

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Radek Jakša

Myší modely lidských lymfomů pro experimentální imunoterapeutické postupy

Patient-derived xenograft models of human lymphomas for experimental immunotherapy

Disertační práce

Ph.D. thesis

Školitel: Prof. MUDr. Pavel Klener, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval veškeré použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 28.10.2022

MUDr. Radek Jakša

podpis:

Identifikační záznam

JAKŠA, Radek. *Myší modely lidských lymfomů pro experimentální imunoterapeutické postupy*
[Patient-derived xenograft models of human lymphomas for experimental immunotherapy].

Praha 2022. Počet stran 106, počet příloh 2. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1.

lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie. Vedoucí závěrečné práce / školitel: prof. MUDr.

Pavel Klener, Ph.D.

Poděkování

Děkuji tímto svému školiteli prof. MUDr. Pavlu Klenerovi, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost během dlouhých roků studia a prof. MUDr. Pavlu Dundrovi, Ph.D., přednostovi Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze, především za poskytnutí materiálního zázemí nezbytného k uskutečnění této práce.

Obsah

Prohlášení	2
Identifikační záznam	3
Poděkování	4
Seznam zkratk	7
1. Úvod	10
1.2. Myší modely lidských lymfomů	11
1.2.1. Syngenní a xenotransplantované myší modely	12
1.2.2. Geneticky modifikované myší modely	14
1.3. Lymfomy a nádorové mikroprostředí.	15
1.3.1. Jednotlivé složky TME.....	16
1.3.1.1. T lymfocyty	16
1.3.1.2. NK buňky	17
1.3.1.3. Makrofágy	17
1.3.1.4. Neutrofilní granulocyty	18
1.3.1.5. Žírné buňky	18
1.3.1.6. Dendritické buňky	19
1.3.1.7. Myeloidní supresorové buňky	19
1.3.1.8. Stromální buňky, extracelulární matrix.....	19
1.3.1.9. Nádorová neovaskularizace, endotelové buňky	23
1.3.2 Nádorem navozená imunosuprese a možnosti jejího překonání pomocí imunoterapeutických postupů	25
1.3.2.1. Check-point inhibitory	25
1.3.2.2. Bispecifické protilátky (BiTEs, bispecific T-cell engagers)	26
1.3.2.3. Geneticky modifikované T-lymfocyty nesoucí tzv. chimerický antigenní receptor (chimeric antigen receptor, CAR)	26
2. Cíle a hypotézy	28
3.1. Odběr nádorové tkáně	30
3.3. Celoxomové sekvenování (whole exome sequencing, WES)	32
3.4. Histopatologické vyšetření	33
3.5 Vyšetření mikrovaskulární denzity (MVD)	36
3.6 Ultrazvukové vyšetření vaskularity	39
4. Výsledky.....	40
4.1. Charakterizace PDX modelů	40

4.2. Genetická analýza genomu primárních lidských lymfomových buněk a z nich odvozených PDX myších modelů	40
4.3. Histopatologické porovnání PDX modelů a primárních nádorů	57
4.4. Vyšetření parametrů neovaskularizace (MVA a MVD).....	71
4.4. Přímé srovnání dynamického monitorování vaskularizace PDX modelů agresivních lymfomů v průběhu jejich růstu pomocí ultrazvuku a pomocí histologie.....	74
5. Diskuse	76
6. Shrnutí	81
7. Summary	82
8. Reference.....	83
9. Seznam publikací	97
10. Přílohy	102

Seznam zkratek

AITL	angioimunoblastický T lymfom (angioimmunoblastic T-cell lymphoma)
ALCL	anaplastický velkobuněčný T lymfom (anaplastic large cell lymphoma)
ALK	kináza anaplastického velkobuněčného lymfomu (anaplastic lymphoma kinase)
ALL	akutní lymfoblastická leukémie (acute lymphoblastic leukemia)
BAFF	B lymfocyty aktivující faktor (B-cell activating factor)
BCL-2	anti-apoptotický protein (B-cell lymphoma protein) 2
BiTes	bispecifické T-lymfocytární protilátky (BiTEs, bispecific T-cell engagers)
BL	Burkittův lymfom (Burkitt lymphoma)
B-NHL	B nehodgkinský lymfom
CAF	s nádorem asociované fibroblasty (cancer-associated fibroblasts)
CAR-T	chimérické antigenní receptorové T lymfocyty (chimeric antigen receptor T-cells)
CD	povrchový znak CD (cluster of differentiation)
CDX	xenotransplantát odvozený od buněčné linie (cell line-derived xenograft)
CLL	chronická lymfatická leukémie (chronic lymphocytic leukemia)
CNV	variabilita počtu kopií (copy number variation)
CTCL	kožní T lymfom (cutaneous T-cell lymphoma)
DLBCL	difúzní velkobuněčný B lymfom (diffuse large B-cell lymphoma)
EBER	malé ribonukleové kyseliny kódované EBV (Ebstein-Barr virus-encoded small RNA's)
EBV	virus Ebstein-Baarové
ECM	mimobuněčná hmota (extracellular matrix)
FACS	průtoková cytometrie (fluorescent activated cell sorting)
FDC	folikulární dendritické buňky (follicular dendritic cells)
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
FL	folikulární lymfom (follicular lymphoma)
GEMM	geneticky modifikované myší modely (genetically engineered mouse models)
HIF	hypoxií indukovaný faktor (hypoxia-induced factor)

HLA	hlavní histokompatibilní komplex (human leucocyte antigen)
HTLV-1	lidský T lymfotropický virus typ 1 (human T-lymphotropic virus type 1)
IHC	imunohistochemie
IL	interleukin
Ig	imunoglobulin
KIR	Ig podobný receptor NK buněk (killer-cell immunoglobulin-like receptors)
MCL	lymfom z pláštěvých buněk (mantle cell lymphoma)
M-	monocytům podobné myeloidní supresorické buňky (monocytic myeloid-derived suppressor
MDSC	cells)
MF	mycosis fungoides
MVA	mikrovaskulární area
MVD	mikrovaskulární denzita
N/U	nově nedetekované (newly undetected)
N/D	nově detekované (newly detected)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NSG myš	imunodeficitní myš (NOD scid gamma mouse)
OTX	tumory vzniklé xenotransplantací nádor. buněk do omenta (omental tumor xenografts)
PDGF	destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)
PD-L1	ligand proteinu programované smrti (programmed death-ligand)
PDX	xenotransplantát odvozený od pacienta (patient-derived xenograft)
PMN-	polymorfonukleárům podobné myeloidní supresorické buňky (monocytic myeloid-derived
MDSC	suppressor cells)
PTCL,	periferní T lymfom, blíže nespecifikovaný (peripheral T-cell lymphoma, not otherwise
-NOS	specified)
R-ESHAP	rituximab-etoposid, solu-medrol methylprednisolon, vysokodávkový cytarabin, platinol
R-GIFOX	rituximab-gemcitabin, ifosfamid, oxaliplatin
R-CHOP	rituximab- cyklofosfamid, hydroxydaunorubicin, vinkristin, prednison

