



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Genová exprese PD-1 u paragangliomu a feochromocytomu**

**Gene expression of PD-1 in paraganglioma and pheochromocytoma**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Hrdý, Ph. D.

**Michaela Šimová**

---

**Kladno 2018**

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student:                   **Michaela Šímová**  
Obor:                        Zdravotní laborant  
Téma:                       **Genová exprese PD-1 u paragangliomu a feochromocytomu**  
Téma anglicky:           Gene Expression of PD-1 in Paraganglioma and Pheochromocytoma

### Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :

Předmětem bakalářské práce bude porovnání exprese PD-1 u pacientů s paragangliomem a feochromocytomem. Molekuly PD-1 jsou součástí inhibiční dráhy PD-1/PD-L1, považované za jeden z kontrolních bodů imunitního systému, které za normálních okolností chrání organismus před neadekvátními imunitními reakcemi (např. autoimunitní). PD-1 může však být jednou z příčin nádorové tolerance, kdy nádorová tkáň začne exprimovat PD-1 ve vyšší míře a tím je schopná zabránit imunitnímu systému v likvidaci nádorových buněk. V teoretické části budou shrnuty poznatky o paragangliomu a feochromocytomu, jejich projevy, možná rizika, závažnost onemocnění, diagnostika a vliv nádoru na změny hladiny katecholaminu v organismu a rovněž dostupné terapeutické postupy. V praktické části bude sledována genová exprese PD-1 v nádorové tkáni nadledvinek u nemocných jedinců a porovnána s expresí u zdravých lidí. Lepší pochopení exprese imunoregulačních molekul v nádorové tkáni může přispět jednak k lepší diagnóze a určení klinické závažnosti a jednak k navržení optimálních terapeutických postupů.

### Seznam odborné literatury:

- [1] GARCIA-DIAZ, A. et al., Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression, Cell reports, číslo 19 (6), 2017, 1189-1201 s., ISSN 2211-1247
- [2] Kim, KY. et al., Disentangling of Malignancy from Benign Pheochromocytomas/Paragangliomas, Ahmad A, PloS ONE, číslo 11(12), 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0168413
- [3] ZÁVADOVÁ, Eva, Onkologická imunologie, Praha: Mladá fronta, Aeskulap, 2015, 318 s., ISBN 978-80-204-3756-3

Zadání platné do:   13.09.2019

Vedoucí:                RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Genová exprese PD-1 u paragangliomu a feochromocytomu vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2018

.....  
Michaela Šimová

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za pečlivé vedení, veškerý věnovaný čas, trpělivost, cenné rady a konstruktivní připomínky. Děkuji také pracovníkům Ústavu imunologie a mikrobiologie při 1. lékařské fakultě, Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za pomoc při zpracovávání analyzovaného materiálu.

## **Abstrakt**

Bakalářská práce pojednává o problematice vzácných nádorů nadledvinek (paragangliomu a feochromocytomu) a zaměřuje se na genovou expresi programmed cell death 1 (dále jen PD-1), které využívají nádorové buňky k potlačení imunitní odpovědi. PD-1 by mohla být terapeutickým cílem podobně jako u jiných nádorů.

Obecná část se zaměřuje na neuroendokrinní nádory, změny metabolismu katecholaminů, protinádorovou imunitu, molekuly PD-1 a její ligandy PD-ligand 1/2 (PD-L1/2, programmed death domain ligand 1/2), funkci inhibiční dráhy PD-1/PD-L1 a nádorovou toleranci. Následně jsou popsány dostupné diagnostické a terapeutické postupy.

Praktická část se věnuje porovnání genové exprese PD-1 ve vzorcích tkáně onkologických pacientů s paragangliomem či feochromocytomem se vzorky tkáně zdravého jedince. Ke zjištění hodnot genové exprese PD-1 byly použity metody izolace ribonukleové kyseliny, reverzní transkripce z ribonukleové kyseliny na komplementární deoxyribonukleovou kyselinu a kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase.

Z výsledků je patrná odlišnost genové exprese PD-1 mezi skupinou nemocných pacientů a zdravých jedinců, z čehož vyplývá, že je vyšší exprese PD-1 v nádorové tkáni. Exprese PD-1 je ovlivňována mnoha imunitními a genetickými mechanismy. Výsledky by mohly přispět k porozumění role imunoregulačních molekul u nádorového onemocnění a následné optimalizaci léčby.

## **Klíčová slova**

feochromocytom, nadledvinky, neuroendokrinní nádory, paragangliom, PCR, PD-1.

## **Abstract**

This bachelor's thesis is focusing on topic of rare tumours of adrenal glands, (paraganglioma and pheochromocytoma) and targeting gene expression of the programmed cell death 1 (PD-1) which is used by tumour cells to inhibit the immune response. PD-1 could be a therapeutic target similarly as in other types of tumours.

The theoretical part describes neuroendocrine tumours, changes in catecholamine metabolism, antitumor immunity, PD-1 molecule and its ligands PD-ligand 1/2 (PD-L1 and PD-L2), the function of PD-1/PD-L1 inhibitory pathway and tumour tolerance. Consequently, diagnostic and therapeutic approaches are described.

The practical part aim at comparison of the gene expression of PD-1 in samples of tissue of oncological patients affected by paraganglioma or pheochromocytoma and samples of the healthy individuals. To ascertain gene expression of PD-1, methods of the ribonucleic acid isolation, reverse transcription to the complementary deoxyribonucleic acid and quantitative real-time polymerase chain reaction were used.

The results reveal that there is a noticeable difference in the PD-1 gene expression of the tissue of affected patients and healthy people. On the basis of this results, it can be concluded that there increased expression of PD-1 in the tumour tissue. The PD-1 expression is influenced by many immune and genetic mechanisms. The results could contribute to a better understanding of role of immunoregulatory molecules in tumour and eventual optimization of therapy.

## **Keywords**

pheochromocytoma, adrenal glands, neuroendocrine tumours, paraganglioma, PCR, PD-1

## Obsah

1	Úvod .....	9
2	Současný stav .....	10
2.1	Charakteristika nádorových onemocnění.....	10
2.1.1	Neuroendokrinní systém a s ním asociované nádory .....	10
2.1.2	Feochromocytomy a paragangliomy.....	12
2.1.3	Feochromocytomy a jejich vliv na metabolismus katecholaminů ....	14
2.1.4	Příznaky a projevy nádorů .....	17
2.1.5	Četnost výskytu nádorů.....	18
2.2	Imunitní systém a imunitní odpověď proti nádorům.....	19
2.2.1	Dráha PD-1/PD-L1 .....	22
2.2.2	Molekula PD-1 a její exprese.....	22
2.2.3	Ligandy PD-L1 a PD-L2 a jejich exprese.....	23
2.2.4	Mechanismy regulující expresi PD-L1 a PD-L2 v nádorových buňkách	25
2.2.5	Role interferonů v expresi PD-L1 a PD-L2 .....	27
2.2.6	Molekulární mechanismus PD-1/PD-L1 signalizace.....	29
2.3	Diagnostické postupy .....	30
2.3.1	Biochemická vyšetření.....	30
2.3.2	Zobrazovací metody .....	32
2.3.3	Genetická vyšetření.....	33
2.3.4	Potenciální biomarkery blokády PD-1/PD-L.....	33
2.4	Dostupné terapeutické postupy .....	33
2.4.1	Chirurgická léčba .....	33

2.4.2	Hypertenzní krize a její léčba .....	34
2.4.3	PD-1/PD-L1 a protinádorová terapie .....	34
2.5	Sledování pacientů po operaci.....	35
3	Cíl práce.....	37
4	Metodika .....	38
4.1	Izolace RNA.....	38
4.1.1	Konkrétní kroky izolace RNA .....	38
4.1.2	Elektroforéza a koncentrace NK .....	40
4.1.3	Měření koncentrace nukleových kyselin nanodropem .....	40
4.2	Reverzní transkripce na cDNA.....	41
4.3	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	42
5	Výsledky.....	45
6	Diskuze .....	49
7	Závěr .....	57
8	Seznam použitých zkratek.....	58
9	Seznam použité literatury.....	62
10	Seznam použitých obrázků .....	69
11	Seznamu použitých tabulek .....	70



# 1 ÚVOD

Paragangliomy a feochromocytoomy jsou nádory nadledvinek vyskytující se velmi vzácně a k jejich diagnostice často dochází nepřímo. Ve většině případů jsou nádory benigní a pacienta neohrožují na životě. Mají však své negativní vlivy ať už způsobené ovlivňováním metabolismu katecholaminů či mechanickým působením nádoru na okolní tkáň.

Molekuly programované buněčné smrti 1 (dále jen PD-1, programmed death domain 1) spolu s jejich ligandem programované buněčné smrti 1 (dále jen PD-L1, programmed death domain ligand 1) představují inhibiční dráhu PD-1/PD-L1, která za normálních okolností chrání organismus před neadekvátní imunitní reakcí, například reakcí autoimunitní. Negativním efektem dráhy PD-1/PD-L1 může být navození nádorové tolerance, což má za důsledek nerozpoznaní změněných buněk imunitním systémem a nádorový zvrát není zastaven. Míra genové exprese PD-1 na nádorových buňkách paragangliomu a feochromocytomu pravděpodobně souvisí s možnou malignitou nádorů.

Stanovení genové exprese PD-1 v nádorové tkáni nadledvinek u nemocných jedinců a porovnání s expresí PD-1 v tkáni zdravých lidí může pomoci k podrobnějšímu pochopení role molekul PD-1 a jejich signalizace v procesu tumorigeneze. To by mohlo přispět k snadnější a časnější diagnóze, posouzení závažnosti (malignity) nádoru a optimalizaci postupů terapie.

Bakalářská práce shrnuje obecné poznatky o neuroendokrinních nádorech se zaměřením na feochromocytoomy a paragangliomy. Popisuje jejich vliv na metabolismus katecholaminů a imunitní systém. Rovněž jsou diskutovány možné diagnostické a terapeutické postupy při nádorovém onemocnění nadledvinek.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Charakteristika nádorových onemocnění

Nádor je nově vytvořená nežádoucí masa tkáně přesahující anatomický a funkční rozsah dané oblasti. Nádorovou tkáň tvoří buňky, jejichž růst se vymkl regulaci. Výsledkem může být rakovinné bujení, které přetrvává i po vymizení příčin, které ho způsobily. Onkologická onemocnění mají rozmanité projevy a jejich patogenetické cesty vzniku nejsou dosud objasněné [1].

Nádory mohou na organismus působit různě, podle jejich vlastností je rozdělujeme na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní nádor roste expanzivně a jeho nádorovou tkáň tvoří pravidelné buňky s ostře ohraničeným okrajem, téměř nikdy se nešíří do dalších tkání. Odstranění tohoto typu nádoru je jednodušší, k recidivitě po operaci ve většině případů nedochází a u pacientů nevzniká kachexie. Maligní nádor roste rychleji než benigní nádor, zároveň se rozvíjí agresivněji a nemá ostře vyhraněné hranice. Velmi často dochází k jeho šíření do okolí, v důsledku toho se obtížněji odstraňují všechny části, tím pádem častěji dochází k recidivitě po operaci. Pacienti často trpí kachexií [2].

#### 2.1.1 Neuroendokrinní systém a s ním asociované nádory

Součástí systému neuroendokrinního jsou buňky neurální a endokrinní. Fenotyp mají tyto buňky společný, charakterizuje ho exprese neurotransmiterů, neuropeptidů, neuromodulátorů a hormonů, které jsou buněčně specifické. Řada antigenů buněk neuroendokrinního systému se shoduje s antigenem buněk nervových. V popsaných buňkách se nacházejí granula sekrečně hrubá a buňky nemají axony, tudíž se nepodílí na synapsích. Nádory tohoto typu jsou velmi vzácné, charakteristické nízkou schopností proliferace, tzn. velmi pomalým růstem. Jejich sklon k malignitě se liší podle lokalizace a podle tkáně, ze které vznikají, ale obecně se vyznačují nízkou maligní tendencí. Často produkují biologicky aktivní peptidy.

Mezi další specifické vlastnosti patří vychytávání a dekarboxylování prekurzorů aminů. Následkem této biochemické aktivity jsou tvořeny aminy a malé peptidy, což je proces, který je podstatný pro tvorbu monoaminových neurotransmiterů, například dopaminu, serotoninu a histaminu. V některých případech nádorů byl zaznamenán familiární výskyt. To znamená, že nádor se může vyskytovat vícekrát v anamnéze jedné rodiny a existuje zde určitá pravděpodobnost genetické predispozice [3, 4].

Buňky neuroendokrinní tkáně se nacházejí především ve střevech a v centrální nervové soustavě, ovšem také v tkáni příštítných tělísek, placenty a v C-buňkách štítné žlázy [3]. C-buňky se nazývají také parafolikulární a mohou být součástí folikulů štítné žlázy nebo mezi nimi tvořit samostatné ostrůvky. Produkují polypeptidy, především hormon kalcitonin [5]. Buňky neuroendokrinního systému odpovídají na stimulaci uvolňováním peptidů, proto jsou označovány právě jako buňky neuroendokrinní [3].

Dříve byly endokrinní funkce spojovány pouze s anatomicky ohraničenými orgány, avšak později byly v organismu nalezeny jemně rozptýlené buňky vykazující podobnou aktivitu [3].

Endokrinní systém můžeme rozdělit na dvě části, a to na systém neuroendokrinní a non-neuroendokrinní. Do druhého systému řadíme žlázy sekretující hormony steroidního charakteru (kůra nadledvin, pohlavní žlázy) a štítnou žlázu (kromě C-buněk) [3].

Nádory vycházející z neuroendokrinního systému jsou odvozené z diferenciovaných neuroendokrinních buněk nebo pluripotentních kmenových buněk. Nádory mívají charakteristický histologický obraz a často jsou přítomny cytoplazmatické proteiny. Můžeme je dělit dle jejich schopnosti tvořit biologicky aktivní produkty, a to na nádory funkčně aktivní a funkčně neaktivní. Biologicky

aktivní neuroendokrinní nádory mohou zachovávat nebo zesilovat sekreční aktivitu tkáně, ze které se druhotně vytvořily. Biologicky neaktivní neuroendokrinní nádory neprodukují aktivní hormony nebo jejich koncentrace není dostatečně vysoká, aby mohla být klinicky zjištěna [3].

### **2.1.2 Feochromocytomy a paragangliomy**

Nádory feochromocytomy u 80 % pacientů vycházejí z chromafinních buněk dřeně nadledvin. Ve zbylých případech vznikají z chromafinních tkání nacházejících se v jiných orgánech než ve dřeni nadledvin, nejčastěji v oblastech hrudníku či krku. Nádory se podílí na syntéze, ukládání a metabolismu katecholaminů, avšak ne vždy takto vzniklé hormony rovněž sekretují. Nádory paragangliomy se vyvíjejí buď z chromafinní tkáně nervového systému sympatického nebo parasympatického. V případě nádorů vytvářejících se z chromafinních buněk sympatického nervového systému se častěji jedná o nádory břicha, pánve, močového měchýře a méně častěji hrudníku a krku. Sympatické paragangliomy (též označovány jako extraadrenální feochromocytomy) jsou většinou hormonálně aktivní. Parasympatické paragangliomy se ve většině případů vyskytují v oblasti hlavy a krku. Tento typ nádoru je v 95 % případů sekrečně neaktivní (sekrečně němý) [3, 6].

Feochromocytomy patří mezi biologicky aktivní nádory a produkují hormony skupiny katecholaminů. Typická je nadprodukce adrenalinu spolu s noradrenalinem, kterou způsobuje vliv přítomnosti fenyletanolamin-N-metyltransferáz/metyltransferázy, enzymu v dřeni nadledvin [3, 6].

Funkční paragangliomy produkují hlavně noradrenalin často i spolu s dopaminem [6].

