO, Joan M. HEBERT, Howard MCLEOD, Richard M. WEINSHILBOUM, Mary V. RELLING, William E. EVANS, Teri E. KLEIN a Russ B. ALTMAN, 2010. Thiopurine pathway. *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. **20**(9), 573–574. ISSN 1744-6872. Dostupné z: doi:10.1097/FPC.0b013e328334338f