SZ	Sézaryho syndrom
T/NK-NHL	T/NK nehodkinský lymfom
TAM	s nádorem asociované makrofágy (tumor-associated macrophages)
TAN	s nádorem asociované neutrofilly (tumor-associated neutrophils)
TGF	nádorový růstový faktor (tumor growth factor)
Th	pomocný T lymfocyt (T-helper)
TME	nádorové mikroprostředí (tumor microenvironment)
TNF	tumor nekrotizující faktor
Treg	T-regulační lymfocyt
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR	receptor vaskulárního endotelového faktoru (vascular endothelial growth factor receptor)
WES	celoexomové sekvenování (whole exome sequencing)

1. Úvod

Nehodgkinské lymfomy (non-Hodgkin lymphomas, NHL) představují nejčastější hematologická maligní onemocnění a asi 3 % z celkového spektra nádorových onemocnění (Thandra et al., 2021). Jedná se o širokou a z hlediska morfologie, biologie, terapeutických možností a prognózy značně heterogenní skupinu zahrnující dle současné klasifikace (WHO 2022) několik desítek nosologických jednotek, respektive více než 100 jednotek a podjednotek (Alaggio et al., 2022). Ačkoliv se jedná o v různé míře chemosenzitivní malignity, část pacientů dříve či později prodělá návrat choroby (relaps), vyvine rezistenci na léčbu a onemocnění nakonec podlehne. Dle patogeneze lze NHL stručně rozdělit na prekursorové (lymfoblastické) lymfomy vznikající maligní transformací hematopoetické kmenové buňky a periferní (zralé) lymfomy vznikající maligní transformací periferních lymfocytárních klonů v průběhu jejich komplexního vývoje od stadia pre-lymfocytů po stádium imunokompetentních buněk. Z hlediska imunofenotypu dělíme lymfomy na B a T/NK NHL a dle biologického chování na lymfomy nízké maligní (indolentní, „low grade“) a vysoce maligní (agresivní, „high grade“). Současná, již 5. verze WHO klasifikace lymfoidních malignit klade čím dál větší důraz na dělení lymfomů podle molekulárně/cytogenetických aberací.

Vznik lymfomů je spojen s poruchami regulace apoptózy a buněčného cyklu, většinou z důvodu chromozomálních aberací, které způsobí transpozici onkogenů před zesilovače transkripce imunoglobulinových genů [např. translokace t(8;14), t(14;18) či t(11;14) vedoucí ke zvýšené expresi onkogenů *MYC*, *BCL-2*, resp. *cyklin DI*] či v důsledku mutací v širokém spektru signálních drah (např. *MYC*, *MYD88*, *CD79B*). Vedle těchto mechanismů hraje v biologii maligních nádorů včetně lymfomů významnou roli vliv nádorové mikroprostředí ovlivňující přežití nádorových buněk, jejich proliferaci a diseminaci a mechanismy úniku před imunitním dozorem hostitele. Vedle klasických forem léčby (kombinovaná chemoterapie, radioterapie, transplantace krvetvorných buněk), které vedou k frakcionované likvidaci

nádorových buněk, se čím dál tím více uplatňují metody cílené léčby a v poslední dekádě zejména různé formy imunoterapie, z nichž mnohé jsou zaměřeny právě na faktory mikroprostředí a které mohou nádor eradikovat totálně. Řada cílených léků a imunoterapeutik se úspěšně včlenila do standardních algoritmů léčby pacientů s lymfomy včetně tyrozin-kinázových inhibitorů (ibrutinib, acalabrutinib, idelalisib, copanlisib), proapoptotických látek (venetoclax), anti-CD20 protilátek (rituximab, ofatumumab, obinutuzumab), bispecifických protilátek (mosunetuzumab, glofitamab, epcoritamab), imunomodulačních léků (lenalidomid), check-point inhibitorů (pembrolizumab, nivolumab) či geneticky modifikovaných T-lymfocytů nesoucích tzv. chimerický antigenní receptor (CAR T-cells, např. tisagenlecleucel, axicabtagene ciloleucel nebo brexucabtagene autoleucel). Řada dalších kandidátních molekul se v současné době testuje v rámci četných klinických studií (<https://clinicaltrials.gov/>). Další zlepšení prognózy relabujících / rezistentních NHL je možné pouze díky zavádění nových, účinnějších a méně toxických léčiv a léčebných postupů (Stadlbauer et al., 2022; Takheaw et al., 2021). V rámci preklinické fáze výzkumu jsou nové kandidátní molekuly obvykle testovány také *in vivo* na zvířatech, nejčastěji na myších modelech.

1.2. Myší modely lidských lymfomů

Využití myších modelů v preklinickém studiu patogeneze nádorových onemocnění má nezastupitelnou roli. Lze využít syngenních myších modelů, u nichž se myší nádorové buňky transplantují do geneticky identických (syngenních) myší (Noble & Mishra, 2019). Výhodou syngenních myších modelů je přítomnost imunitních buněk hostitele (myši), které nejsou z podstaty věci schopny rozpoznat geneticky identické myší nádorové buňky jako cizí, což umožňuje vlastní přihojení (tzv. engraftment), růst a šíření myšího nádoru v syngenním myším organismu. Nevýhodou zůstává zejména fakt, že se v tomto případě jedná o myši, nikoli lidskou malignitu, se všemi možnými důsledky. Patrně nejčastěji používané myší modely v hematologii hojně využívané pro preklinickou validaci experimentální léčebných

postupů a studium různých aspektů biologie hematologických malignit představují tzv. myší modely lidských lymfomů (tzv. *patient-derived lymphoma xenografts*), které se odvozují pomocí xenotransplantace lidských lymfomových buněk do imunodeficientních myší.

1.2.1. Syngenní a xenotransplantované myší modely

Mezi nejčastěji používané syngenní linie patří EL4, A20, H11, BL3750, and S49, jež byly odvozeny od spontánně vzniklých tumorů. Tyto modely patří k nejstarším zvířecím modelům vůbec, jejich přirozená nevýhoda spočívá v problematické aplikovatelnosti poznatků získaných studiem zvířecích nádorů na lidský organismus a omezené spektrum dostupných typů nádorů, proto je jejich současný význam omezený.

V případě xenotransplantace lidských lymfomových linií (*cell line-derived xenografts*, CDX) či primárních lymfomových buněk (tj. buněk získaných přímo od pacienta, PDX) dochází k engraftmentu, růstu a šíření lidského lymfomu v myším imunodeficientním myším kmeni, např. NSGTM (non-obese diabetic [NOD] severe combined immunodeficient [SCID] gamma, např. NOD.Cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ, Jax[®] mice, the Jackson Laboratory, USA, <https://www.jax.org/>). V současné době jsou dostupné desítky komerčně dostupných lymfomových linií v buněčných bankách, např. DSZM (*Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen*) nebo ATCC (*American Tissue Culture Collection*). Výhodou využití CDX je jejich vyšší schopnost „přihojení“ (engraftment), relativně nízké náklady, avšak na rozdíl od buněčné populace získané přímo od pacienta mohou v důsledku selekčního tlaku po desítkách, stovkách či tisících *in vitro* pasáží a vlivu mikroprostředí hostitele vyvinout změny fenotypu, které se u primárního nádorového procesu nevyskytovaly. Tato pravděpodobnost se zvyšuje úměrně s dobou, kterou lymfomové linie strávily v buněčné kultuře (Day et al., 2015), získané poznatky pak mohou být zavádějící. Přesto jsou tyto modely

(tj. panely lymfomových linií) velmi vhodné především pro iniciační screening účinku a toxicity nových léčiv.