V 90 % případů vzniká feochromocytom vzácně a ojediněle, nádor s nahodilou příčinou vzniku roste unicentricky a unilaterálně. Ve zbylých 10 % jde o nádor familiárně zděděný, který roste multicentricky [3].

Ve feochromocytomu byl objeven peptid adrenomedulin (dále jen ADM), který se nachází v dřeni nadledvin, ledvinách, srdci, plicích apod. Peptid ADM ovlivňuje vodní a elektrolytickou homeostázu, ledvinové funkce a také vyvolává hypotenzi. Má vazodilatační účinek na arterie příčně pruhovaného svalstva a působí jako lokální parakrinní faktor. Dále podporuje angiogenezi a růst nádorových buněk. Aktivuje mitózu u buněk hladkého svalstva cév a buněk nádorových, na druhou stranu u některých buněk působí antimitoticky. ADM autokrinně-parakrinním mechanismem chrání maligní buňky před apoptózou způsobenou hypoxií [3].

Nádory bývají ve většině případů benigní. K malignitě dochází pouze v 10 % až 20 % případů, jediným kritériem malignity je nález metastáz mimo chromotofinní tkáň, většinou v lymfatických uzlinách nebo v kostní tkáni [7].

Vyšší riziko malignity je u nádorů vyskytujících se extraadrenálně a u nádorů, které dorostou do velikosti větší než 5 cm. Metastáze se kromě lymfatických uzlin a kostní tkáně mohou nacházet také v cévním systému, plicích a játrech [8].

Pacienti s diagnózou metastazujícího feochromocytomu nebo paragangliomu většinou přežívají i více než dvacet let, avšak někdy může být průběh rychlý. Dobu přežití zásadně ovlivňuje lokalizace nádoru. Zmíněných dvacet let může přežít pacient s metastázemi v kostech. V případě metastáz v plicích či játrech je předpoklad přežití kratší než dva roky. Průměrný interval přežití se u 34 % až 60 % případů pohybuje kolem pěti let [8, 9].

V současné době je popsáno přibližně deset genů, které jsou asociovány se vznikem nádorů feochromocytomu a paragangliomu. Patří mezi ně gen kódující enzymatický komplex sukcinátdehydrogenázu (dále jen SDH), který má čtyři podjednotky SDHA, SDHB, SDHC a SDHD. Dalšími geny spojovanými se vznikem nádorů nadledvinek jsou neurofibromin 1 (dále jen NF1), protoonkogen kódující receptor tyrozin kinázu (dále jen RET), gen pro transmembránový protein 127, gen

kódující sukcinát dehydrogenázu faktor 2 (dále jen SDHAF2), gen kódující myc-associated factor X (MAX), transkripční faktor a gen asociovaný se vznikem von Hippel-Landau syndromu (dále jen VHL) [9].

Zodpovědné geny se dědí autozomálně dominantním typem dědičnosti. Nádory se také mohou vyskytovat ve spojení s genetickými syndromy. Mezi tyto syndromy patří: syndrom familiární paragangliomatózy (geny SDH, SDHAF2), syndrom von Hippel-Lindau (gen VHL), syndrom mnohočetné endokrinní neoplazie typu 2 (gen RET) a neurofibromatózy typu 1 (gen NF1). Vznik nádoru může být první a jedinou manifestací zmíněných syndromů. V přítomnosti některých genů je pravděpodobnost malignity nádoru vysoká, například u genů SDHB, RET a NF1 [9].

Odhalení genetické predispozice pro výskyt feochromocytomu či paragangliomu může zjednodušit a zrychlit diagnostiku. Zároveň se podle toho může předpovídat následný vývoj onemocnění [3].

### **2.1.3 Feochromocytomy a jejich vliv na metabolismus katecholaminů**

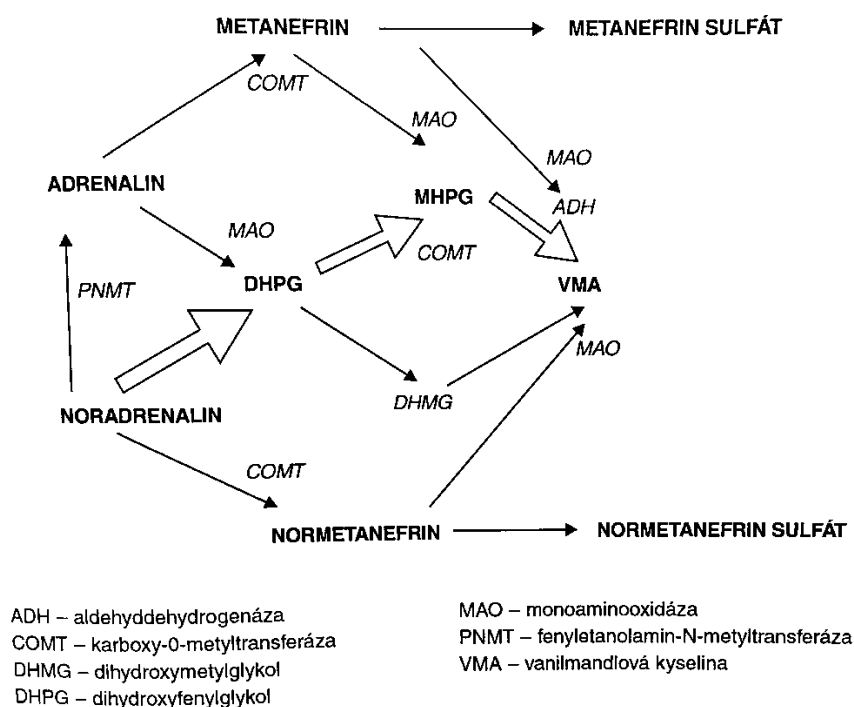
Dřeň nadledvin je tvořena postgangliovými sympatickými neurony. Katecholaminy se nacházejí v sekrečních granulích chromotofinních buněk nebo ve váčcích postgangliových neuronů. Součástí sekrečních granulí jsou chromograniny, proteiny usnadňující uvolnění obsahu granulí, které umí i chránit jejich obsah před enzymatickou degradací [8].

Neuroendokrinní nádory feochromocytom a paragangliom jsou charakteristické nadprodukcí biologicky aktivních produktů. Z aminokyseliny L-tyrozinu vychází syntéza hormonů dřeně nadledvin. L-tyrozin je nejdříve oxidován na dihydroxyfenylalanin, jeho dekarboxylací vzniká dopamin, dále se hydroxylací v postranním řetězci vytvoří noradrenalin a metylací aktivním metioninem je získán finální hormon, adrenalin [3].

Feochromocytoomy mají zvýšenou expresi tyrozin hydroxylázy, dopamin- $\beta$ -hydroxylázy a dekarboxylázy aromatických aminokyselin, což způsobuje nadprodukcii katecholaminů. U některých feochromocytomů syntéza noradrenalinu převažuje nad syntézou adrenalinu, tuto skutečnost způsobuje snížená exprese enzymu fenylethanolamin-N-metyl-transferázy [3].

Adrenalin ovlivňuje metabolický obrat a činnost srdce, zejména zvyšuje tepovou frekvenci a krevní průtok. Noradrenalin způsobuje periferní rezistenci a vazokonstrikci, která má za následek hypertenzi [8].

Běžný metabolismus katecholaminů začíná aktivitou enzymu monoaminoxidázy (dále jen MAO) nebo enzymu katechol-O-metyltransferázy (dále jen COMT). MAO odbourává aminoskupinu v molekule katecholaminů, přeměňuje noradrenalin a adrenalin na 3,4-dihydroxyfenylglykol (dále jen DHPG), pak následuje jeho přeměna za účasti enzymu COMT na 3-metoxy-4-hydroxyfenylglykol (dále jen MHPG), který je pomocí alkoholdehydrogenázy metabolizován na vanilmandlovou kyselinu. Aktivitu MAO může zastoupit enzym COMT způsobující metylaci molekul katecholaminů, která způsobuje přeměnu adrenalinu na metanefrin a noradrenalinu na normetanefrin. Všechny katecholaminy a jejich metabolity kromě vanilmandlové kyseliny se konjugují se sulfáty, čímž vzniká například normetanefrin sulfát či metanefrin sulfát. Koncentrace těchto sulfátů je oproti jejich volným formám v moči i plazmě 25x vyšší [3].



Obrázek 1 Metabolismus katecholaminů zjednodušeně [3]

V přítomnosti nádoru paragangliomu či feochromocytomu se metabolismus katecholaminů vymyká obvyklému průběhu. Probíhá odlišně v nervových buňkách, chromatofinních buňkách a v buňkách feochromocytomu [3].

Sympatické nervy i feochromocytomy produkují noradrenalin, avšak v sympatických nervech se noradrenalin metabolizuje enzymem MAO na DHPG a právě tento metabolit se uvolňuje do krve. To znamená, že noradrenalin vytvořený v sympatických nervech se v krvi téměř nevyskytuje. Biologicky aktivní feochromocytomy produkují hlavně noradrenalin, jehož uvolněním dojde jen k mírnému zvýšení DHPG v krvi. Kdyby bylo zvýšené uvolňování ze sympatického nervstva, byla by zároveň zvýšená i hladina DHPG. Současná detekce vysoké koncentrace noradrenalinu a normální hladiny DHPG v krvi poukazuje na přítomnost nádoru [3].

V nadledvinách je fyziologicky vytvářeno 90 % metanefrinu a 40 % normetanefrinu z adrenalinu a noradrenalinu před uvolněním katecholaminů do krevního oběhu. Enzym COMT, který metylací katecholaminů zprostředkovává



vznik metanefrinu a normetanefrinu, je ve značném množství obsažen v nadledvinách a feochromocytoech. V nádorových buňkách feochromocytomu vzniká 94 % metanefrinu a normetanefrinu působením COMT. Vznik metanefrinu a normetanefrinu v buňkách feochromocytomu není závislý na uvolňování adrenalinu a noradrenalinu. Hladina metanefrinu a normetanefrinu v plazmě neodpovídá adrenalinu uvolněnému nadledvinami ve stresových situacích, zvýšenému uvolňování sympatickými nervy ani paroxyzmálnímu vylučování katecholaminů v důsledku působení feochromocytomu [3].

Stanovením volných plasmatických metanefrinů je možné zjistit nejen diagnózu feochromocytomu, ale i lokalizaci a velikost tumoru [8].

Konečný metabolit noradrenalinu a adrenalinu představuje kyselina vanilmandlová, jejíž hladina je vytvářena nervovými buňkami a případně i feochromocytomem. Z tohoto důvodu není považována za velmi senzitivní znak, přesto se její vyšetření provádí často, protože v moči a plazmě bývá v postačující koncentraci [3].

#### **2.1.4 Příznaky a projevy nádorů**

Nádory paragangliom a feochromocytom se, jak již bylo řečeno, vyskytují velmi zřídka. Vzhledem k jejich biologické aktivitě se nachází u 0,1 % pacientů, kteří mají trvale vysokou diastolickou hypertenzi. Přibližně polovina osob s feochromocytomem má dlouhodobě vyšší krevní tlak. U druhé poloviny se projevuje záchvatovitá hypertenze, tedy náhle se opakující zvýšení krevního tlaku. Uvolňování katecholaminů při paroxyzmální hypertenzi může být způsobeno několika vlivy. Například vlivem mechanickým, kdy na nádor působí tlak způsobený pohybem okolního prostředí. Uvolnění katecholaminů může proběhnout v klidu nebo být iniciováno různými léky, například histaminem, tricyklickými antidepresivy, guanetidinem, ethylalkoholem a dalšími léky [3].

Katecholaminy, které nejčastěji způsobují klinické symptomy, jsou adrenalin, noradrenalin a dopamin. Nádory mohou produkovat i další hormony, například gastrin či adrenomedulin [3].

Jedním z klinických příznaků u pacientů s feochromocytomem a funkčním paragangliomem je bolest hlavy, která se objevuje buď permanentně nebo epizodicky s různými intervaly trvání. U dvou třetin pacientů se projevuje pocením, které může být výrazné. Katecholaminy navozují lipolýzu a glykogenolýzu, což způsobuje výrazný váhový úbytek. Chuť k jídlu je přitom zachována. Tento jev je nazýván hypermetabolickým fenoménem a může způsobovat zvýšenou teplotu. U jedné třetiny osob je pozorována tachykardie. Dalšími častými příznaky jsou záchvatovitá palpitace, bolest na hrudi, bolest břicha, nervozita, anxieta, nauzea, únava, dyspnoe, závratě, intolerance horka, parestezie, poruchy zraku, zácpa, průjem, bledost a psychické problémy zahrnující paniku a úzkosti. Nejtypičtější trojicí projevů u pacientů s vysokým tlakem, která jasně ukazuje na feochromocytom, je palpitace, bolesti hlavy a pocení [3, 6, 9].

První příznaky se mohou projevit jako život ohrožující komplikace, například arytmie či infarkt myokardu. Není však výjimkou, že tento typ onkologického onemocnění probíhá asymptomaticky [9].

V těhotenství je neobjevený nádor zvláště nebezpečný, protože porod, anestezie nebo krvácení do tumoru mohou způsobit arytmiu či hypertenzní krizi, která může ohrozit život ženy [3].

### **2.1.5 Četnost výskytu nádorů**

Feochromocytomy a paragangliomy patří mezi poměrně vzácné onkologické onemocnění. Četnost výskytu feochromocytomu se odhaduje na 0,5–1 diagnostikovaný případ na 100 000 obyvatel za rok. U 0,5 % pacientů s vysokým tlakem a 4 % pacientů s náhodně zjištěným adenomem (tj. incidentalomem) jsou

nalézány feochromocytohy. Přibližně jedna třetina těchto nádorů je objevena a diagnostikována bez předchozích podezření [9, 10].

## **2.2 Imunitní systém a imunitní odpověď proti nádorům**

Imunitní systém udržuje celistvost a homeostázu organismu. Má schopnost rozpoznat a chránit před vnějšími škodlivými látkami, nebezpečnými mikroorganismy a jejich toxickými produkty. Autotolerance je vlastnost, která ochraňuje vlastní zdravou tkáň před působením buněk imunitního systému. Imunitní dohled zajišťuje rozeznání a odstraňování vnitřních škodlivin, tzn. starých a poškozených buněk [11].

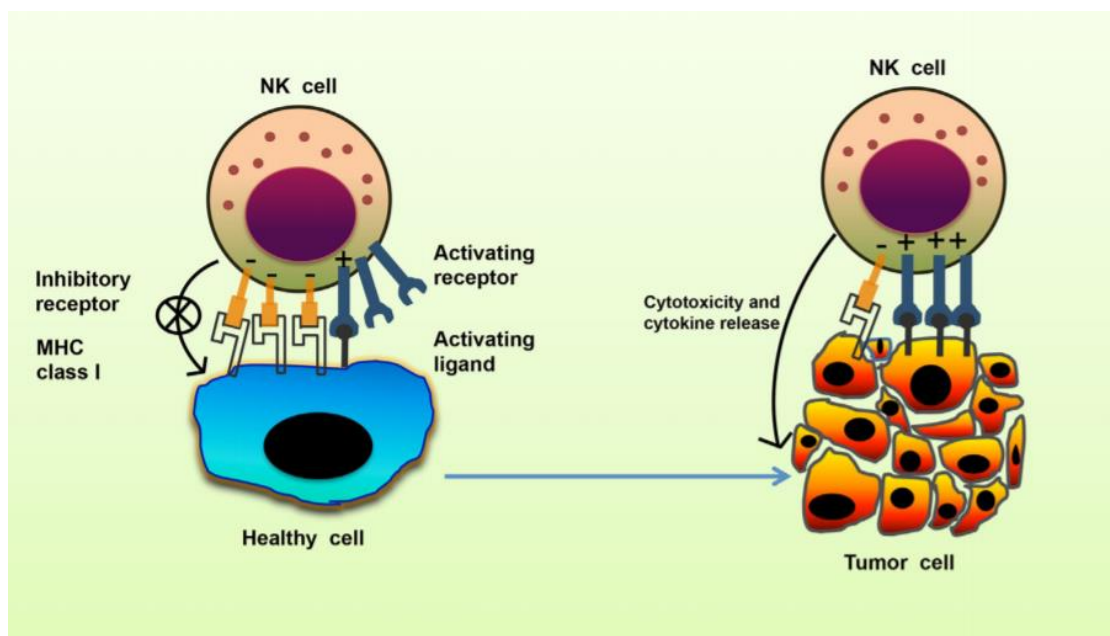
Schopnost organismu rozpoznat a odstranit nádorové buňky je ve většině případů vysoká. Imunitní systém zabraňuje rozvoji a růstu mutovaných buněk, hlavně v prvotních fázích nádorové přeměny. Avšak postupným rozvojem nádoru jsou mechanismy imunitních složek vyčerpány, navíc nádorové buňky samy efektivně omezují jejich působení. Nevýhodou představuje značná podobnost nádorových buněk s buňkami nenádorovými, tudíž se k nim organismus chová jako k buňkám vlastním. Je-li odlišnost jasně patrná, jsou do imunitní reakce zapojeny všechny mechanismy jak specifické (adaptivní) tak přirozené imunity (neadaptivní) [12].

Nádorové buňky využívají mnoho strategií, kterými se snaží vyhnout rozpoznání imunitním systémem a následné eliminaci. Zejména se snaží neexprimovat antigeny specifické pro nádory, nádorové buňky se tím stávají hůře odlišitelné od ostatních buněk vlastního těla. Rovněž mutace v určitých genech značně snižují rozpoznatelnost specifického antigenu. V některých případech dochází k úplnému potlačení exprese hlavního histokompatibilního komplexu I (dále jen MHC I). Mezi další obranné strategie patří produkce glykokalyxových molekul nádorovými buňkami a následné překrývání nádorových antigenů [12].

Správná funkce imunitního systému je podmíněna vyváženou souhrou mezi kostimulačními a inhibičními mechanismy. Nevyváženost mezi signály těchto dvou mechanismů může vyvolat počátek nádorové tolerance. Například důsledkem vzrůstající aktivity inhibiční dráhy PD-1/PD-L1 může dojít k omezení funkce T-lymfocytů a vzniku takzvaných vyčerpaných T-lymfocytů, které již nezvládají likvidaci nádorových buněk [12].

Nádorové buňky využívají inhibiční mechanismy imunitního systému ve svůj prospěch, konkrétně pro únik před imunitní reakcí organismu, čímž podporují vznik a vývoj nádoru. Obecně je schopnost vyhnout se imunitnímu dozoru považována za jednu z typických vlastností nádorových buněk, nádory proto používají řadu aktivních a pasivních mechanismů [12, 13].

Pasivními mechanismy míníme například absenci mutovaného antigenu a ztrátu exprese MHC molekul I. třídy, což má za následek nerozpoznatelnost pro specifické cytotoxické T-lymfocyty (CD8+, cluster of differentiation – diferenciační antigen, dále jen CD) [13]. Absence či pokles exprese MHC glykoproteinů I. třídy na povrchu nezdravé buňky vede ke snížení inhibičního signálu ve speciálních lymfocytech tzv. přirozených zabíječích (dále jen NK), tudíž převažují aktivační signály a dojde k destrukci nádorové buňky [14].



Obrázek 2 Mechanismus destrukce nádorové buňky NK buňkou [14]

Na aktivní inhibici se podílejí imunosupresivní cytokiny typu transformujícího růstového faktoru beta (dále jen TGF- $\beta$ ), které jsou uvolňované nádorovými buňkami a inhibují proliferaci a efektorové funkce lymfocytů a makrofágů. Dále mezi aktivní mechanismy patří schopnost nádoru podporovat vznik regulačních T-lymfocytů; myeloid-derived suppressor cells (myeloidní supresorové buňky), makrofágů typu M2 tvořících supresivní mediátory typu interleukin 10 (dále jen IL) a prostaglandinu E [13].

Regulace aktivity T-lymfocytů probíhá na dvou úrovních. Primární signál reprezentuje specifické interakce mezi receptorem T-lymfocytu (dále jen TCR) a antigenem prezentovaným na MHC na povrchu buněk prezentujících antigen (dále jen APC), představuje tedy rozpoznávání antigenu. Sekundární signál je zprostředkovaný kostimulací receptoru CD28 na povrchu T-lymfocytu a ligandů periferního membránového proteinu označovaného jako B7 (dále jen B7), CD80 a CD86 na APC [15].

Nádorové buňky úzce interagují se stromálními a imunitními buňkami, dále i s extracelulárním prostředím. Vzniká tak nádorové mikroprostředí, které působí imunosupresivně a chrání nádor před rozpoznáním imunitním systémem. Může

docházet k primární či sekundární resistenci vůči imunitním mechanismům. Na procesu vytváření resistance se kromě nádorových buněk podílí zmíněné aktivní a pasivní mechanismy [16].

Inhibiční kontrolní body (takzvané check points) imunitní reakce se významně podílejí na inhibici imunitní reakce proti nádoru. Inhibiční signály mohou limitovat a potlačit aktivaci efektorových T-lymfocytů. Patří sem protein asociovaný s cytotoxickými T-lymfocytárními antigeny (dále jen CTLA-4), imunoglobulinem mucin 3 T-lymfocytů (TIM3), molekulami z imunoglobulinové rodiny programované buněčné smrti a jejich ligandy PD-L1 a ligand programované buněčné smrti 2 (dále jen PD-L2). Ligandy PD-L1 a PD-L2 patří do rodiny B7/CD28 a reprezentují jeden z nejvýznamnějších kontrolních imunitních bodů. CTLA-4 je typ transmembránového glykoproteinu nejčastěji exprimovaného na aktivovaných T-lymfocytech, intracelulární signální regulací přes TCR a CD28 v nádorových buňkách inhibuje T-lymfocyty [13, 17].

### **2.2.1 Dráha PD-1/PD-L1**

Dráha PD-1/PD-L1 patří mezi již zmíněné inhibiční kontrolní body, které ovlivňují působení imunitních mechanismů. Inhibiční dráha PD-1/PD-L1 navozuje funkční inaktivitu lymfocytů, což chrání organismus před vznikem autoimunitního onemocnění, ale může se podílet i na vzniku nádorové tolerance. Její zvýšená aktivita může vyvolat funkční postižení efektorových T-lymfocytů, které poté nemohou vyvolat specifickou cytotoxickou odpověď a zahájit destrukci cílových buněk. K této poruše T-lymfocytů dochází u onkologických onemocnění a dlouhotrvajících infekcí [12].

### **2.2.2 Molekula PD-1 a její exprese**

PD-1 (také označována jako CD279) je transmembránový glykoprotein patřící do imunoglobulinové rodiny proteinů CD28/B7. V membráně buněk se vyskytuje

ve formě monomeru, což způsobuje skutečnost, že PD-1 neobsahuje cysteinové zbytky, které by se podílely na zprostředkování homodimerizace. Gen pro PD-1 se nachází na druhém chromozomu v rozsahu pěti exonů [12].

Za normálního fyziologického stavu PD-1 inhibuje aktivitu efektorových T-lymfocytů a podílí se na vývoji a zvyšování funkce regulačních T-lymfocytů (dále jen Tregs) [17].

Tregs potlačují odpověď T-lymfocytů, čímž chrání periferní tkáň před přehnanou imunitní reakcí, která by je mohla poškodit [17]. V membráně a cytoplazmě Tregs jsou přítomny molekuly PD-1. Jejich inhibiční účinky nebyly v cytoplazmě na rozdíl od membrány potvrzeny [12, 15].

Glykoprotein PD-1 můžeme najít na B a T-lymfocytech, dendritických buňkách, aktivovaných NK buňkách, monocytech a lymfocytech infiltrujících tumor. Jednu z nejvýznamnějších rolí má PD-1 jako inhibiční receptor na T-lymfocytech, interaguje se svými ligandy PD-L1 a PD-L2 za vzniku inhibiční dráhy PD-1/PD-L1, která potlačuje imunitní odpověď při onkologických procesech. Imunitní buňky v klidu vykazují velmi nízkou expresi PD-1, na rozdíl od stimulovaných imunitních buněk, u nichž je exprese PD-1 vysoká [12, 15].

### **2.2.3 Ligandy PD-L1 a PD-L2 a jejich exprese**

Glykoprotein PD-1 má dva ligandy PD-L1 (také možno označit jako CD274) a PD-L2 (také možno označit jako CD273). Jejich exprese na povrchu nádorových buněk může být navozena kontaktem s interferonem gama (dále jen IFN- $\gamma$ ) [18].

Ligandy pro PD-1 (PD-L1 a PD-L2) jsou imunoglobulinové povahy a specificky se váží na transmembránový glykoprotein PD-1. PD-L1 a PD-L2 se podle své struktury řadí mezi transmembránové glykoproteiny a jejich exprese se liší, čímž je tvořen

předpoklad, že se oba z ligandů účastní jiných procesů regulace imunitní odpovědi [12].

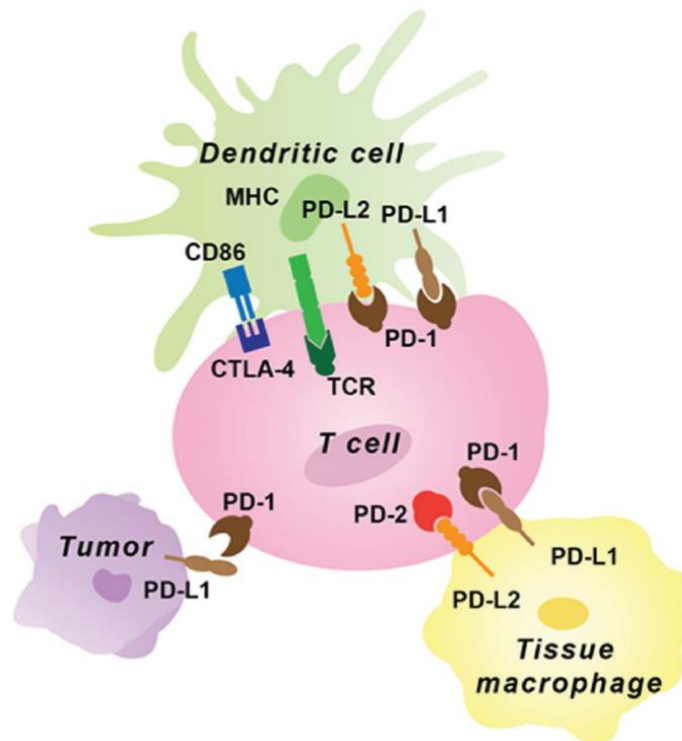
PD-L1 se nachází hlavně na T a B lymfocytech, makrofázích a dendritických buňkách. Dále byla jeho přítomnost zjištěna i ve zdravé tkáni v neimunitních buňkách jater, plic, svalových vláken, buňkách epiteliálních, gliových buňkách a beta buňkách Langerhansových ostrůvků. Podle výzkumu molekuly PD-L1 ve zdravých tkáních nejspíše přispívají k periferní toleranci [12, 15].

V nádorové tkáni většinou nacházíme zvýšenou expresi PD-L1, což přispívá k vytvoření nádorové tolerance, je tak vytvářen předpoklad negativního průběhu onemocnění, protože se zvyšující se expresí PD-L1 roste nebezpečnost nádoru. PD-L1 může také vytvářet interakci s kostimulační molekulou CD80, exprimovanou na T-lymfocytech. Interakce vede ke snížení funkce T-lymfocytů a produkce cytokinů [12].

PD-L2 je exprimován na makrofázích, pomocných T-lymfocytech, APC a pravděpodobně se podílí na polarizaci T-lymfocytů [12].

PD-L1 má dvakrát až šestkrát vyšší afinitu k receptoru PD-1 než druhý ligand PD-L2. Také se liší mechanismus vazby. PD-L1 se může vázat na obě molekuly, na PD-1 i CD80. PD-L2 se na PD-1 váže pouze přímo [15].





Obrázek 3 Expresí inhibičních kontrolních bodů na nádorové a imunitní buňce [19]

#### 2.2.4 Mechanismy regulující expresi PD-L1 a PD-L2 v nádorových buňkách

Expresí PD-L1 je ovlivněna mnoha faktory, avšak především zde hrají roli dvě signální dráhy: mitogenem aktivované kinázy (dále jen MAPK) a fosfatidylinositol-3-kinase-Akt (dále jen PI3K/Akt). Ke vzniku zhoubného bujení dochází hlavně v důsledku změn na úrovni samotných regulačních komponent. U jednotlivých onkologických onemocnění se liší podíl signálních drah na procesu vzniku a vlastního průběhu nádorového růstu [12].

Gen *BRAF* (B-Raf proto-oncogene) kóduje serin/threonin kinázu. Jeho mutace vede k aberantní aktivaci MAPK, která zvyšuje proliferaci rakovinných buněk. Dále mutace působí na aktivitu transkripčních faktorů c-Jun a signal transducer and activator of transcription protein 3 (dále jen STAT). Faktor c-Jun zvyšuje expresí PD-L1 bez vlivu dalšího faktoru, naopak faktor STAT3 ke své aktivitě způsobující vyšší expresí PD-L1 vyžaduje spolupůsobení faktoru c-Jun [12, 20].

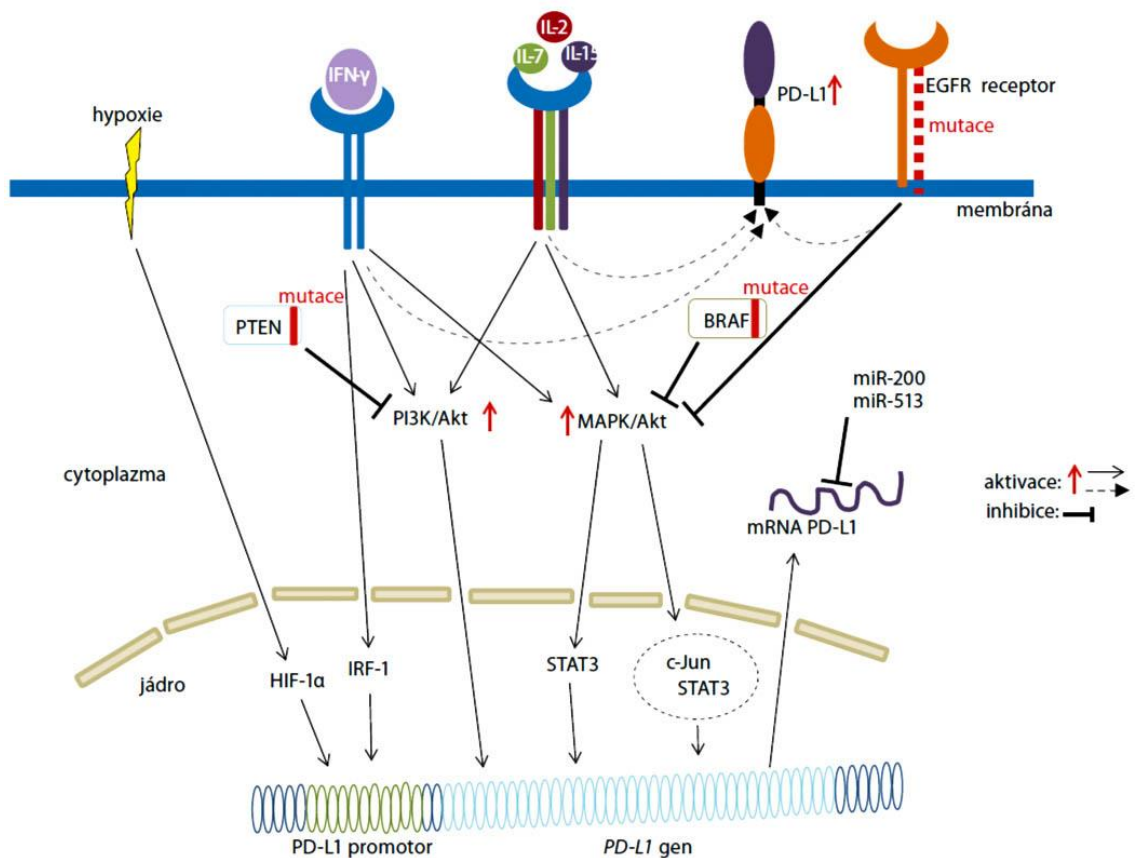
Zvýšení exprese PD-L1 spojené s aktivováním MAPK může podpořit snížení imunitní reakce, čímž je podpořena rezistence nádorových buněk [12].