PDX modely pracují s nádorovými buňkami získanými přímo od pacienta s nádorovým onemocněním, a tudíž se předpokládá, že přihojená lymfomová populace bude mít stejné morfologické a genetické vlastnosti. Nevýhodnou je skutečnost, že zdaleka ne ve všech případech dojde k úspěšnému přihojení, jedním z možných důvodů je právě absence vhodného mikroprostředí. Dalším z omezujících faktorů je typ nádorového onemocnění (např. nízké maligní lymfomy „engraftují“ hůře než vysoce maligní), způsob implantace nádorových buněk a jiné. Podobně jako v případě pasážování lymfomových linií, také sériový „re-engraftment“ (tj. „pasáž“ již úspěšně „engraftovaného“ PDX modelu z dárcovské myši do sekundárního zvířete může vyústit v selekční tlak s následným posunem genotypu (vznik nových mutací, ztráta driver mutací) či imunofenotypu nádorových buněk (změna exprese či intenzity exprese klíčových antigenů). Jak CDX, tak PDX tumory jsou tvořeny z části také nenádorovými komponentami myšního mikroprostředí (*tumor microenvironment*, TME), což kromě možného vlivu na úspěšnost „přihojení“ a na celkový fenotyp úspěšně engraftovaných buněk omezuje možnosti studia účinku léčiv cílících primárně na imunitní buňky (tj. většiny imunoterapeutických léčebných postupů). Modely tohoto typu jsou nicméně vhodné například pro testování chemoterapeutik a cílených léčiv (např. tyrozin-kinázových inhibitorů či proapoptotických látek). Možnost, jak omezit hlavní nevýhodu PDX modelů, tzn. především absenci lidských imunitních buněk, představuje použití tzv. „humanizovaných“ myších modelů s funkčními lidskými imunitními buňkami pomocí intravenózní (i.v.) injekce periferních mononukleárních buněk (tzv. *dočasná* humanizace) nebo pomocí xenotransplantace lidské krevetvorby (nejčastěji kmenových buněk z pupečnickové krve, tzv. *trvalá* humanizace) (Lai et al., 2017), respektive použití geneticky modifikovaných myší (Zullo et al., 2012).

1.2.2. Geneticky modifikované myší modely

Geneticky modifikované myší modely (*Genetically Engineered Mouse Models*, GEMM) jsou vhodné ke studiu genetických mechanismů onkogeneze. Využit lze jednak transgenní myši, kdy se do fertilizovaného myšího vejce vloží DNA konstrukt, přičemž potomci takového jedince vykazují požadovanou specifickou genetickou alteraci. U potomků těchto myši pak dochází ke spontánnímu vývoji příslušného lymfomu. Dalším mechanismem je „knockout“ alterace – do embrya myši je implantován gen s požadovanou mutací, poté se pomocí tzv. STOP kazety inhibuje jeho exprese. V požadovaném čase se provede inaktivace STOP kazety, což se projeví spuštěním exprese daného vloženého genu. „Vypnutí“ genu tak může být dočasné (podmíněné) nebo trvalé. Výhody transgenních modelů tkví ve skutečnosti, že spontánně se vyvíjející nádor „rekapituluje“ onkogenezi v přirozeném prostředí hostitele s intaktním TME a funkčním imunitním systémem, proto jsou vhodné ke studiu mimo jiné i imunoterapeutických postupů (Lemasson et al., 2021). Nevýhody transgenních myších modelů spočívají ve vysokých nákladech, časové náročnosti a skutečnosti, že je dostupné jen omezené množství myších modelů s konkrétním geneticky definovaným typem neoplazie zdaleka nepokrývající spektrum lidských nádorových onemocnění (Townsend et al., 2016).

Výše uvedený stručný přehled shrnuje typy dostupných zvířecích (myších) modelů použitelných v základním i translačním výzkumu nejen lidských lymfoproliferativních onemocnění a uvádí jejich hlavní výhody a nevýhody. Naprostá většina z dostupných publikovaných primárních prací popisujících použití myších modelů lidských lymfomů je zaměřena na studium vlastních nádorových buněk, zatímco práce cílené na mikroprostředí v myších modelech jsou jen nečetné (Burack et al., 2017; Herek & Cutucache, 2017; Lemasson et al., 2021).

1.3. Lymfomy a nádorové mikroprostředí.

Role nádorové mikroprostředí (TME) je v biologii lymfomů klíčová (Coupland, 2011; Gaulard & de Leval, 2014). TME zahrnuje jak extracelulární matrix, tak buněčnou komponentu, především imunitní buňky jako jsou lymfocyty, makrofágy, neutrofilny, dendritické buňky a myeloidní supresorové buňky, z neimunitních buněk pak endotelie, pericyty, fibroblasty a jiné (Junttila & de Sauvage, 2013). Extracelulární matrix tvoří několik typů kolagenů, laminy, proteoglykany a jiné, interakci mezi nádorovými buňkami a TME zprostředkovávají vedle přímého mezibuněčného kontaktu cytokiny, chemokiny, růstové faktory a další faktory. TME vytvářejí komplikovanou heterogenní a plastickou strukturu. Především imunitní buňky mají (mimo jiné) primárně protinádorovou funkci, současně však vykazují funkční plasticitu, to znamená, že mohou být nádorovými buňkami (lymfomovými nevyjímaje) přeprogramovány a TME je tak během progresu nádoru aktivně ovlivňováno ve smyslu podpory přežití, růstu a diseminace / metastázování nádorového procesu. „Editace“ či imunomodulace / imunosuprese imunitních mechanismů nádorovými buňkami vede k jejich úniku před imunitním „dozorem“ vedoucím k progresi, a nakonec k rezistenci na léčbu (Tarte, 2017). O důležitosti TME vypovídá např. mimo jiné fakt, že buňky např. chronické lymfatické leukémie (CLL) nebo folikulárního lymfomu (FL) se bez vlivu mikroprostředí jen obtížně kultivují in vitro, zatímco u difúzního velkobuněčného B lymfomu (DLBCL) je to podstatně snadnější. Význam nádorového mikroprostředí může být ilustrován na angioimunoblastickém T lymfomu (AITL), kde je charakter jeho TME jedním z určujících morfologických rysů a zdrojem výrazných klinických symptomů. Pochopení interakce nádoru (lymfomu) a jeho mikroprostředí vytyčuje pole pro studium nových terapeutických prostředků a strategií sloužících k posílení protinádorových imunitních mechanismů nebo naopak přerušení signálních drah vedoucích k rezistenci na léčbu (Bejarano et al., 2021). Scott (Scott & Gascoyne, 2014) klasifikuje lymfomy z hlediska jejich mikroprostředí do tří skupin, a to na lymfomy, které TME

přízpůsobují (reedukují) za účelem přežití a proliferace nádorové populace jako je např. folikulární lymfom, který si mikroprostředí přizpůsobuje i při diseminaci např. v kostní dřeni (Ame-Thomas & Tarte, 2014) dále na lymfomy „přeprogramovávající“ buňky TME (*recruitment*) jako je tomu např. u klasického Hodgkinova lymfomu a lymfomy „vyřazující“ faktory TME (*effacement*), čímž se stávají na mikroprostředí relativně nezávisly (Burkittův lymfom, lymfoblastické lymfomy, plazmablastický lymfom). Jiný způsob, jakým lze nahlížet na TME, uvádí Kline (Kline et al., 2020), který člení lymfomy z hlediska jejich TME na „zánětlivě infiltrované“ (*inflamed*) a „non-inflamované“, což se odráží mimo jiné v jejich odpovědi na terapii tzv. check point inhibitory (Menter et al., 2021).