Pro tkáň postiženou nádorovým bujením je charakteristické hypoxické prostředí, které opět indukuje expresi PD-L1 a zvyšuje expresi transkripčního faktoru HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ), který reguluje transkripci genu kódujícího PD-L1 přímou vazbou na promotor tohoto genu. Dalším regulačním faktorem je krátká molekula ribonukleové kyseliny (dále jen RNA) mikroRNA, která vazbou na oblast messenger RNA (dále jen mRNA) ovlivňuje potlačení translace, případně degradaci mRNA [12].

Molekula mikroRNA-200 zvyšuje expresi PD-L1 a metastazování nádoru. Opačně působí molekula mikroRNA-513, která expresi PD-L1 snižuje [12].

Interferon IFN- $\gamma$  produkovaný cytotoxickými T-lymfocyty indukuje expresi PD-L1, nádorové buňky mohou tento interferon využít k navození vlastního nádorového PD-L1, což způsobuje potlačení imunitního systému při interakci s PD-1 receptorem na T-lymfocytech. IFN- $\gamma$  je ovlivňován transkripčním faktorem interferon regulatory factor 1 (dále jen IRF1) vázajícím se rovnou na promotor PD-L1 [12].

Signalizací pomocí transkripčního faktoru STAT3 zvyšují expresi PD-L1 také interleukiny [12].



Obrázek 4 Mechanismy regulace PD-L1 v nádorových buňkách [12]

## 2.2.5 Role interferonů v expresi PD-L1 a PD-L2

Interferony interagují se specifickými receptory, čímž jsou schopny aktivovat transkripční faktory STAT, které regulují expresi určitých genů imunitního systému. Existují interferony typu I a typu II. Faktory STAT mohou být podle svého typu aktivovány oběma typy interferonů či jen jedním z nich. Aktivace faktorů STAT iniciuje signální dráhu Janus kinase – signal transducer and activator of transcription protein (dále jen JAK-STAT) [21].

Transkripční faktory Janus kináza (dále jen JAK) a STAT tvoří hlavní signální dráhy ovlivňující interferony. Ve výsledku se podílí na aktivaci elementů stimulujících odpověď interferonů a síť aktivující interferony gama. Ukazuje se, že interferony se významně podílejí na regulaci exprese ligandů PD-1. Byly objeveny důkazy, že interferony hrají významnou roli v primární a získané rezistenci

k buňkám imunitního systému a v budoucnu by mohly být použity pro terapii založené na bloádě imunitních kontrolních bodů [18].

T-lymfocyty jsou schopny rozpoznat nádorový antigen a následně jsou uvolněny interferony, které navozují expresi PD-L1 na nádorové buňce, čímž je potlačena protinádorová imunitní reakce. Tento proces můžeme také nazvat jako adaptivní imunitní rezistence. Z důvodu této rezistence dochází k potlačení schopnosti T-lymfocytů rozpoznávat rakovinné prostředí [18].

Mezi interferony typu I řadíme interferony alfa, beta a omega. Zmíněné interferony se vážou na receptory interferonu typu I, který se skládá ze dvou podjednotek. Pomocí faktorů JAK1 a TYK2 (tyrosinkináza 2) probíhá fosforylace faktorů STAT1, STAT2, STAT3 a podle typu buňky i dalších faktorů z rodiny STAT. Fosforylací dochází k aktivaci STAT1, který se spojí s fosforylovanou formou STAT2 za vzniku komplexu ISGF3 (interferon-stimulated gene factor 3) a regulačního faktoru 9. Vzniklý komplex se váže na ISRE (interferon sequence response element) na DNA a tím dochází ke kontrole exprese genů ovlivněných působením interferonů. Interferony typu I mohou také způsobit fosforylaci nebo pozdější aktivaci homo-/hetero-dimerů faktorů STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 a STAT6 [18, 22].

Interferon typu gama patří mezi interferony typu II a váže se na specifický receptor pro interferon gama, čímž dochází k fosforylaci enzymů JAK1 a JAK2, následuje fosforylace i příslušných receptorů. Ve většině buněk dochází k fosforylaci STAT1 a v některých i STAT3. Aktivované dimery se akumulují v jádře a působí zde jako transkripční faktory, které se napojují k systému GAS (gamma interferon activation sites), který je přítomen ve většině genů navozených interferonem gama, například v genu *IRF1*. Aktivitu STAT1 a STAT3 též ovlivňují negativní regulátory signalizace cytokinů fungující nejčastěji pomocí vazby na enzym JAK1, příkladem je

protein rodiny SOCS (suppressor of cytokine signalling), který signalizaci cytokinů potlačuje [18].

### **2.2.6 Molekulární mechanismus PD-1/PD-L1 signalizace**

Interakcí TCR s antigenem navázaným na MHC buněk prezentujících antigeny vzniká imunologická synapse, která je zásadní pro aktivaci T-lymfocytů. Popsaný komplex se označuje jako takzvaná supramolekulární struktura, jejíž stabilitu zajišťují kostimulační molekuly jako CD28, CD80/CD86, CD40, avšak i molekuly adhezivní jako LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) nebo ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) [12].

Při interakci s inhibiční dráhou PD-1/PD-L1 se nejprve váže PD-L1 na PD-1, následně dochází k připojení TCR synapsí a defosforylaci CD3 a ZAP-70 (zeta-chain-associated protein kinase 70) molekul TCR receptoru, který se podílí na TCR signalizaci [12].

Při navázání ligandu na PD-1 dojde současně k fosforylaci tyrozinu, což aktivuje tyrozinovou fosfatázu, která inhibuje signální dráhu PI3K/Akt [12].

Dráha PD-1/PD-L1 podněcuje apoptózu T-lymfocytů. Expresi molekul zabraňujících apoptóze buněk za běžných podmínek podporují kostimulační synapse a v rakovinném prostředí je přítomnost exprese buněk způsobující apoptózu inhibována aktivitou dráhy PD-1/PD-L1 [12].

Blokádou buněčného cyklu T-lymfocytů může docházet k omezení jejich proliferace. Může být způsobena navozením zvýšené aktivity transkripčního faktoru SMAD3 (SMAD family member 3), který blokuje buněčný cyklus. Další způsob navození blokady buněčného cyklu T-lymfocytů je degradace aktivátoru buněčného cyklu CDC25A (M-phase inducer phosphatase 1). Tyto uvedené činitele jsou indukovány dráhou PD-1/PD-L1. Faktor RAS (RAS-associated factor, signální

protein) naopak působí opačně, tedy stimuluje buněčný cyklus. Expze RAS je potlačována vlivem PD-1/PD-L1 signalizace. PD-1/PD-L1 tlumí také signální dráhu PI3K/Akt, což způsobuje omezení degradace transkripčního faktoru FoxO1 (forkhead box protein O1), a to přispívá k expzi PD-1, která přispívá ke vzniku vyčerpaných T-lymfocytů [12].

Dalším způsobem ovlivnění metabolismu T-lymfocytů signalizací PD-1/PD-L1 je prostřednictvím inhibice glykolýzy a přeměny aminokyselin. Dále pak prostřednictvím aktivace procesů, které vedou k oxidaci mastných kyselin [12].

## **2.3 Diagnostické postupy**

Diagnóza paragangliomu a feochromocytomu je založena na laboratorních vyšetřeních a zobrazovacích technikách, především jde o nukleární magnetickou resonanci, počítačovou tomografii, pozitronovou emisní tomografii, nukleární medicínu a s ní spojené scintigrafické techniky [8].

### **2.3.1 Biochemická vyšetření**

Paragangliomy a feochromocytomy často skladují katecholaminy, nemusí je však vždy vylučovat, nejsou proto vhodným markerem pro přiblížení diagnózy. Stanovení jednotlivých metabolitů katecholaminů nazývajících se metanefriny je příhodnější a umožňuje přesnější diagnostiku [6, 9].

Plazmatické metanefriny vykazují více odpovídající výsledky než metanefriny močové. Při stanovení metanefrinů je velmi důležitá zkušenost pracoviště s vybranou metodou. Některé nádory vylučují pouze dopamin nebo metabolit methoxytyramin a u některých nádorů se nemusí zaznamenat žádné zvýšení metanefrinů, tyto nádory označujeme jako sekrečně němé. Také můžeme stanovovat buněčný znak chromogranin, který poukazuje na přítomnost neuroendokrinních nádorů [9].

Z metabolitů katecholaminů vykazuje nejlepší míru korelace s diagnózou volný plazmatický metanefrin a normetanefrin. V případě, že toto vyšetření nelze provést, je možné stanovit frakciované močové metanefriny, to znamená stanovit separovaně močový metanefrin a normetanefrin. Stanovení frakciovaných močových metanefrinů se provádí chromatografickou metodou HPLC (high-performance liquid chromatography) ve sběru moči za 24 hodin [3].

U vyšetření plazmatických metanefrinů a normetanefrinů se klade velký důraz na preanalytickou fázi. Odběr musí probíhat nalačno a pacient by měl 24 hodin vynechat alkohol, kofein, lék acetaminofen a několik hodin před odběrem nesmí kouřit. Hladina noradrenalinu je v poloze vstoje zhruba třikrát vyšší než vleže, proto se vleže také odebírá. Vzhledem k nutnému klidu pacienta se doporučuje danou osobu hospitalizovat. Při vyšetření se zavádí nitrožilní kanyla a pacient leží 20 minut v klidu, až poté je krev odebrána. Pokud vychází výsledky koncentrace metabolitů negativní, nádor není přítomen. Hodnoty vyšší než čtyřnásobek horní hranice normy signalizují přítomnost nádoru. Přídavný klonidinový test se provádí v případě, že jsou výsledné hodnoty mezi horní hranicí normy a jejím čtyřnásobkem [3].

Katecholaminy mají poločas rozpadu jen dvě minuty, a to je z hlediska analýzy značnou nevýhodou. Při diagnostice se v úvahu bere také, že nádor může katecholaminy vylučovat epizodicky a že některé fyziologické aktivity zvyšují jejich produkci, například fyzická a psychická námaha. Dále mohou být hodnoty ovlivněny hypoglykemií, hypovolemií, sepsí, šokovými stavy, vystupňovanými stavy úzkosti a dalšími chorobnými stavy. Zmíněné skutečnosti mohou značně zkreslit výsledky a falešně negativní výsledek by mohl pacienta ohrozit. Naopak falešně pozitivní výsledky biochemických vyšetření je možné vyvrátit v následujících vyšetření, například zobrazovacími metodami [3, 8].

### 2.3.2 Zobrazovací metody

Pokud biochemickými metodami dojde k potvrzení nádoru, přistupujeme k zobrazovacím metodám, zejména k výpočetní tomografii (dále jen CT) a magnetické resonanci (dále jen MR). CT a MR jsou nespecifické, pro potvrzení diagnózy a určení typu nádoru používáme metody nukleární medicíny [9].

Spirální CT se vyznačuje vysokou přesností a rozlišovací schopností do jednoho cm. Když není použití CT vhodné, například u těhotných žen nebo při alergii na kontrastní látku, volí se MR. Dále též sonografie poskytuje odpovídající výsledky, ovšem jsou méně přesné než z CT a MR [3].

Feochromocytoomy stanovujeme scintigrafií s metajodobenzylguanidinem (dále jen MIBG) a paragangliomy scintigrafií s octreotidem. Postupně se také dostávají do popředí metody založené na pozitronové emisní tomografii (dále jen PET) [9].

Pro vyšetření pomocí izotopů se používá MIBG, který je označený jodem 131 či 123. Touto metodou se potvrzuje diagnóza, která byla stanovena pomocí CT nebo MR. Jedná se o vyšetření, které umožňuje vizualizaci celého těla, tudíž v případě maligní formy nádoru je možné metastáze odhalit a lokalizovat [3]. Pokud diagnostika pomocí MIBG vykazuje pozitivní výsledky, může se přistoupit k indikaci izotopu 131I-MIBG. Ten se používá především ke kontrole symptomů, které jsou způsobeny sekrecí hormonů [23].

PET metoda znázorňuje nádorovou tkáň a má vyšší validitu než MIBG. V nádorové tkáni probíhají biochemické a fyziologické procesy jinak než v tkáni zdravé. Na principu těchto odlišností funguje právě pozitronová emisní tomografie. Například v nádorové tkáni probíhá glykolýza ve vyšší míře, čehož využívá fluorodeoxyglukóza s  $^{18}\text{F}$ . Také se používá  $^{11}\text{C}$ -hydroxyfedrin nebo 6- $^{18}\text{F}$  fluordopamin, který je schopný se dostat do buněk vytvářejících katecholaminy a jeho vizualizace je snadná [3].



### **2.3.3 Genetická vyšetření**

U všech pacientů s feochromocytomem by mělo být provedeno genetické vyšetření, konkrétní geny pro vyšetření jsou vybírány podle klinických projevů, rodinné anamnézy a fyzikálního vyšetření. Svou roli zde hrají také věk pacienta, přesná lokalizace nádoru, malignita a produkované katecholaminy či jejich metabolity [6].

### **2.3.4 Potenciální biomarkery blokady PD-1/PD-L**

Uvažuje se o používání PD-1 a PD-L1 jako markerů pro zjištění účinnosti blokady PD-1/PD-L. Ligand PD-L1 by mohl být dobrým ukazatelem průběhu léčby nádorů [15].

## **2.4 Dostupné terapeutické postupy**

### **2.4.1 Chirurgická léčba**

Chirurgické odstranění nádoru představuje nejvhodnější způsob řešení jeho přítomnosti. Operace vykazují velmi vysokou úspěšnost. Mohou se provést laparoskopicky, je možné tak operovat i nádory větší než devět centimetrů. Při operaci se upřednostňuje zachování části kůry nadledvin, aby nebyla ztracena schopnost produkovat mineralokortikoidy. Zachování této části může být rizikové, zvyšuje se totiž pravděpodobnost recidivy nádoru, hlavně v případě genetické predispozice. [24].

Důležitou součástí operace tvoří předoperační medikamentózní příprava. Vzhledem k vysoké koncentraci katecholaminů v nádorech, může operaci komplikovat hypertenze a případně hypertenzní krize, na které je potřeba se připravit. Během operace se musí udržovat stabilní krevní tlak [24].

Léky se začínají podávat dva až čtyři týdny před plánovanou operací. Pacientům jsou podávány blokátory  $\alpha$ -adrenergních receptorů (fenoxybenzamin či prazosin).

V případě fenoxibenzaminu se začíná s dávkou 2 x 10 mg, která se postupně zvyšuje, dokud se nedosáhne dávky 1 mg/kg tělesné hmotnosti, která je považována za dostatečnou. Lék fenoxibenzamin se kombinuje s betablokátory. Pokud alfablokátory a betablokátory nejsou dostatečně účinné, aplikuje se těsně před operací metyrosin, kompetitivní inhibitor tyrozinu. U medikamentózní přípravy pacienta na operaci se doporučuje, aby byl v klidu na lůžku kvůli hrozící hypotenzii způsobené léky [3].