1.3.1. Jednotlivé složky TME

1.3.1.1. T lymfocyty

T lymfocyty hrají klíčovou regulační a efektorovou roli v protinádorové imunitě. Zatímco role CD8⁺ T lymfocytů je jednoznačně protinádorová, role CD4⁺ T buněk v biologii maligních nádorů je komplikovanější. CD8⁺ T lymfocyty jsou hlavními efektorovými buňkami („zabíječi“), jež po rozpoznání antigenů prezentovaných nádorovými buňkami spolu s molekulami HLA I. třídy tyto likvidují uvolněním cytotoxických granul (perforiny, granzymy). Th1-CD4⁺ T lymfocyty prostřednictvím produkce cytokinů (INF γ , IL2 a další) stimulují antigen prezentující buňky (APC) a diferenciaci CD8⁺ T lymfocytů mající tak protinádorový efekt, Th2-CD4⁺ T lymfocyty naopak mohou sekrecí řady cytokinů vést k omezení proliferace a diferenciaci cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů a tím k pro-nádorovému účinku. Treg-CD4⁺ lymfocyty (CD4⁺, CD25⁻) exprimující FOXP3 vykazují imunosupresivní funkce cestou sekrece TGF β a IL10, čímž inhibují efektorové T lymfocyty a omezují jejich přímý kontakt s nádorovými elementy. Na myších modelech solidních nádorů bylo prokázáno, že „vyčerpání“ Treg-CD4⁺ T lymfocytů může vést k posílení protinádorové imunity a naopak,

vysoký počet Treg-CD4⁺ T lymfocytů u jiných typů nehematologických malignit je spojený s horší prognózou (Okita et al., 2005).

Th17-CD4⁺ T lymfocyty je podskupina pomocných (*helper*) T lymfocytů produkujících IL17, tyto mají opačný účinek než Treg-CD4⁺ T lymfocyty. Yang (Yang et al., 2009) zjistil, že nádorové B lymfocyty indukují vývoj Treg-CD4⁺ T lymfocytů, zatímco TH17-CD4⁺ T lymfocyty potlačuje.

1.3.1.2. NK buňky

Přírození zabíječi (*natural killers*, NK buňky) jsou cytotoxické lymfocyty představující hlavní efektorové buňky v antivirové a protinádorové imunitě. CD56⁺, CD16⁺ zralé cirkulující NK buňky představují většinu z populace přirozených zabíječů s přímým cytotoxickým efektem, CD56⁺, CD16⁻ NK buňky přebývají v kostní dřeni (Cozar et al., 2021). Fyziologicky je funkce NK buněk přísně regulována dynamickou rovnováhou mezi stimulačními a inhibičními receptory exprimovanými imunitními i neimunitními buňkami, některé nádorové buňky vazbou na supresorové receptory funkci NK buněk tlumí (Myers & Miller, 2021). Bylo prokázáno, že buňky chronické lymfatické leukémie (CLL) exprimující HLA-E se váží na receptor NK buněk NKG2A a tím je inhibují (McWilliams et al., 2016). Jiným příkladem jsou tzv. KIR receptory (*killer cell immunoglobulin-like receptor*), jež inhibují funkci NK buněk vazbou na HLA-C. Na blokádě inhibičních receptorů (a tím posílení protinádorové funkce NK buněk) je založen princip imunomodulační léčby (Lamb et al., 2021). Kohrt (Kohrt et al., 2014) ve své práci uvádí posílení protinádorového efektu NK buněk při terapii lirilumabem, monoklonální anti KIR protilátkou, v kombinaci s rituximabem.

1.3.1.3. Makrofágy

Podobně jako u CD4⁺ T lymfocytů mohou makrofágy působit jak protinádorově, tak pro-nádorově. Makrofágy přítomné v nádorové tkáni (TAM, *tumor-associated macrophages*) jsou

klasifikovány jednak jako typ M2-polarizované makrofágy, majícími pro-nádorový účinek ve smyslu podpory angiogeneze, proliferace a imunosuprese, a jako M1-makrofágy s účinkem protinádorovým, podporující Th1-CD4+T lymfocyty (Lin et al., 2019; Wang et al., 2019). Obecně makrofágy fungují jako antigen prezentující buňky. Asociace TAM s rezistencí na chemoterapeutickou léčbu bez kombinace s rituximabem byla popsána u klasického Hodgkinova lymfomu (Steidl et al., 2010) a DLBCL (Cai et al., 2012), zatímco přítomnost M1-makrofágů u případů léčených rituximabem usnadňovala fagocytózu rituximabem opsonizovaných nádorových B lymfocytů makrofágy in vitro (Leidi et al., 2009). Vedle toho, některé lymfomové buňky vykazují schopnost „upregulace“ povrchového antigenu CD47 pomocí kterého mohou unikat fagocytóze. Chao (Chao et al., 2010) ve své práci dokázal na preklinických modelech bloádou antigenu CD47 navodit vyšší protinádorovou aktivitu makrofágů exprimujících SIRP alfa inhibiční receptor, navíc potencovanou použitím kombinované anti-CD47 protilátky s rituximabem. Některé jiné studie prokázaly schopnost TAM inhibovat funkce efektorových T lymfocytů mechanismem exprese check-point inhibitoru PD-L1 a produkcí inhibičních cytokinů IL-10 a TGF β (Noy & Pollard, 2014).

1.3.1.4. Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty (TAN, s nádorem asociované neutrofilny) působí zpočátku protinádorově (typ N1) cestou sekrece INF β , avšak díky své plasticitě mohou u progredujících lymfomů získat pro-nádorový vliv (typ N2), například prostřednictvím inhibice T lymfocytů (Jaillon et al., 2020; Zhou et al., 2018). Vliv na polarizaci neutrofilů má pravděpodobně TGF β secernovaný lymfomovými buňkami (Giese et al., 2019).

1.3.1.5. Žírné buňky

Účast žírných buněk je spojena s angiogenezí u DLBCL (Marinaccio et al., 2014) a jiných typů lymfomů (Ribatti et al., 2003), koreluje s produkcí IL6, prozánětovým fenotypem a

autoimunitními poruchami u angioimunoblastického T-lymfomu (Tripodo et al., 2010). Zvýšený počet žírných buněk provází některé kožní T a B lymfomy a koreluje s progresí onemocnění a zvýšenou angiogenezí (Rabenhorst et al., 2012).