#### **2.4.2 Hypertenzní krize a její léčba**

Projevy hypertenzní krize nejčastěji mohou být v podobě těžkých bolestí hlavy, srdečního selhání s akutním plicním edémem a infarktu myokardu. Kromě vysoké koncentrace katecholaminů v krvi ji můžou vyvolat tricyklická antidepresiva, naloxon a metoclopramid. Pacient během hypertenzní krize by měl být hospitalizován na jednotce intenzivní péče [3, 24].

Při hypertenzní krizi se podává intravenózně bolus fentolaminu, který má krátký poločas rozpadu, tudíž je potřeba podávat jeho stejnou dávku každé dvě minuty do dosažení stability krevního tlaku. Kromě fentolaminu se za stálého monitorování krevního tlaku může aplikovat nitroprusid sodný ve formě infuzního roztoku [3].

#### **2.4.3 PD-1/PD-L1 a protinádorová terapie**

Terapie založená na monoklonálních protilátkách přináší nové možnosti v rámci imunoterapie. Léčba pomocí cílených protilátek zvyšuje aktivní zapojení imunity. Blokádou dráhy PD-1/PD-L1 je posílen efektorový soubor imunitního systému v nádoru, který se snaží snížit toleranci k nádorové tkáni [12].

V současnosti jsou vyvinuty monoklonální protilátky, které blokují receptor PD-1 a případně i ligand PD-L1 [12].

Pembrolizumab je prvním lékem povoleným pro klinické použití, představuje velmi selektivní humanizovanou protilátku zaměřenou proti receptoru PD-1, využívá se k terapii u pacientů s progresivním melanomem. Účinnost léku však nebyla velmi úspěšná, lék byl účinný jen na určité množství pacientů a vyvolával nežádoucí účinky, například podporoval rozvoj autoimunitních onemocnění [12].

Nivolumab je další monoklonální protilátka proti PD-1 používána jako lék, tentokrát pro léčbu pokročilého metastazujícího melanomu, renálního karcinomu a nemalobuněčného karcinomu plic (dále jen NSCLC), účinnost byla vysoká s minimálními nežádoucími účinky [12].

Atezolizumab, durvalumab, a avelumab jsou protilátky působící proti ligandu PD-L1. U zmíněných protilátek byly prováděné klinické studie u pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře, metastazujícím NSCLC a nádorů hlavy a krku [12].

Další možností je kombinace protilátek, tudíž blokace dvou kontrolních bodů PD-1 a CTLA-4 současně. Každý z těchto dvou bodů ovlivňuje lymfocyty v jiné fázi. CTLA-4 ovlivňuje hlavně v raných fázích aktivace lymfocytů T. Naopak inhibice PD-1 působí převážně na T-lymfocyty v efektorové fázi. Kombinovaná terapie s využitím PD-1 a CTLA-4 se vyznačuje komplementaritou látek. Byl u ní prokázán vyšší účinek, než mají monoklonální protilátky, avšak zároveň byla sledována i větší toxicita léčby [12].

## **2.5 Sledování pacientů po operaci**

Zvláštní pozornost po operaci by měla být věnována pacientům s mutací v genech *SDHB*, *VHL*, *RET*, *NF1* a pacientům s funkčním paragangliomem a objemným feochromocytomem, u kterých hrozí vyšší riziko recidivy a vzniku metastáz. U těchto případů ideálně probíhá pravidelné sledování v intervalu do šesti měsíců s biochemickými nebo i morfologickými (funkčními) vyšetřeními. V případě

sekrečně němého nádoru dochází jen k funkčním vyšetřením. U všech pacientů po operaci feochromocytomu se také doporučuje sledování v intervalu šesti měsíců s možností prodloužení intervalu na dobu jednoho roku. Příhodnější průběh stavu po operaci se očekává u starších pacientů s malými feochromocytomy produkujícími adrenalin. Sledování všech nemocných po operaci se pokud možno provádí ve specializovaných zařízeních, které mají zkušenosti s těmito nádory [9].

### 3 CÍL PRÁCE

*Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo shrnutí poznatků o paragangliomech a feochromocytomech, jejich projevech, vlivu na metabolismus katecholaminů, rizicích a současných postupech diagnostiky či terapie.*

*Cílem praktické části bylo porovnání genové exprese PD-1 u skupiny zdravých jedinců se skupinou pacientů s nádory nadledvinek (paragangliomy a feochromocytomy), následné grafické zpracování výsledků a vyhodnocení.*

*Genová exprese PD-1 byla stanovena pomocí metod molekulární biologie. Výsledky by mohly pomoci optimalizovat budoucí diagnostické a terapeutické postupy. Proto bylo cílem práce též diskutovat výsledky exprese PD-1 u jiných případů nádorového onemocnění.*

## 4 METODIKA

Ke změření a porovnání genové exprese PD-1 v tkáni nádorů paragangliomu a feochromocytomu je nutné nejprve izolovat RNA, poté v termocyleru získanou RNA přepsat do komplementární deoxyribonukleové kyseliny (dále jen cDNA) a následně změřit míru genové exprese PD-1.

Praktická část bakalářské práce byla prováděna v Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze (dále jen ÚIM 1. LF UK). Používaným biologickým materiálem byly kousky tkáně nadledvinek z vyoperovaných nádorů, které ÚIM 1. LF UK a VFN v Praze získalo od Fakultní nemocnice v Motole za účelem vědeckého výzkumu. Nádorová tkáň byla odebrána pro experimentální účely u pacientů po předchozím podepsání písemného informovaného souhlasu.

### 4.1 Izolace RNA

Izolace RNA se standardně provádí v laminárním boxu, který umožňuje práci s živočišným materiálem ve sterilním prostředí vytvářeným prouděním vzduchu procházejícím přes filtry. Před zpracováním byla tkáň uložena v mrazáku při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v roztoku RNA later v mikrozkušavkách Eppendorf. Vzorky je nutné nejprve nechat volně rozmraznout při pokojové teplotě a následně oddělit a navážit vhodné množství pro izolaci RNA. Nejvhodnější hmotnost vzorku je 15–20 mg. Izolace RNA se provádí pomocí komerčně vyrobeného kitu.

#### 4.1.1 Konkrétní kroky izolace RNA

Tkáň je nutné nejprve odvážit, je možné použít maximálně 30 mg tkáně, ale vhodnější je použít menší množství, tzn. výše zmíněných 15–20 mg je ideální hmotnost. Celá izolace RNA se provádí pomocí kitu od firmy Qiagen. K odváženému množství vzorku se přidá 600  $\mu\text{l}$  lyzačního bufferu RLT (buffer RLT-

lysis buffer 220 ml) a 1/100 merkaptanu do 1,5 mikroskopické Eppendorf. Vzorek s roztokem se homogenizuje homogenizační vrtačkou. Vzniklá homogenní směs se stočí v centrifuze při 10 000 g při teplotě 23 °C po dobu 5 minut, čímž se směs rozdělí na peletu a supernatant. Peleta obsahuje zbytky tkáně a supernatant nukleové kyseliny. Peleta již není potřeba a supernatant se odpipetuje do jiné mikroskopické Eppendorf pro další zpracování.

V dalším kroku se k supernatantu přidá 600 µl 70 % chlazeného ethanolu. Přidává se těsně k hladině supernatantu. RNA s alkoholem precipituje a tím vzniknou dvě rozlišitelné fáze, je nutné promíchat roztok pipetou formou nasávání a vypouštění. Musí se odstranit případné vysrážené zbytky.

Roztok supernatantu s ethanolem je nezbytné přenést do speciálních kolonek s membránou, na které se zachycují nukleové kyseliny, kyselina deoxyribonukleová (dále jen DNA) a RNA. Kolonky jsou rozdělené na horní a spodní část. Jejich maximální objem je 700 µl, objem zmíněného roztoku je 1200 µl, tudíž se přenášení roztoku do kolonek provádí dvakrát. Přenese se 600 µl do kolonky, stočí se v centrifuze na 10 000 g při teplotě 23 °C po dobu 15 sekund. Obsah spodního dílu kolonky se vylije, horní díl se vrátí zpět. Do kolonky se napipetuje zbývajících 600 µl původního roztoku a krok se zopakuje.

DNA a RNA jsou nyní zachyceny na membráně kolonky, mohly se zde zachytit i nežádoucí nečistoty, které je nutné odstranit promytím, proto se přidá 350 µl promývacího roztoku RW1 (buffer RW1 wash buffer 220 ml) a následuje opětovné stočení v centrifuze na 10 000 g při teplotě 23 °C po dobu 15 sekund. Roztok ze spodní části se vylije do kádinky s odpadním roztokem a horní díl s membránou se zachová.

Cílem je izolovat pouze RNA, DNA je nežádoucí a eliminuje se použitím DNAázy, která z membrány kolonky odstraní DNA. Na kolonku se přidá přímo 80 µl roztoku, který je složen z 10 µl DNAázy a 70 µl RDD pufru. Roztok se takto

nechá inkubovat 15 minut v laminárním boxu a dále se kolonka pročistí přidáním 350  $\mu$ l RW1, který se opět zcentrifuguje na 10 000 g při teplotě 23 °C po dobu 15 sekund. Spodní díl se poté odstraní a nahradí se dílem novým.

Poslední kroky izolace slouží především k získání dostatečně čisté RNA na membráně kolonky, použije se 500  $\mu$ l čistícího roztoku RPE (buffer RPE wash buffer 65 ml concentrate), následuje centrifugace na 10 000 g při teplotě 23 °C po dobu 15 sekund. Zcentrifugovaný obsah se odstraní a opět se přidá 500  $\mu$ l roztoku RPE, stočí se na 10 000 g při teplotě 23 °C po dobu dvou minut. Obsah ve spodním dílu se odstraní a následuje opětovná centrifugace, aby se zaručilo, že dojde k odstranění maximálního objemu RPE.

Poslední krok zajišťuje uvolnění RNA z membrány kolonky. Spodní díl se vymění za klasickou mikrozkuhavku Eppendorf a přidá se 30  $\mu$ l RNase-free H<sub>2</sub>O (RNase-Free Water 50 ml) na membránu. Izolace je završena centrifugací na 10 000 g při teplotě 23 °C po dobu jedné minuty.

#### **4.1.2 Elektroforéza a koncentrace NK**

Pro správný průběh zpětné transkripce RNA na cDNA je potřeba dostatečné množství izolované RNA. To je možné zkontrolovat pomocí elektroforézy. V agarosovém gelu by měly být dobře znatelné dva proužky, které představují malou a velkou ribozomální podjednotku. Ribozomální RNA je mezi typy lidské RNA zastoupena z největší části, proto sledujeme právě ribozomální podjednotky.

#### **4.1.3 Měření koncentrace nukleových kyselin nanodropem**

Přesnou koncentraci ribonukleové kyseliny měříme na nanodropu, abychom zjistili, zda koncentrace izolované RNA je vhodná pro další měření. Přístroj funguje na principu spektrofotometru, výsledkem je vlnová délka závislá na absorbanci. Absorbance nukleových kyselin je 260 nm, aminokyselin (proteinů) 280 nm a případné nečistoty organického původu mají většinou vlnovou délku kolem 230 nm.



Při měření nukleových kyselin by absorbance měla být nejvýše 260 nm, v jiném případě by se nejednalo o RNA/DNA. Po zapnutí nanodropu musí nejdříve proběhnout iniciace, poté je nutné změřit blank a až pak je možné měřit jednotlivé vzorky. Program vypočte poměry 260 nm/280 nm absorbancí, které je potřeba zkontrolovat. Pro DNA by poměr měl být 1,8 a pro RNA 2,0. Odchylky od těchto hodnot signalizují znečištění.

## 4.2 Reverzní transkripce na cDNA

Reverzní transkripce se provádí v termocykleru, do kterého se vzorky dávají v 200  $\mu\text{l}$  mikrozkuvkách Eppendorf, je v nich 10  $\mu\text{l}$  naředěného vzorku RNA a 10  $\mu\text{l}$  premixu, jehož konkrétní obsah je uveden níže. Vzorky a komerčně připravený kit se nejprve nechají rozmraznout na ledu a následně se s nimi na ledu i pracuje. Pro provedení reverzní transkripce na cDNA se používá High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit od firmy Applied Biosystems.

Do mikrozkuvky je potřeba napipetovat 0,5  $\mu\text{g}$  získané RNA a to doplnit DNAase-free  $\text{H}_2\text{O}$  na 10  $\mu\text{l}$ , následně přidat 10  $\mu\text{l}$  premixu. Množství RNA v  $\mu\text{l}$  se přepočítá pomocí výsledků z nanodropu. Premix pro jeden vzorek obsahuje:

- 3,2  $\mu\text{l}$  nuclease-free  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- 2  $\mu\text{l}$  10x RT buffer;
- 0,8  $\mu\text{l}$  25x dNTP mix (100 mM);
- 2  $\mu\text{l}$  10xRT random primers;
- 1  $\mu\text{l}$  inhibitor RNAasy;
- 1  $\mu\text{l}$  reverzní transkriptáza.

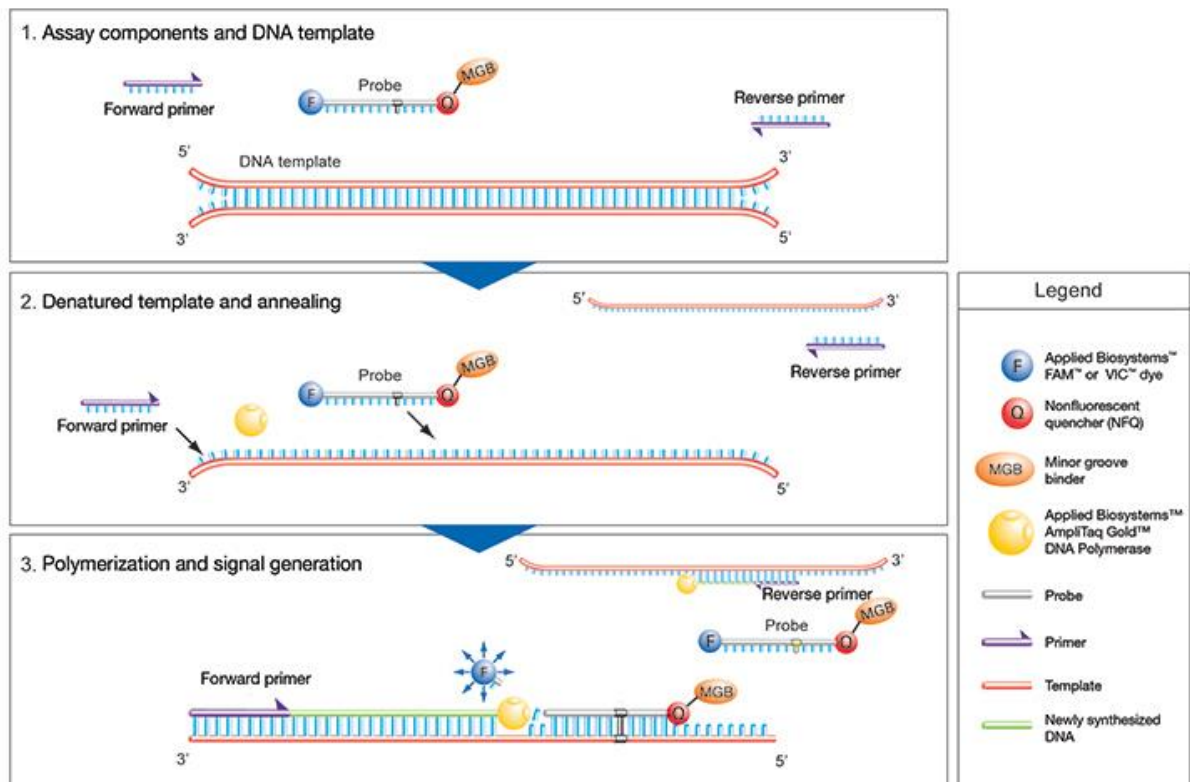
Mikrozkuvky s připraveným obsahem se zvortexují a vloží do termocykleru. Reverzní transkripce z RNA na cDNA trvá přibližně 2,5 hodiny.

Poté se mikrokumavky doplní na 100  $\mu$ l, to znamená připipetovat 80  $\mu$ l RNAase-free H<sub>2</sub>O.

### **4.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase**

Metoda kvantitativní polymerázová řetězová reakce (dále jen PCR) v reálném čase završuje zjištění genové exprese PD-1 ve vzorcích paragangliomu a feochromocytomu.

Kvantitativní PCR v reálném čase je metoda podobná běžné PCR, rozdíl spočívá v možnosti zaznamenávat množství amplifikované DNA v průběhu jednotlivých cyklů (v reálném čase). Je zde přítomna próba (sonda) s navázanými molekulami tzv. Reporter (barvička) a Quencher (zhášec). Pokud jsou přítomny jak Reporter tak Quencher spolu na sondě, tak Reporter nevyzařuje/nesvítí. Tato sonda se naváže specificky na cDNA (většinou je sonda navržena přes introny, takže se naváže specificky na případnou genomickou DNA). Při syntéze nového komplementárního vlákna polymeráza díky své 5' exonukleázové aktivitě odštěpí barvičku, která je následně detekována jako zvýšení fluorescence [25] [26].



Obrázek 5 Princip TaqMan eseje [26]

Příprava vzorku probíhá opět na ledu, ovšem pipetujeme do jamičkové destičky a každý vzorek dvakrát tzn. v dubletech. Přidá se 5  $\mu$ l cDNA a 20  $\mu$ l premixu, jehož složení na jednu jamku představuje:

- 1,25  $\mu$ l sondy (TaqMan: vlastní próba pro stanovení genové exprese, přední a zadní primer);
- 6,25  $\mu$ l destilované vody;
- 12,5  $\mu$ l mastermixu (obsahuje dNTP, MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polymerase, anti-Taq, pasivní referenční barvivo ROX (Rhodamine X) atd.)

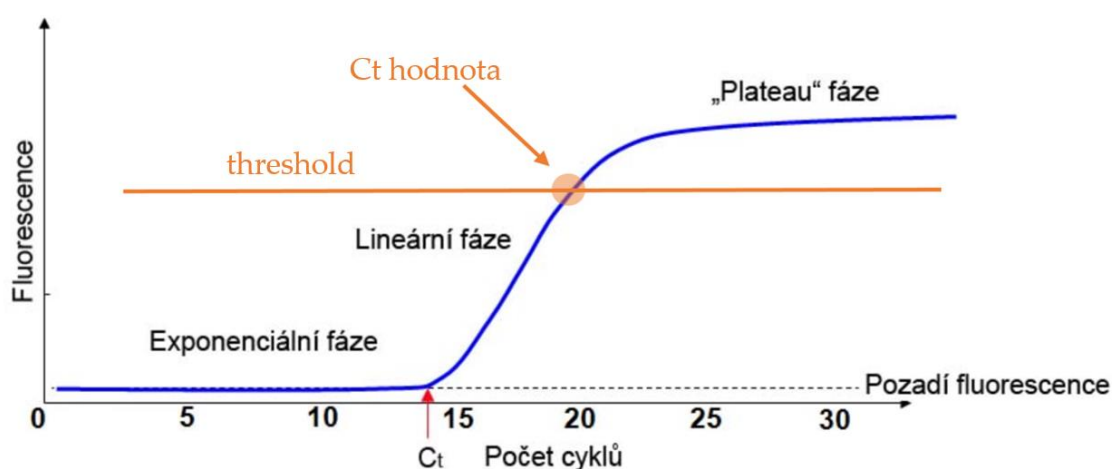
Primery včetně sondy pro stanovení genové exprese *beta aktinu* a *PD-1* mají katalogové číslo Hs99999903\_m1 a Hs00169472\_m1.

Vše se musí zvortexovat a poté se destička pečlivě přelepí fólií a stočí v centrifuze na 300 g při teplotě 23 °C. Po zcentrifugování se destička uloží do přístroje a nastaví se následující cyklus:

- 50 °C, 2 min (počáteční fáze);
- 95 °C, 10 min (degradace případné zbývající RNA);
- 40x 95 °C, 15 sec (denaturace);
- 40x 60 °C, 60 sec (elongace);
- 60 °C, 10 min (závěrečná extenze).

Na softwaru přístroje pro kvantitativní PCR v reálném čase je automaticky nastavena hranice threshold, při jejímž protnutí se započítává hodnota cycle of threshold (dále jen Ct), která odpovídá počtu cyklů, při kterém fluorescence protne nastavenou linii threshold.

Schéma průběhu kvantitativní PCR v reálném čase je znázorněno níže na Obrázku 5.



Obrázek 6 Průběh kvantitativní PCR v reálném čase [25, vlastní zdroj]

Společně se stanovováním genové exprese PD-1 je nutné stanovit i hodnotu referenčního genu (také možno nazvat house-keeping gen), který slouží jako kontrola přítomnosti dostatečného množství vhodného buněčného materiálu a nehrozí tedy vznik odchylky, která by tím mohla být způsobena.

## 5 VÝSLEDKY

Ze vzorků tkáně byla izolována RNA, následovalo její převedení pomocí reverzní transkripce na cDNA. Dále pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase byly získány hodnoty Ct pro gen *pd-1* a pro gen kódující protein beta-aktin (dále jen *actb*). Gen *actb* sloužil jako house-keeping gen, v buňce odpovídá za tvorbu cytoskeletu, bez kterého by buňka nepřežila [27]. Na rozdíl od genu *pd-1* by neměl být gen *actb* ovlivněn probíhajícím rakovinným procesem, proto je vhodný k použití jako referenční gen.

Měření v rámci této bakalářské práce byly podrobeny dvě skupiny vzorků tkáně, a to tkáně zdravých jedinců a pacientů s paragangliomem či feochromocytomem.

V první skupině byly analyzovány dva vzorky tkáně nadledvinek zdravých jedinců, která byla získána při chirurgickém zákroku. Relativní kvantifikace genové exprese PD-1 prvního vzorku je 0,5210 a druhého 1,9195. Mezi těmito dvěma hodnotami je mírný rozdíl a je otázkou, zda tkáň druhého jedince byla skutečně v pořádku, nebo zda se u ní nezačínaly vyvíjet abnormální změny. Každopádně klinicky i laboratorně byli v tomto ohledu oba pacienti označeni jako zdraví.

V druhé skupině bylo měřeno devatenáct vzorků tkáně pacientů s diagnostikovaným paragangliomem či feochromocytomem. Všechny vzorky vykazovaly vyšší genovou expresi PD-1 než vzorky zdravých jedinců. Relativní kvantifikace (dále jen RQ) nemocných pacientů oproti zdravým jedincům se pohybovala od 3,5008 do 168,5462.

Tabulka 1 Změřené a vypočtené hodnoty genové exprese [vlastní zdroj]

	ct (ACTB)	ct (PD-1)	$\Delta$ ct	$\Delta\Delta$ ct	RQ
<b>Kontrola 1</b>	19,8279	36,3240	16,4961	0,9407	0,5210
<b>Kontrola 2</b>	22,0210	36,6357	14,6147	- 0,9407	1,9195
<b>Vzorek 1</b>	23,4487	37,1964	13,7477	- 1,8077	3,5008
<b>Vzorek 2</b>	23,8590	37,1724	13,3134	- 2,2420	4,7305
<b>Vzorek 3</b>	22,5918	33,4141	10,8223	- 4,7331	26,5953
<b>Vzorek 4</b>	22,5085	33,3422	10,8337	- 4,7217	26,3860
<b>Vzorek 5</b>	22,7939	35,1906	12,3967	- 3,1587	8,9302
<b>Vzorek 6</b>	23,0523	35,2527	12,2004	- 3,3550	10,2319
<b>Vzorek 7</b>	23,2945	32,4317	9,1372	- 6,4182	85,5206
<b>Vzorek 8</b>	23,5825	32,4515	8,8690	- 6,6864	102,9928
<b>Vzorek 9</b>	22,8597	33,9139	11,0542	- 4,5012	22,6463
<b>Vzorek 10</b>	22,9865	34,0741	11,0876	- 4,4678	22,1280
<b>Vzorek 11</b>	23,4548	32,0635	8,6087	- 6,9467	123,3574
<b>Vzorek 12</b>	23,4563	32,0916	8,6353	- 6,9201	121,1038
<b>Vzorek 13</b>	23,2108	33,9739	10,7631	- 4,7923	27,7093
<b>Vzorek 14</b>	23,1235	33,9106	10,7871	- 4,7683	27,2522
<b>Vzorek 15</b>	24,3736	33,2684	8,8948	- 6,6606	101,1674
<b>Vzorek 16</b>	24,1878	33,2454	9,0576	- 6,4978	90,3718
<b>Vzorek 17</b>	22,9989	33,0511	10,0522	- 5,5032	45,3553
<b>Vzorek 18</b>	23,0026	33,0016	9,9990	- 5,5564	47,0590
<b>Vzorek 19</b>	23,0867	31,2451	8,1584	- 7,3970	168,5462

ct = cycle threshold

$$\Delta$$
ct = ct(PD-1) – ct(ACTB)

$$\Delta$$
c(z) = průměr kontrol

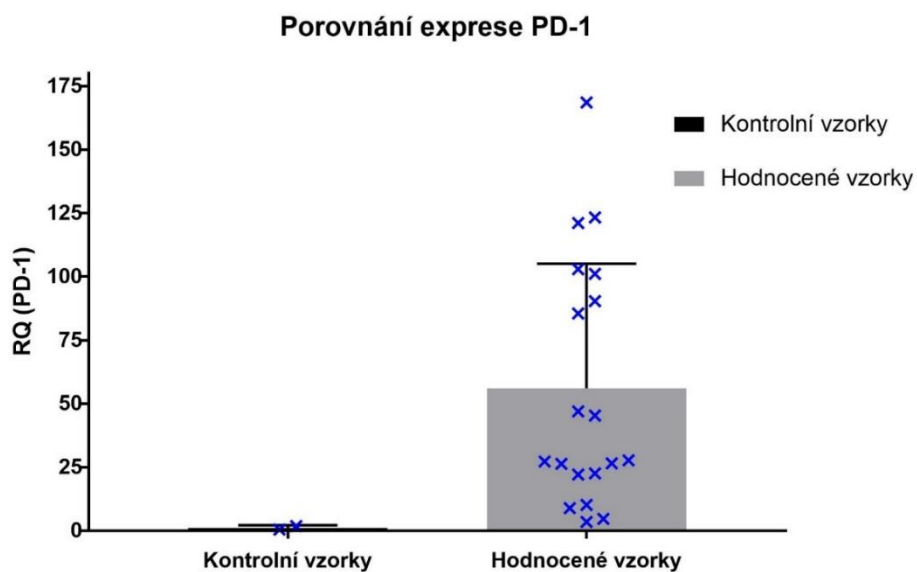
$$\Delta\Delta$$
ct =  $\Delta$ ct -  $\Delta$ c(z)

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta$$
ct

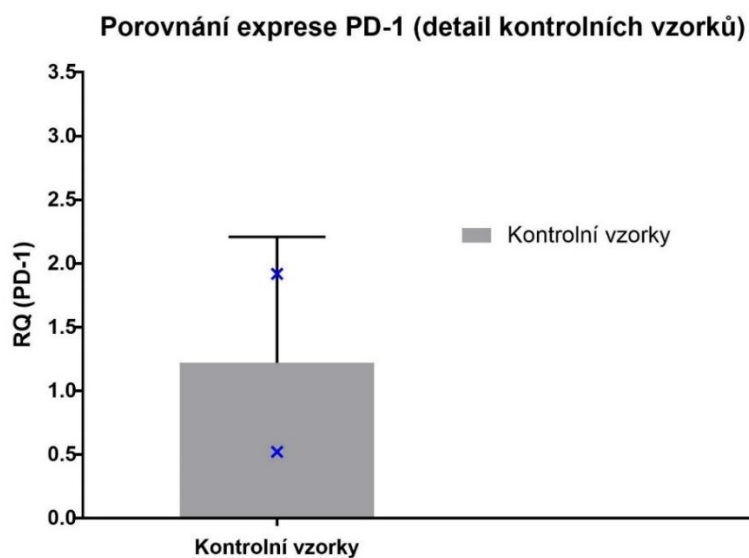
Získané hodnoty Ct bylo nutné přepočítat na hodnoty relativní kvantifikace (RQ) pomocí metody  $\Delta\Delta Ct$ . Postup výpočtu je znázorněn pod tabulkou výše, v které je možné vidět naměřené výsledky Ct (PD-1) a Ct (ACTB). Z těchto hodnot bylo nutné spočítat rozdíl  $\Delta Ct = Ct (PD-1) - Ct (ACTB)$ . Poté byl vypočten průměr hodnot dvou kontrolních vzorků, označen jako Z, který byl dále používán na výpočet  $\Delta\Delta Ct$ , z kterého se vypočítala RQ. V tabulce jsou uvedeny naměřené a vypočtené hodnoty  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$  a RQ.

Naměřená data byla zpracována a vyhodnocena pomocí softwaru GraphPad Prism 7. Odlišnosti mezi skupinou zdravých jedinců a skupinou pacientů byly porovnány Mann Whitney testem, jedná se o neparametrický nepárový test. Cílem testu bylo zjistit rozdílnost mezi měřenými skupinami, na hladině významnosti  $p = 0,01$ . Výsledná p-hodnota byla  $p = 0,0095$ . Nulovou hypotézou se předpokládala rovnost středních hodnot obou měřených skupin, což by znamenalo, že genová exprese PD-1 je u zdravých jedinců i pacientů s paragangliomem či feochromocytomem stejná. Pomocí p-hodnoty byla nulová hypotéza zamítnuta. Rozdílnost skupin ve výsledcích je značná, medián skupiny zdravých jedinců je  $\tilde{x} = 1,22$  a medián vzorků pacientů byl  $\tilde{x} = 27,71$ .

Výsledky jsou graficky znázorněny níže na Obrázku 6 a Obrázku 7, v grafech je skupina zdravých jedinců označena jako Kontrolní vzorky a skupina pacientů s paragangliomem a feochromocytomem je označena pojmem Hodnocené vzorky. V tabulce výše je možné všimnout si, že nejnižší stanovená hodnota u hodnocených vzorků je 3,5008, naopak nevyšší hodnota je 164,5462. Vysoká variabilita hodnot by mohla být způsobena různým stupněm závažnosti nádorového onemocnění.



Obrázek 7 Porovnání exprese PD-1 [vlastní zdroj]



Obrázek 8 Porovnání exprese PD-1 (detail kontrolních vzorků) [vlastní zdroj]

Stanovení genové exprese PD-1 u paragangliomů a feochromocytomů by mohlo přispět k lepší diagnostice, určení klinické závažnosti či k návrhu optimálních terapeutických postupů.



## 6 DISKUZE

V praktické části bakalářské práce byla porovnávaná genová exprese PD-1 v tkáni zdravých jedinců a tkáni pacientů s paragangliomem či feochromocytomem. PD-1 je molekula vyskytující se na povrchu některých buněk imunitního systému. PD-1 má dva ligandy PD-L1 a PD-L2. PD-L1 se vyskytuje na nádorových buňkách a v případě vzniku vazby s PD-1 dojde k inaktivaci T-lymfocytů [28]. Vazba zajišťuje vytvoření inhibiční dráhy PD-1/PD-L1, jejíž interakce má za normálních okolností zabraňovat neadekvátní imunitní reakci (například autoimunitní), avšak tento mechanismus mohou zneužívat nádorové buňky jako nástroj na obranu před imunitními mechanismy. Nádorové buňky či buňky jejich mikroprostředí často exprimují vyšší množství PD-1, čímž snadněji dojde k potlačení imunitní reakce [29].