1.3.1.6. Dendritické buňky

Přítomnost dendritických buněk je vedle CD4⁺ T lymfocytů nezbytná pro přežití nádorových B lymfocytů u folikulárního lymfomu. Neoplastické B buňky produkují TNF vedoucí k diferenciaci folikulárních dendritických buněk (FDC) ze stromálních buněk cestou signalizace p55-TNF-R (Tjin et al., 2005). Navíc interakce TNF a lymfotoxinu LT α 1 β 2 je nezbytná pro vznik a udržení fungující sítě FDC či FDC-like sítí v extranodálních tkáních včetně kostní dřeně. FDC hrají také významnou roli v patogenezi T lymfomů vycházejících z folikulárních T-helper lymfocytů.

1.3.1.7. Myeloidní supresorové buňky

Myeloidní supresorové buňky (MDSC) vycházejí z nezralých myeloidních buněk a jsou fenotypově podobné buňkám polymorfonukleárním (PMN-MDSC) nebo monocytárním (M-MDCS). Mají především imunosupresivní účinek - podporují expanzi Treg-CD4⁺ T lymfocytů, inhibují efektorové T buňky sekrecí prostaglandinu E2, reaktivních forem kyslíku, arginázy1 a jiných (Tian et al., 2019; Zhou et al., 2018).

1.3.1.8. Stromální buňky, extracelulární matrix

Fibroblasty (tzv. *cancer associated fibroblasts*, CAF) jsou značně heterogenní a plastickou složkou TME, jež se liší u různých typů nádorových onemocnění. Jsou hlavním producentem extracelulární matrix (kolagen, lamininy, proteoglykany a jiné), progresi nádoru ovlivňují celou řadou více či méně známých mechanismů, především podporou angiogeneze, produkcí cytokinů a růstových faktorů a jiných (Ping et al., 2021; Sahai et al., 2020). Např. cestou „hedgehog“ signální dráhy mohou CAF pomáhat k navození odolnosti nádorových buněk vůči

spontánní či léky navozené apoptóze (Lindemann, 2008). Dierks zjistil, že ligandy produkované stromálními buňkami ve slezině a lymfatických uzlinách působí jako protektivní faktory lymfomových buněk u zvířecích modelů (Dierks et al., 2007). U některých solidních nádorů byl prokázán aktivní imunoregulační vliv fibroblastů (CAF-S1) cestou stimulace Treg-CD4⁺ T lymfocytů a makrofágů (Cohen et al., 2017; Comito et al., 2014; Gok Yavuz et al., 2019). Singh (Singh et al., 2010) prokázal autokrinní smyčku mezi difúzním velkobuněčným B lymfomem a nodálními (uzlinovými) stromálními buňkami produkujícími „hedgehog“ proteiny. Inhibice signalizace může vést k zástavě růstu nebo apoptóze cestou downregulace proteinu BCL-2.

U nádorů spojených s výraznou dezmozplazií vede remodelace ECM k omezení přístupu léčivých látek a imunitních buněk do nádoru. Joyce (Joyce & Fearon, 2015) uvádí mechanické omezení přístupu T lymfocytů v extracelulární matrix remodelované s nádorem asociovanými fibroblasty (CAF). Předmětem zájmu jsou proto nejen CAF samotné (Chen & Song, 2019) ale také degradační enzymy zaměřené na proteiny ECM, jež by bylo možné použít v cílené léčbě (Negaard et al., 2009)

Většina poznatků týkajících se role TME v biologii lymfoproliferativních onemocnění vychází z výzkumu B ne Hodgkinských lymfomů, faktory mikroprostředí u T ne Hodgkinských lymfomů jsou vzhledem k jejich podstatně nižší incidenci a větší plasticitě prostudovány méně (Gaulard & de Leval, 2014).

T/NK ne Hodgkinské lymfomy tvoří méně než 15 % NHL, častější výskyt ve východní Asii a centrální a jižní Africe souvisí s infekcemi viry Epstein-Baarové a lidským T lymfotropickým virem (HTLV-1). Celkově jde o onemocnění se špatnou prognózou. T-lymfomy mají tendenci k predilekčnímu výskytu v určitých orgánech (intestinální T lymfomy, hepatosplenický gama-

delta lymfom, kožní lymfomy-CTCL), což naznačuje možný vliv specifických faktorů mikroprostředí.

Role TME je v současné době asi nejlépe prostudována u angioimunoblastického T lymfomu (AITL), především proto, že (mimo primární kožní T lymfomy), patří k nejčastěji se vyskytujícím a také z toho důvodu, že jeho mikroprostředí se podílí na výrazných morfologických rysech a klinické symptomatologii (generalizovaná lymfadenopatie, zvýšená teplota, pokles tělesné hmotnosti, laboratorně anémie, hypogamaglobulinémie, hypereozinofilie, lymfopenie, vzácně lymfocytóza, přítomnost řady autoprotilátok atd.).

Pro AITL je charakteristická účast vysokého počtu nenádorových imunitních buněk, jako jsou CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty, folikulární dendritické buňky, aktivované a často virem EBV infikované B lymfocyty, eozinofily a makrofágy. Mobilizace buněk je indukována sekrecí chemokinů CXCL13, interleukinu IL21 a dalších cytokinů nádorovými lymfocyty, tyto cytokiny jsou odpovědné i za paraneoplastické projevy AITL provázející. Stimulované B lymfocyty produkují lymfotoxin β , což vede ke stimulaci a proliferaci folikulárních dendritických buněk (FDC). Sekrece VEGF nádorovými i endotelovými buňkami vede ke stimulaci neovaskularizace a mobilizaci mastocytů (Zhao et al., 2004). Častá je přítomnost eozinofilů pod vlivem sekrece IL13 a IL5 a IL4. V důsledku produkce řady cytokinů často nacházíme u pacientů s AITL hyperplazii kostní dřeně s eozinofilií, proliferací makrofágů a žírných buněk. Deplece Treg-CD4⁺ T lymfocytů, a naopak zvýšený počet Th17-CD4⁺ T lymfocytů spolu s M2 makrofágy přispívají k prozánětlivému a imunosupresivnímu efektu (Bruneau et al., 2010). Molekulárním profilováním bylo zjištěno, že v genové expresní signatuře AITL jsou overexprimovány geny zapojené do regulace proliferace B lymfocytů a FDC buněk (imunoglobuliny, clusteriny), exprese cytokinových a chemokinových receptorů (IL4, CCL19,22 a jiné), extracelulární matrix (matrixové metaloproteinázy, kolageny) a faktorů regulujících neoangiogenezi jako jsou angiopeptin, trombospondin, VEGF a další (de Leval et

al., 2007). Všechny tyto faktory představují potenciální biomarkery pro cílenou terapii. Kwon (Kim et al., 2020) prokázal souvislost exprese PD-1 nádorovými buňkami, respektive PD-L1 jak nádorovými, tak imunitními buňkami, s horší prognózou pacientů s AITL, což otevírá možnost cílené léčby tzv. check-point inhibitory. Podobně je tomu u periferního T lymfomu nespecifikovaného (PTCL, NOS) (Sugio et al., 2018). Podobné mechanismy působení mikroprostředí jako byly popsány u AITL se patrně uplatňují i u dalších T lymfomů s imunofenotypem folikulárních Th buněk (Menter et al., 2021).