Molekula PD-1 je exprimována na aktivovaných CD4 a CD8 T-lymfocytech, B-lymfocytech, monocytech, NK buňkách a dendritických buňkách. Je potřeba brát v úvahu faktory, které ovlivňují jejich expresi. Exprese PD-1 na T-lymfocytech je zvyšována cytokiny IL-2, IL-7, IL-15 a IL-21. Specifický interferon regulační faktor 9 může zvyšovat proces transkripce genu PD-1. Exprese molekuly PD-1 je zvýšena i při chronických virových infekcích na vyčerpaných specifických T-lymfocytech, které zabraňují proliferaci a aktivitě virů [16].

Ve studii [16], kterou provedli Bai a kol., je uvedeno, že epigenetické modifikace se také podílí na expresi PD-1. Například během akutní infekce může u CD8+ T-lymfocytů docházet v lokusu genu kódujícího PD-1 k metylaci a následnému vzniku paměťových T-lymfocytů [16].

Lowther a kol. se ve své studii [30] zabýval molekulou PD-1 jako průkazem značícím dysfunkci Tregs při maligním gliomu. Tregs jsou důležité pro regulaci imunitní reakce. Funkce Tregs, které exprimují vyšší množství molekul PD-1, se zdá

být omezená. Při zvýšené expresi PD-1 bylo také zaznamenáno snížené množství CD4+ efektorových T-lymfocytů [30].

Imunoterapeutické postupy zaměřené na protinádorovou léčbu cílí na imunoregulační molekuly, které jsou součástí imunitních kontrolních bodů, mezi něž patří molekuly PD-1, PD-L1 a CTLA-4. Léčbou se zabrání inhibici imunitních mechanismů a nádorové buňky jsou imunitním systémem zranitelné [31].

V roce 2014 poprvé vládní agentura Spojených států amerických Úřad pro kontrolu potravin a léčiv schválila léčbu melanomu monoklonální protilátkou proti PD-1, protilátkou byl pembrolizumab. Krátce poté byla schválena další protilátka proti PD-1, nivolumab. V roce 2015 byly zaznamenány pozitivní odezvy v léčbě NSCLC a rakoviny ledvin, což podpořilo schválení kombinované blokády kontrolních bodů, to znamená kombinované použití nivolumabu a ipilimumabu, a to pro léčbu melanomu. Ipilimumab je protilátka proti CTLA-4. Později byla léčba schválena pro případy urotheliálního karcinomu, nádorů hlavy a krku a Hodgkinova lymfomu, u kterého bylo zlepšení po léčbě zaznamenáno v 55–75 % případů. Léčba byla postupně povolena pro další typy rakoviny [32].

Mackiewicz a kol. se ve své studii [33] zabýval inhibicí PD-1 při léčbě pacientů s pokročilým melanomem, která do roku 2010 probíhala především pomocí chemoterapie. Po roce 2010 byly pro léčbu vyvinuty a schváleny nové postupy a léky, jedním z nich byl ipilimumab, jehož použití vykazovalo u 20 % pacientů delší dobu přežití. Léčba kombinací nivolumabu s ipilimumabem byla efektivnější, avšak byla doprovázena vysokou toxicitou [33].

Léčbě pokročilého melanomu se ve své studii [34] věnoval také Achkar a kol. V poslední době došlo ke zvýšení možností, jak léčit metastazující melanom, především díky lepšímu pochopení role imunitního systému při progresi nádorového onemocnění. Charakterizace vlivu nádorového mikroprostředí

na funkci imunitního systému je klíčová pro navržení optimálních léčebných postupů – imunoterapie. Jednou z nejúspěšnějších imunologických strategií pro zlepšení protinádorové odpovědi bylo použití monoklonálních protilátek blokujících inhibiční imunoregulační mechanismy nádorového mikroprostředí. Monoklonální protilátky se tím snaží potlačit imunitní odpověď, která by mohla rozpoznat a následně zničit nádorové buňky. Po třech dávkách se z původních dvou týdnů změnila frekvence podání na každé tři týdny. Bylo zaznamenáno prodloužení doby, kdy nedochází k progresi nádoru, jejíž střední hodnota byla 5,5 měsíců. Odpověď na léčbu byla vyšší při vysoké expresi PD-L1 v nádorové tkáni. Při studiu léčby nivolumabem byla testována účinnost a bezpečnost od dávky 0,1 mg/kg až postupně do dávky 10 mg/kg. Maximální možná dávka není definována, protože vyšší dávka než 10 mg/kg podána nebyla [34].

LaFleur ve své studii [32] uvádí, že monoklonální protilátky proti PD-1 sice měly v léčbě nádorů u některých pacientů pozoruhodný úspěch, ale objektivně byla odpověď znatelná u minority pacientů. Proto je hledán biomarker v séru, podle kterého by bylo možno rozeznat vhodnost této formy léčby pro konkrétního pacienta [32].

Imunoterapie a blokace inhibiční dráhy PD-1/PD-L1 je považována za jednu ze slibných metod léčby rakoviny. V současné době je povoleno používat k léčbě pět druhů protilátek a jejich účinek byl prokázán u více než patnácti typů rakoviny. Nicméně v porovnání s chemoterapií, při imunoterapii často nastává primární resistance nebo může dojít k počátečnímu zlepšení a později k získané resistance a prognóza pacienta se opět zhorší. Resistance vůči monoklonálním protilátkám je komplexní problém, který může ovlivňovat exprese PD-L1, nádorové mikroprostředí, imunologické geny nebo epigenetika [16].

Blokáda PD-1 je známá i při terapii pokročilého stádia NSCLC, které se obvykle léčí pomocí chemoterapie založené na platině či jinými chemoterapeutiky.

V případě tohoto karcinomu plic je vyvinuta cílená léčba proti receptoru EGFR (epidermal growth factor receptor, receptor pro epidermální růstový faktor), jehož aktivace způsobuje vznik tumoru u 10–60 % případů. U 68 % NSCLC je zvýšená exprese PD-L1. Léčba monoklonálními protilátkami anti-PD-1 je u NSCLC doporučena jako následná léčba u pacientů, u kterých nemoc pokračuje i po předchozí léčbě či u nich již proběhla první vlna chemoterapie. Pembrolizumab je podáván v dávkách 2 mg/kg nebo 10mg/kg každé tři týdny nebo 10 mg/kg každé dva týdny [35].

Ve studii Shindiapina a kol. [36] byla u 23 pacientů s neústupným nebo s vracejícím se klasickým Hodgkinovým lymfomem použita léčba nivolumabem, monoklonální protilátkou mířenou proti PD-1. Pacientům byly podávány léky v dávce 3 mg/kg každé dva týdny. Po 40 týdnech byla celková míra odezvy u 87 % a u 17 % pacientů došlo k úplné remisi. Po 86 týdnech 10 z 20 pacientů bylo v remisi a 12 pacientů ukončilo léčbu nivolumabem z jiného důvodu (čtyři z nich kvůli dalšímu vývoji nemoci, dva z nich z důvodu sekundární toxicity) [36].

Ve studii Wanga a kol. [31] zabývající se expresí PD-1 v periferních krevních buňkách a její modulací u pacientů s rakovinou byli nemocní pacienti rozděleni do dvou skupin. Jednu z nich léčili pomocí radioterapie a druhou imunomodulační terapií. Exprese mRNA pro gen *PD-1* u pacientů léčených imunomodulační terapií se u 48 % snížila a u 52 % zvýšila. Zjistilo se, že záleží na počátečních hodnotách mRNA pro gen určující PD-1. Pokud byla exprese zvýšena, snížila se a naopak. Ve skupině léčené radioterapií se exprese u 75 % pacientů snížila a u 25 % zvýšila [31].

Ve studii [37] Moskovitze a kol. byly popisovány negativní účinky imunoterapie. Tato terapie se sice vyznačuje nižší toxicitou než terapie tradiční (chemoterapie, radioterapie), ale přesto se nějaké nežádoucí účinky objevují. Převažují autoimunitní

nežádoucí účinky a mezi nejčastější z nich patří kolitidy, pneumonitidy a endokrinopatie [37].

Dalšími autoimunitními onemocněními, získanými sekundárně jako reakci na imunoterapii, může být revmatoidní artritida, diabetes mellitus I. typu a pankreatitidy. Biopsie postižených orgánů či tkání ukázala zánětlivé změny a zvýšení CD3+ a CD8+. Obecně je však pembrolizumab velmi dobře tolerován [36].

Ve studii [36] Shindiapina a kol. byly při léčbě klasického Hodgkinova lymfomu, kdy bylo pozorováno 23 jedinců, nejčastěji zaznamenány nežádoucí účinky ve formě hypotyreózy (16 %), průjmů (16 %), nevolnosti (13 %) a pneumonitidy (10 %) [36].

Podle nalezených zdrojů se paragangliomy a feochromocytochy pomocí imunoterapeutických metod prozatím neléčí. Jejich léčba probíhá nejčastěji prostřednictvím chirurgického odstranění nádoru s předoperační farmakologickou blokádou alfa, případně beta receptorů [38].

Nádory nadledvinek paragangliomy a feochromocytochy se vyskytují vzácně a ve většině případů se jedná o benigní formy. Za těchto okolností se zdá postačující chirurgické odstranění nádoru, obvykle se benigní onemocnění neopakují. Jen nízké procento nádorů bývá zhoubných, v těchto případech by mohlo být přínosné podrobnější pochopení vyjádření a funkce imunoregulačních molekul (tzn. PD-1, CTLA-4, PD-L1 a další) [6].

V současné době nebyla provedena podobná studie, která by sledovala souvislosti mezi imunoregulačními molekulami PD-1 a paragangliomy či feochromocytochy. Avšak studie zkoumající souvislosti mezi PD-1 a jinými typy nádorů již proběhly, obvykle porovnávaly expresi PD-1 u skupiny zdravých a nemocných jedinců, kde rozdíl hodnot měřených skupin je většinou signifikantní a vyjádřen p-hodnotou.

Hlavními použitými metodami pro měření genové exprese PD-1 byly izolace RNA, reverzní transkripce na cDNA a kvantitativní PCR v reálném čase. Jsou to metody běžné pro měření genové exprese. V popisovaných studiích byly používány stejné metody, Zhang ve své studii [39] navíc použil průtokovou cytometrii, aby přesně určil typy přítomných buněk.

Wieser a kol. se ve své studii [28] zabývali expresí PD-1 a jeho ligandu PD-L1 v souvislosti s rakovinou vaječníku ve vztahu k mutačním stavům genu BRCA 1 a 2 (dále jen *BRCA 1/2*) a tumor-supresorovému genu (dále jen *TP53*). Porovnávali skupinu 28 vzorků tkáně vejcovodů a vaječnicků zdravých jedinců se skupinou 170 pacientů s diagnostikovanou rakovinou vaječníku. Měřená byla exprese PD-1 a rozdíl těchto hodnot je vyjádřen p-hodnotou. V případě porovnávání zdravé tkáně vaječnicků s rakovinnou tkání vaječníku je p-hodnota  $p < 0,001$ . Při sledování rozdílu mezi zdravou tkání vejcovodu a rakovinnou tkání vaječníku je p-hodnota  $p = 0,018$ . Oba případy naznačují rozdíl v expresi PD-1, která byla vyšší u tkáně postižené rakovinným bujením. Porovnávána byla i zdravá tkáň vaječnicků se zdravou tkání vejcovodů, kde p-hodnota  $p = 0,031$ , což také značí rozdíl v expresi dvou tkání. Závěrem této studie bylo, že geny *BRCA 1/2* a *TP53* jsou asociovány s vyšší expresí PD-1 a PD-L1. Podle této studie by inhibitory molekul PD-1 mohly být klinicky přínosné při léčbě [28].

Při studiu rakovinných buněk vaječnicků bylo zjištěno, že pokročilé případy rakoviny a vyšší exprese PD-1 a PD-L1 jsou úzce spojeny s nepříznivou prognózou pro pacienta. [28]

Zhang a kol. ve své studii [39] sledovali souvislosti mezi expresí PD-1 na povrchu periferních T-lymfocytů populace CD4+ ve spojení s prognózou difúzního B-velkobuněčného lymfomu (dále jen DLBCL). Sledovaná skupina se skládala z šedesáti vzorků pacientů, kterým byl nedávno diagnostikován DLBCL. Kontrolní skupinu tvořilo 39 vzorků zdravých jedinců. Medián hodnot první sledované

skupiny byl 541,5 a medián hodnot zdravých jedinců byl 250, už samotné hodnoty mediánů naznačují vysokou odlišnost mezi dvěma sledovanými skupinami, p-hodnota byla  $p < 0,001$ . Exprese PD-1 v populaci CD4+ T-lymfocytů u pacientů s DLBCL byla tedy značně vyšší než u kontrolní skupiny zdravých jedinců. Je možné, že vysoká exprese PD-1 v populaci periferních CD4+ T-lymfocytů může narušovat jejich funkce a tím přispívat k horšímu vývoji onemocnění [39].

Expresí PD-1 v periferních krevních buňkách ve vztahu k pacientům s rakovinou se také zabýval ve své studii [31] Wang a kol., kde bylo posuzováno deset zdravých jedinců vůči čtyřiceti pěti pacientům s rakovinou. Proběhla analýza genové exprese u více molekul a znaků, tzn. u PD-1, CTLA-4, CD25, CD28, IL-10, TGF- $\beta$  a u genu pro protein forkhead box P3 (dále jen Foxp3). Signifikantní rozdíl exprese oproti zdravým jedincům byl zaznamenán především u molekul PD-1 a CTLA-4. Exprese PD-1 byla zvýšena u 71 % pacientů, rozdíl mezi hodnotami zdravých jedinců a nemocných pacientů je opět vyjádřen i p-hodnotou  $p = 0,04$ . Genová exprese CTLA-4 vykazovala vyšší hodnotu u 87 % pacientů, p-hodnota je  $p = 0,04$ . Rozdíl mezi vzorky zdravých jedinců a vzorky nemocných pacientů u ostatních imunoregulačních měřených molekul nebyl signifikantní [31].

Exprese PD-1 v periferních buňkách však nemusí odrážet expresi PD-1 v nádorovém mikroprostředí. Korelace mezi těmito dvěma informacemi není jasná [39]. PD-1 může být v nádorovém mikroprostředí přítomna na různých buňkách, tzn. na T-lymfocytech, NK buňkách, makrofázích atd. Typ buněk, na kterých je PD-1 vyjádřena nejvíce, může ovlivňovat imunitní mechanismy a tím pádem i prognózu onemocnění [39].

Korelací mezi expresí PD-1 a stádiem onemocnění se zabýval MacFarlane a kol. ve své studii [40], podle Klasifikace zhoubných novotvarů jsou určeny stupně onemocnění a popsány v souvislosti s expresí PD-1. Při stupni 1 a 4 bylo statisticky významné zvýšení exprese PD-1 zaznamenáno nejvíce na monocytech, neutrofilech,

NK buňkách a T-lymfocytech se znaky CD4+ a CD8+. Při stupni 2 je zvýšená exprese PD-1 na monocytech. Pro stupeň 2 a 3 nebylo možné určit významné populace buněk z důvodu nedostatku vzorků [40].

MacFarlane a kol. ve své studii [40] pozorovali změny exprese PD-1 ve vzorcích krve u 23 pacientů s rakovinou ledvin před a po chirurgickém zákroku. Před zákrokem bylo zvýšení exprese PD-1 zaznamenáno u většiny leukocytů v periferní krvi. Po operaci, v časovém horizontu 2–57 týdnů po provedení zákroku, se exprese PD-1 téměř u všech pacientů snížila na běžnou úroveň ve všech typech buněk, v kterých byla předtím vyšší. Není možné rozlišit, zda bylo snížení způsobeno úbytkem receptorů z buněčného povrchu nebo ztrátou buněk, které PD-1 exprimovaly. U některých pacientů v maligním stádiu rakoviny stupně 3 nebo 4 s metastázemi, exprese zůstala zachována či se zvýšila, což naznačuje, že metastáze udržují zvýšenou expresi PD-1 na leukocytech i po odstranění primárního nádoru. Avšak je potřeba popsanou skutečnost ověřit na větší skupině jedinců [40].

V této bakalářské práci je možné na základě výsledné p-hodnoty  $p = 0,0095$  na hladině významnosti 0,01 zamítnout nulovou hypotézu, podle které by genová exprese PD-1 u zdravých jedinců a nemocných pacientů s paragangliomem a feochromocytomem byla shodná. Množství genové exprese PD-1 bylo u nádorové tkáně vyšší.

Dalšími kroky k podrobnějšímu porozumění problematice buněčné imunity a inhibiční dráhy PD-1/PD-L1 ve vztahu k rozvoji paragangliomu a feochromocytomu by mohla být podrobnější analýza imunoregulačních molekul (např.: CTLA-4 a PD-L1). Komplexnější pochopení by mohlo pomoci stanovit léčbu protilátkami anti-PD-1.



## 7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zjištění souvislostí mezi expresí PD-1 u zdravých a nemocných jedinců. Mezi těmito dvěma skupinami byl pozorován zřetelný rozdíl hodnot relativní genové kvantifikace a na základě p-hodnoty  $p = 0,0095$  byla nulová hypotéza, podle které by se hodnoty zdravých a nemocných jedinců měly rovnat, zamítnuta na hladině významnosti 0,01. Tedy u pacientů s paragangliomy a feochromocyty byla zjištěna významně vyšší genová exprese PD-1 ve srovnání se zdravou tkání. Množství molekul mRNA pro PD-1 bylo zvýšené u nádorové tkáně nadledvinek. Výsledné hodnoty je možné srovnat s výsledky zahraničních studií sledujících vztah PD-1 a nádorových buněk u karcinomu vaječnicků, vejcovodů a DLBCL. Jejich studie [28] a [39] také vykazovaly značný rozdíl v genové expresi PD-1 v tkáni zdravých jedinců a v tkáni onkologických pacientů.

Vyjádření PD-1 je kromě nádorových buněk ovlivněno i mnoha dalšími činiteli, například genetickými predispozicemi. Exprese je zvyšována cytokiny, regulačními faktory a dalšími mechanismy. Zdá se, že zde hraje svou roli i epigenetika.

Imunoterapeutické postupy se vyvíjí slibně a pro léčbu nádorových onemocnění bylo schváleno již několik monoklonálních protilátek působících proti imunoregulačním molekulám. Léčba těmito postupy se ukazuje v některých případech jako účinná. Avšak jiné postupy, například chemoterapie a radioterapie, vykazují stále vyšší účinnost léčby.

Zvýšení PD-1 a jejích ligandů je někdy patrné i v buňkách periferní krve, což by mohlo zjednodušit diagnostiku. Množství exprese PD-1 na periferních buňkách nemusí být shodné s expresí u buněk nádorových.

Pro další posun této problematiky je nutné podrobně porozumět vyjádření dalších molekul na povrchu buněk nádorového mikroprostředí. Děje v organismu jsou komplexní a je potřeba rozumět všem souvislostem.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTB	gen kódující protein beta-aktin
ADM	adrenomedulin
APC	antigen prezentující buňka
B7	typ periferního membránového proteinu
BRCA 1/2	gen BReast CAncer 1 a 2
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
cDNA	komplementární DNA
COMT	katechol-O-metyltransferáza
CT	výpočetní tomografie
Ct	cycle of treshold
CTLA-4	cytotoxický T-lymfocytární antigen 4
DHPG	3,4-dihydroxyfenylglykol
DLBCL	B-velkobuněčný lymfom
DNA	deoxyribonukleová kyselina

FoxO1	forkhead box protein O1
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL	interleukin
IRF1	interferon regulatory factor 1
JAK	janus kinase
JAK-STAT	janus kinase-signal transducer and activator of transcription protein
MAO	monoaminoxidáza
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC I	hlavní histokompatibilní komplex I
MHPG	3-metoxy-4-hydroxyfenylglykol
MIBG	metajodobenzylguanin
MR	magnetická resonance
mRNA	messenger RNA
NF1	neurofibromin 1
NK	natural killer cells, přirození zabíječi

NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (non-small-cell lung cancer)
PD-1	molekuly programované buněčné smrti 1, programmed cell death domain 1
PD-L1	ligand programované buněčné smrti 1, programmed cell death ligand 1
PD-L2	ligand programované buněčné smrti 2, programmed cell death ligand 2
PET	pozitronová emisní tomografie
PI3K/Akt	phosphatidylinositol-3-kinase-Akt
RET	red proto-oncogene, protoonkogen kódující receptor tyrozin kinázu
RNA	ribonukleová kyselina
RQ	relativní kvantifikace
SDH	succinate dehydrogenase subunits, sukcinátdehydrogenáza
SDHAF2	gen kódující sukcinát dehydrogenázu faktor 2

STAT	signal transducer and activator of transcription protein
TCR	receptor T-lymfocytu
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta, transformující růstový faktor beta
TP53	tumor-supresorový gen
Tregs	regulační T-lymfocyty
ÚIM 1. LF UK	Ústav imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor, gen asociovaný se vznikem von Hippel-Landau syndromu

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Obecná patologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-773-8.
- [2] STRÍTESKÝ, Jan. *Patologie: [učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium]*. Vyd. 1. Olomouc: Epava, 2001. ISBN 80-862-9706-3.
- [3] LOUTHAN, Oldřich. *Neuroendokrinní nádory: klinické pohledy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1162-1.
- [4] VORLÍČEK, Jiří, Jitka ABRAHÁMOVÁ a Hilda VORLÍČKOVÁ. *Klinická onkologie pro sestry*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3742-3.
- [5] VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK, Tomáš NOVOTNÝ a Václava KONRÁDOVÁ. *Lékařská histologie II.: mikroskopická anatomie*. 2., upravené vydání. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 978-802-4638-270.
- [6] ŠTRAUCH, Branislav a Tomáš ZELINKA. Feochromocytom - klinické aspekty. *Medicína pro praxi*. 2009, **6**, 249-253.
- [7] KIM, Kyong, Jung KIM, A. HONG et al. Disentangling of Malignancy from Benign Pheochromocytomas/Paragangliomas. *PLoS One*. 2016, **11**, -. DOI: 10.1371/journal.pone.0168413. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0168413>

- [8] BÍLEK, Radovan a Zelinka TOMÁŠ. *Chromogranin, metanefriny a thyreoidální faktory v diferenciální diagnostice neuroendokrinních tumorů se zaměřením na medulární karcinom štítné žlázy a feochromocytom*. 1. 1 svazek: ilustrace, tabulky; 30 cm.: Číslo grantové zprávy: NT12336., 2015. ISBN -. ISSN -.
- [9] MUSIL, Zdeněk, Aleš VÍCHA, Tomáš ZELINKA, Hana TURKOVÁ, Milada KOHOUTOVÁ a Karel PACÁK. Hereditární feochromocytom a paragangliom. *Klinická onkologie*. 2012, **25**, 21-26. ISSN 1802-5307.
- [10] MAREK, Josef. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-802-4726-397.
- [11] HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
- [12] ZATLOUKALOVÁ, Pavlína, Mariana PJECHOVÁ, Soňa BABČANOVÁ, Theodore HUPP a Bořivoj VOJTĚŠEK. The Role of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Antitumor Immune Response. *Klinická onkologie*. 2016, **29**(4), 472-477. DOI: 10.14735/amko20164S72. ISSN 0862495x. Dostupné také z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/5084/>
- [13] ZÁVADOVÁ, Eva, ed. *Onkologická imunologie*. První vydání. Praha: Mladá fronta, 2015. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3756-3.
- [14] PAUL, Sourav a Girdhari LAL. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front.*

*Immunol.* 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01124. Dostupné také z:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01124/full>

- [15] ILCUS, Cristina, Cristina BAGACEAN, Adrian TEMPESCU, Cristian POPESCU, Andrada PARVU, Mihai CENARIU, Corina BOCSAN a Mihnea ZDRENGHEA. Immune checkpoint blockade: the role of PD-1-PD-L axis in lymphoid malignancies. *Onco Targets Therapy*. 2017, , 2349-2363. DOI: 10.2147/OTT.S133385. Dostupné také z:  
<https://www.dovepress.com/immune-checkpoint-blockade-the-role-of-pd-1-pd-l-axis-in-lymphoid-mali-peer-reviewed-article-OTT>
- [16] BAI, Jie, Zhitao GAO, Xiang LI, Liang DONG, Weidong HAN a Jing NIE. Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PDL1 blockade. *Oncotarget*. 2017, 7(66), 110693-110707. DOI: 10.18632/oncotarget.22690. Dostupné také z:  
<http://www.oncotarget.com/fulltext/22690>
- [17] DONG, Yinan, Qian SUN a Xinwei ZHANG. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*. 2017, 8(2), 2171–2186. DOI: 10.18632/oncotarget.13895. Dostupné také z:  
<http://www.oncotarget.com/fulltext/13895>
- [18] GARCIA-DIAZ, Angel, Daniel SHIN, Blanca MORENO et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*. 2017, 19(6), 1189-1201. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.031. ISSN 22111247. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124717305259>
- [19] CHAUHAN, Aman, Millicent HORN, Gray MAGEE, Kurt HODGES, Mark EVERS, Susanne ARNOLD a Lowell ANTHONY. Immune



checkpoint inhibitors in neuroendocrine tumors: A single institution experience with review of literature. *Oncotarget*. 2018, **9**(10), -. DOI: 10.18632/oncotarget.23753. ISSN 1949-2553. Dostupné také z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/23753>

[20] JIANG, X., J. ZHOU, A. GIOBBIE-HURDER, J. WARGO a F. HODI. The Activation of MAPK in Melanoma Cells Resistant to BRAF Inhibition Promotes PD-L1 Expression That Is Reversible by MEK and PI3K Inhibition. *Clinical Cancer Research*. 2013, **19**(3), 598-609. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2731. ISSN 1078-0432. Dostupné také z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-12-2731>

[21] PLATANIAS, Leonidas. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2005, **5**(5), 375-386. DOI: 10.1038/nri1604. ISSN 1474-1733. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nri1604>

[22] RÉDEI, P. Interferon Sequence Response Element (ISRE). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, , 1014-1014. DOI: 10.1007/978-1-4020-6754-9\_8612. ISBN 978-1-4020-6753-2. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6754-9\\_8612](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6754-9_8612)

[23] *Onkologie: Funkční zobrazení a léčba neuroendokrinních tumorů pomocí metajodbenzylguanidinu*. 2011, **5**(6). ISSN 1803-5345.

[24] PACÁK, Karel. *Feochromocytom*. 1. vyd. Praha: Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-519-2.

- [25] LabGuide. *LabGuide* [online]. Česká Republika: LabGuide tým, 2014 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
- [26] *Thermo Fisher Scientific* [online]. 2016 [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>
- [27] HAYAT, M., ed. *Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis*. 1. Netherlands: Springer Netherlands, 2008. ISBN 978-1-4020-8368-6.
- [28] WIESER, Verena, Inge GAUGG, Martina FLEISCHER et al. BRCA1/2 and TP53 mutation status associates with PD-1 and PD-L1 expression in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2018, **25**(9), 17501-17511. DOI: 10.18632/oncotarget.24770. Dostupné také z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/24770>
- [29] DOLAN, Dawn a Shilpa GUPTA. PD-1 Pathway Inhibitors: Changing the Landscape of Cancer Immunotherapy. *Cancer Control*. 2014, **21**(3), 231-237. DOI: 10.1177/107327481402100308. ISSN 1073-2748. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/107327481402100308>
- [30] LOWTHER, Daniel E., Brittany A. GOODS, Liliana E. LUCCA et al. PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. *JCI Insight*. 2016, **5**(1), 1-15. DOI: 10.1172/jci.insight.85935. Dostupné také z: <https://insight.jci.org/articles/view/85935>
- [31] WANG, Wei, Ge SHEN, Shikai WU et al. PD-1 mRNA expression in peripheral blood cells and its modulation characteristics in cancer patients.

*Oncotarget*. 2017, 8(31), 50782-50791. DOI: 10.18632/oncotarget.15006. ISSN 1949-2553. Dostupné také z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/15006>

- [32] LAFLEUR, Martin, Yuki MUROYAMA, Charles DRAKE a Arlene SHARPE. Inhibitors of the PD-1 Pathway in Tumor Therapy. *J Immunol*. 2018, 2(200), 375–383. DOI: 10.4049/jimmunol.1701044. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1701044>
- [33] MACKIEWICZ, Jacek a Andrzej MACKIEWICZ. Programmed cell death 1 checkpoint inhibitors in the treatment of patients with advanced melanoma. *Współczesna Onkologia*. 2017, 1(21), 1-5. DOI: 10.5114/wo.2017.66651. ISSN 1428-2526. Dostupné také z: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/wo.2017.66651>
- [34] ACHKAR, Tala a Ahmad A. TARHINI. *The use of immunotherapy in the treatment of melanoma*. 2017, 10(1), 1-9. DOI: 10.1186/s13045-017-0458-3. ISSN 1756-8722. Dostupné také z: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0458-3>
- [35] PETERS, Solange, Keith M KERR a Rolf STAHEL. PD-1 blockade in advanced NSCLC: A focus on pembrolizumab. *Cancer Treatment Reviews*. 2018, 62(39), 39-49. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.10.002. ISSN 03057372. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737217301585>
- [36] SHINDIAPINA, Polina a Lapo ALINARI. Pembrolizumab and its role in relapsed/refractory classical Hodgkin's lymphoma: evidence to date and clinical utility. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2018, 9(4), 89-105. DOI: 10.1177/2040620718761777. ISSN 2040-6207. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2040620718761777>

- [37] MOSKOVITZ, Jessica, Jennifer MOY a Robert L. FERRIS.  
Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Current Oncology Reports*. 2018, **20**(2), 1-7. DOI: 10.1007/s11912-018-0654-5. ISSN 1523-3790. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11912-018-0654-5>
- [38] WIDIMSKÝ, J., T. ZELINKA a O. PETRÁK. Feochromocytom: diagnostika a léčba. *ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH*. 2009, **8**(148), 365–369.
- [39] ZHANG, Wei, Jie-Fei BAI, Meng-Xuan ZUO et al. PD-1 expression on the surface of peripheral blood CD4 T cell and its association with the prognosis of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Medicine*. 2016, **11**(5), 3077–3084. DOI: 10.1002/cam4.874. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cam4.874>
- [40] MACFARLANE, A., M. JILLAB, E. PLIMACK et al. PD-1 Expression on Peripheral Blood Cells Increases with Stage in Renal Cell Carcinoma Patients and Is Rapidly Reduced after Surgical Tumor Resection. *Cancer Immunol Res*. 2014, **4**(2), 320–331. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0133. Dostupné také z: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-13-0133>

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Metabolismus katecholaminů zjednodušeně [3] .....	16
Obrázek 2 Mechanismus destrukce nádorové buňky NK buňkou [14].....	21
Obrázek 3 Expze inhibičních kontrolních bodů na nádorové a imunitní buňce [19].....	25
Obrázek 4 Mechanismy regulace PD-L1 v nádorových buňkách [12] .....	27
Obrázek 5 Princip TaqMan eseje [26] .....	43
Obrázek 6 Průběh kvantitativní PCR v reálném čase [25, vlastní zdroj] .....	44
Obrázek 7 Porovnání expze PD-1 [vlastní zdroj] .....	48
Obrázek 8 Porovnání expze PD-1 (detail kontrolních vzorků) [vlastní zdroj] .	48

## 11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Změřené a vypočtené hodnoty genové exprese [vlastní zdroj] .....	46
--	----