Z dalších typů T lymfomů můžeme jmenovat mycosis fungoides (MF) a Sézaryho syndrom (SZ), u kterých bylo studiiemi *in vitro* zjištěno, že v souvislosti s progresí onemocnění mohou nádorové T lymfocyty měnit charakter reaktivních CD4+T lymfocytů z Th1 (protinádorových) na Th2 (pro-nádorové) (Guenova et al., 2014), navíc nádorové buňky MF a SZ mohou produkovat řadu molekul s imunosupresivním účinkem usnadňujícím diseminaci (Wong et al., 2011).

Uvedený výčet není zdaleka vyčerpávajícím přehledem faktorů mikroprostředí ovlivňujících biologii maligních lymfomů a jež představují předmět zájmu pro potenciální cílenou imunoterapii. V tabulce č. 1 je uveden stručný přehled funkce vybraných buněk TME a jejich prognostický význam u některých B lymfomů.

Tabulka č. 1. Funkce vybraných buněk nádorového mikroprostředí u některých typů B lymfomů, upraveno podle Liu Y (Liu et al., 2021).

Buňka TME	Povrchové znaky	Převažující role	Prognostický význam u některých B lymfomů
TAM-M1	CD68+, CD80+, CD86+	Proti-nádorová	DLBCL: M2 koreluje s horší prognózou HL: CD68+ TAM koreluje s horší prognózou FL: vysoký počet CD68+ TAM koreluje s delším přežitím na terapii R-CHOP
TAM-M2	CD163+,CD204+, CD206+	Pro-nádorová	
PMN-MDSC	CD11b+,CD14-,CD15+, CD66+	Pro-nádorová	DLBCL: M-MDSC koreluje s horší prognózou HL: PMN-MDSC koreluje s horší prognózou FL: neznámý
M-MDSC	Lin-,CD11b+,CD14+, HLA-DRlow		
TAN-N1	CD16+,Cd66b+, CD170low	protinádorová	DLBCL: přítomnost TAN koreluje s horší prognózou HL: vysoký počet neutrofilů koreluje s horší prognózou u klasického HL FL: neznámý
TAN-N2	CD66b+,CD11b+, CD170 high	Pro-nádorová	
NK buňky – kostní dřeň	CD56high, CD16-	Protinádorová	DLBCL: nižší počet NK buněk spojen s kratšími intervaly mezi relapsem nádorového onemocnění HL. neznámý FL: nižší počet NK buněk v periferní krvi spojen s kratšími intervaly mezi relapsem nádorového onemocnění a kratším celkovým přežitím
NK buňky prefer. krev	CD56low, CD16+		
CAF	SMA, FAP+,CD10+, S100A4+	Pro-nádorová	DLBCL. CAF spojeny s příznivou prognózou HL: CAF zodpovědné za ochranu nádorových buněk při brentuximab-vedotin kombinované léčbě FL: korelace se špatnou prognózou
DC-plazmocytoidní	CD13+,CD303+, CD304+	Pro-nádorový	DLBCL: korelace s delším přežitím HL: neznámý FL: korelace s horší prognózou
DC-myeloidní	CD1c+, CD141+		

TAM-tumor asociovaný makrofág, PM-MDSC – polymorfonukleárům podobné myeloidní supresorové buňky, M-MDCS – monocytům podobné myeloidní supresorové buňky, TAN – tumor asociovaný neutrofil, NK – přirozený zabíječ, CAF – s nádorem asociovaný fibroblast, DC – dendritická buňka, SMA – hladkosvalový aktin, FAP – s fibroblasty asociovaný protein, DLBCL – difúzní velkobuněčný B lymfom, HL – Hodgkinův lymfom, FL – folikulární lymfom

1.3.1.9. Nádorová neovaskularizace, endotelové buňky

Růst nádoru je spojen s tvorbou nových cév (neovaskularizace) zabezpečujících jeho výživu poté, co již nestačí prostá difúze, vaskularizace nádoru (a tím daná úroveň oxygenace) je jedním

z parametrů určujících agresivitu nádorového procesu a také jedním z mechanismů ovlivňujících rezistenci na léčbu. Spouštěcími mechanismy neovaskularizace jsou hypoxie, produkce růstových faktorů a cytokinů, především PDGF (*platelet derived growth factor*), bFGF (*basic fibroblastic growth factor*) a jiné. Fyziologický proces angiogeneze je přísně regulovaný pro-angiogenními a anti-angiogenními regulačními mechanismy, jež jsou u nádorové angiogeneze narušeny. Nádorová neovaskularizace probíhá především mechanismem angiogeneze, tzn. nové cévy vznikají z již preexistujících, včetně alternativních způsobů jako jsou tvorba mozaikových cévy, koopce cév, vaskulogenní mimikry a intususcepce (Dome et al., 2007), do procesu jsou zapojeny signální dráhy VEGF/VEGFR, dráha PI3K/AKT/mTOR a jiné. Pro nádorové cévy je charakteristické jejich chaotické uspořádání, abnormální morfologická stavba a absence hierarchie. Cévní abnormity vedou k častým trombózám s následnou ischemií až nekrózou, tkáňová hypoxie způsobená ischemií stimuluje další angiogenezi, a navíc přispívá k polarizaci makrofágů, mobilizaci a aktivaci Treg-CD4+ T lymfocytů, myeloidních prekurzorových kmenových buněk (MPSC) a downregulaci NK buněk (Chiu et al., 2017). Produkce HIF-1 (*hypoxia induced factor*) nádorovými buňkami vede k vyšší odolnosti vůči hypoxii (Yu et al., 2009). Vzhledem k vyšší permeabilitě nádorových cév a současné produkci růstových faktorů je proces nádorové angiogeneze dále podporován. Tkáňová hypoxie vede mimo jiné i k produkci oxidu dusnatého (NO) endotelovými buňkami, což se projevuje inhibicí exprese adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 a tím pádem k omezení kontaktu endotelu s leukocyty (Takahashi et al., 1996), výsledným efektem je tak snížením počtu tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) u solidních nádorů (Buckanovich et al., 2008).

Mechanismy nádorové angiogeneze jsou nejlépe prostudovány u solidních nádorů, u lymfomů jsou poznatky z této oblasti skromnější. Mimo jiné byla prokázána korelace hladin VGFA a agresivitou lymfomu - vyšší hladina u agresivních lymfomů, nižší u lymfomů indolentních

(Salven et al., 2000; Stewart et al., 2002) - a zvýšení hladiny VGFA u transformujících se lymfomů (Kuramoto et al., 2002). Zvýšenou expresi VEGFR-1 a VEGFR-2 u akutní lymfoblastické leukémie (ALL) prokázal Dias (Dias et al., 2001).

Nádorové endotelové buňky (*tumor associated endothelial cells*, TEC) mohou být současně přeprogramovány a působit tak imunosupresivně ve prospěch nádoru (Blonska et al., 2015). TEC zvyšují přežívání nádorových B lymfocytů pomocí faktoru BAFF (B lymfocyty aktivující faktor (B-cell activating factor) (Cols et al., 2012) nebo díky upregulaci proteinů PD-L1 a PD-L2 (díky inhibici cytotoxických lymfocytů, Apollonio et al., 2021). Bylo prokázáno, že úroveň vaskularizace určená parametrem MVD (mikrovaskulární denzita) negativně koreluje s celkovým přežitím u pacientů s lymfomem z plášťových buněk (Vesela et al., 2014). Nádorové endotelie tak představují vhodný cíl pro cílenou antiangiogenní terapii.

1.3.2 Nádorem navozená imunosuprese a možnosti jejího překonání pomocí imunoterapeutických postupů

Pokrok ve výzkumu zaměřeného na odhalení mechanismů, jaké faktory nádorového mikroprostředí pozitivně ovlivňují přežití, progresi a rezistence maligních nádorů se odrazila ve vývoji nových imunoterapeutických a imunomodulačních prostředků cílících na některé struktury či signální dráhy zodpovědné za potlačení přirozených protinádorových funkcí imunitních buněk (Vinay et al., 2015).

1.3.2.1. Check-point inhibitory

Jednou z možností odblokování nádorem potlačené imunity jsou tzv. imunitní check-point inhibitory (*immune check-point inhibitors*). Jedná se o monoklonální protilátky cílící na povrchové molekuly na nádorových buňkách a/nebo na T-lymfocytech. V naprosté většině případů jsou check-point inhibitory namířené proti inhibičním receptorům exprimovaným na nádorových buňkách, které tímto způsobem účinně brání rozvoji protinádorové imunity.

Inhibicí inhibice dochází k reaktivaci buněčné protinádorové imunity založené na T-lymfocytech a rozvoji protinádorové odpovědi. Typickým příkladem jsou check-point inhibitory namířené na signální dráhu PD-1 / PD-L1 (*programmed death receptor / ligand*), mezi které patří pembrolizumab, nivolumab či pidilizumab. Vedle terapie řady solidních nádorů se tyto uplatňují v léčbě některých B lymfomů jako např. difúzní velkobuněčný B lymfom (Chen et al., 2019) a jiné. Zvýšení účinku check-point inhibitorů u některých refrakterních lymfomů může být dosaženo použitím v kombinaci s anti-CD20 protilátkou (Pascual et al., 2019).

1.3.2.2. Bispecifické protilátky (BiTEs, bispecific T-cell engagers)

Další možností reaktivity protinádorové imunity představují tzv. bispecifické protilátky (Smits & Sentman, 2016). Jedná se o biologická léčiva připravená rekombinantní technologií. Bispecifické protilátky jsou v naprosté většině případů zacílené jedním ramenem na antigen exprimovaný na povrchu nádorových buněk a druhým ramenem na CD3 molekulu exprimovanou na povrchu T-lymfocytů. Dochází tak k přitažení T-lymfocytu do blízkosti nádorové buňky, jeho následné aktivaci a cytotoxické reakci vůči nádorové tkáni. Bispecifická protilátka mosunetuzumab (anti-CD3, anti-CD20) byla schválena k léčbě relabovaných forem folikulárního lymfomu (Kang, 2022). Řada bispecifických protilátek (glofitaimab, epcoritamab) se testuje u dalších typů lymfomů.

1.3.2.3. Geneticky modifikované T-lymfocyty nesoucí tzv. chimerický antigenní receptor (chimeric antigen receptor, CAR)

Převratnou novinkou v léčbě lymfomů jsou tzv. CAR T-lymfocyty nesoucí chimerický antigenní receptor, nejčastěji proti znaku CD19 exprimovaném na povrchu lymfomových buněk. Jedná se o adoptivní buněčnou imunoterapii založenou na genetické úpravě T-lymfocytů získaných od pacienta. Po *ex vivo* genetické manipulaci a expanzi jsou CAR T-lymfocyty

následně podány formou intravenózní infúze zpět pacientovi. CAR T-lymfocyty cíleně likvidují CD19+ lymfomové buňky bez nutnosti prezentace antigenu a kostimulace. V současné době se CAR19 T-lymfocyty používají v léčbě DLBCL (Catala et al., 2022) a MCL (Chen et al., 2022) (Ranganathan et al., 2021; Ren et al., 2022) Tabulka č. 2 uvádí přehled některých imunoterapeutických prostředků cílených na faktory mikroprostředí lymfomů zkoušených v klinické fázi.

Tabulka č. 2. Výčet některých imunoterapeutických prostředků cílených na faktory mikroprostředí lymfomů zkoušených v klinické fázi. Upraveno podle Liu (Liu et al., 2021).

Cílová TME buňka	Cílová struktura	Název léčiva	použití
TAM	SIRPa	TTI-622	Refrakterní lymfomy, refrakterní myelom, nově dg. AML
	SIRPa	GS-0189	Refrakterní NHL
	CD47	Hu5F9-G4	Refrakterní NHL
MDSC	PI3K ^δ	Tenalisib (P65300)	Indolentní NHL
TAN	SIRPa	IBI188	Pokročilé lymfomy
	CD47 / CD19	TG-1801	B-NHL
NK buňky		iC9/CAR.19/IL15 transdukované CB-NK-buňky	B-NHL, CLL, ALL
		CD19-targeted high affinity-NK	DLBCL
		AFM13	Refrakterní HL
	IL-15	ALT803	Refrakterní indolentní NHL
CAF	FGFR	JNJ-42756493	Pokročilé a refrakterní lymfomy

TAM-tumor asociovaný makrofág, MDSC–myeloidní supresorová buňka, TAN – tumor asociovaný neutrofil, NK–přirozený zabíječ, CAF–s nádorem asociovaný fibroblast, B-NHL-B ne Hodgkinský lymfom, DLBCL – difúzní velkobuněčný B lymfom, ALL- akutní lymfoblastická leukémie, CLL- chronická lymfatická leukémie, NHL – ne Hodgkinský lymfom.

2. Cíle a hypotézy

1. *Odvození nových PDX modelů agresivních lymfomů a jejich komplexní genetická charakterizace pomocí celoexomového sekvenování v přímém srovnání s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly PDX modely odvozeny.*

Hypotéza: nově odvozené PDX modely agresivních lymfomů budou sdílet většinu genetických mutací s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly odvozeny. U některých PDX modelů předpokládáme subklonální charakter engraftmentu, tedy vyšší alelickou frekvenci (variant allele frequency, VAF) genů zodpovědných za biologickou agresivitu (např. mutace/delece TP53 apod.). Předpokládáme také vznik nových (de novo) mutací v průběhu růstu PDX tumor v myším organismu.

2. *Komplexní imunohistochemická analýza nově odvozených PDX tumorů v přímém srovnání s imunohistochemickým profilem lymfatických uzlin, ze kterých byly PDX modely odvozeny.*

Hypotéza: předpokládáme, že lymfomové buňky v PDX tumorech budou mít podobný imunohistochemický profil jako primární lymfomové buňky v patientských uzlinách. Předpokládáme, že cévní vaskulatura bude vznikat pomocí „sprouting“ angiogeneze, a tudíž bude myšího původu. Předpokládáme, že nenádorové komponenty běžně nacházené v lidských lymfatických uzlinách infiltrovaných lymfomem (nenádorové lymfocyty, NK buňky a makrofágy) budou v PDX tumorech zastoupeny méně nebo budou zcela chybět. Předpokládáme, že v PDX tumorech nalezneme (vedle myších cév) také myší makrofágy, které lze detekovat v myší slezině, játrech či v kostní dřeni.

3. *Dynamický in vivo monitoring míry hypoxie a míry vaskularizace PDX tumorů pomocí fotoakustického a ultrazvukového zobrazování v průběhu jejich růstu v imunodeficientních myších*

Hypotéza: předpokládáme, že v průběhu růstu PDX tumoru v myším organismu dochází ke vzniku hypoxie v centrálních částech tumoru. Dále předpokládáme, že míra vaskularity bude korelovat s mírnou hypoxie. Konečně předpokládáme, že UZ odhad míry vaskularity bude korelovat s mikrovaskulární denzitou a mikrovaskulární plochou stanovenou imunohistochemicky.

3. Metody

3.1. Odběr nádorové tkáně

Nádorová tkáň byla získána od pacientů s lymfomy v rámci standardního diagnostického procesu biopsií po předchozím informovaném souhlasu v souladu s Helsinskou Deklarací a po schválení etickou komisí 1. LF UK (48/18). Jednalo se o lymfomy nově diagnostikované či lymfomy relabující, rezistentní na léčbu. Ve 13 případech šlo o diagnostickou exstirpaci lymfatické uzliny, v jednom případě o probatorní excizi infiltrovaných měkkých tkání (P4, VFN-D4) a 1x o gastroscopickou biopsii (P8, VFN-B3). V 10 případech se jednalo o B-NHL, v 5 o T-NHL. Základní charakteristiky pacientů shrnuje tabulka č. 3.

Míra infiltrace uzliny lymfomem byla v odebraných vzorcích ověřena pomocí průtokové cytometrie (FACS). Pro účely WES byly lymfomové buňky z uzliny pacienta či z PDX tumoru imunodeficientní myši separovány na magnetické koloně pomocí CD19 či CD45 protilátek s navázanými magnetickými kuličkami (Miltenyi Biotec).

Tabulka č. 3. Základní charakteristiky pacientů.

Pacient	pohlaví	diagnóza	subtyp	Klinický stav	Tkáň	WES	léčba	PDX (VFN)
1	Ž	DLBCL	non-GC	Dg	LN	ano	N	D3
2	M	DLBCL	non-GC	Dg	LN	ano	N	D6
3	M	DLBCL	non-GC	R/R	LN	ano	G-CHOP	D1
4	M	DLBCL	GC	R/R	EN	ano	R-CHOP+venetoclax,R-ESHAP, R-GIFOX, RT	D4
5	Ž	DLBCL	non-GC	R/R	LN	ano	R-CHOP, R-ESHAP, R-GIFOX, RT	D5
6	M	DLBCL	GC, transf.	Dg	LN	ano	R-COP	D12
7	Ž	DLBCL	DH	R/R	LN	ano	R-CHOP, R-ESHAP,	D20
8	M	BL		R/R	EN	ano	R-hyper-CVAD, R-MTX-HD-araC	B3
9	M	MCL		R/R	LN	ano	Nordický protokol	M5R1
10	Ž	MCL		R/R	LN	ano	Nordický protokol	M1
11	M	AITL		R/R	LN	ano	CHOEP	T3
12	Ž	AITL		R/R	LN	Ne	N	T7
13	Ž	PTCL, NOS		R/R	LN	ano	CHOEP	T6
14	M	ALCL		Dg	LN	ano	N	T5
15	M	ALCL	ALK+	Dg	LN	ano	N	T4

ALCL – anaplastický velkobuněčný T lymfom; ALK pozitivní, AITL – angioimunoblastický T lymfom; BL - Burkittův lymfom; COP – cyklofosamid, vinkristin, prednison, Dg. – primární diagnóza, DLBCL – difúzní velkobuněčný B lymfom; EN - extranodální tkáň, ESHAP – etoposid, solumedrol, vysokodávkový cytarabin, cisplatina, GC – subtyp ze zárodečných center, GC transf. – transformovaný z lymfomu z marginální zóny, G-CHOP – obinutuzab + CHOP, GIFOX – gemcitabin, ifosfamid, oxaliplatin, HD-araC-vysokodávkový cytarabin, hyperCVAD - hyperfrakcionovaný cyklofosamid, doxorubicin, vinkristin, dexametazon, CHOP – COP + doxorubicin, CHOEP – CHOP + etoposid, LN – lymfatická uzlina, MCL – lymfom z buněk plášťové zóny, MTX - metotrexát, N – neléčen, PTCL, NOS – periferní T lymfom nespecifikovaný, R rituximab, RM - udržovací rituximab, R/R – relabující, RT - radioterapie

3.2. Zpracování nádorové tkáně - odvození PDX modelů

Studie byla schválena etickou komisí (MSMT 21527/2017-8). Jako recipienti byly využity samice imunodeficientních myši NOD.Cg- scid II2rg tm Wjl/SzJ zakoupené z Jacksonovy

laboratoře, Bar Harbor, Maine, USA (NSG myši). Tyto byly chovány v individuálně ventilovaných klecích s dostatkem vody a potravy v Centru pro experimentální biomodely 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Vzorčky lidské nádorové tkáně byly nakrájeny na malé plátky a homogenizovány skrze 45 μ m nylonovou síťku, získaná drť rozmělněna v PBS (*phosphate buffered saline*) a získaná suspenze poté podkožně injikována v množství 10-30 milionů buněk / myš. Myši byly xenotransplantovány buď podkožně nebo pomocí implantace do subrenální kapsuly během krátkého operačního výkonu v celkové anestezii. V okamžiku, kdy velikost subkutánně implantovaných nádorů dosáhla 2 cm, respektive, kdy byla u operativně implantovaných nádorů ultrasonograficky (ultrazvuk Vevo 3100/LARZ-X) detekovatelná nádorová masa, byly myši usmrceny, nádorová tkáň exstirpována a následně využita pro morfologickou, genetickou a morfometrickou analýzu.

3.3. Celoxomové sekvenování (whole exome sequencing, WES)

Genomická DNA byla analyzována pomocí celoxomového sekvenování (WES). Hodnoceny byly mutace (single nucleotide variants, SNVs) a změny počtu kopií (copy number variants, CNVs).

Genomová DNA byla extrahována pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany) podle instrukcí výrobce. Sekvenační knihovny byly připravené pomocí kitů SureSelectXT Human All Exon V6 a UTR kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) a sekvenované na přístroji NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) v našem sekvenačním centru (CLIP, Prague, Česká republika). Sekvenční data vzorků z PDX modelů byly nejprve porovnány s myším referenčním genomem mm10 kombinovaným s lidským referenčním genomem hg19, následně bylo sekvenční čtení z myší odfiltrováno z další analýzy pomocí vlastního skriptu, aby se snížilo riziko kontaminace. Zbývající hodnoty byly poté porovnány

s lidským referenčním genomem hg19. Všechna srovnání byla provedena s pomocí nástroje BWA. Genomické varianty byly anotovány pomocí programů Samtools, VarScan, a SnpEff. Hodnoceny byly pouze nesynonymní varianty v kódujících oblastech genů s pokrytím alespoň 10x a s kvalitou mapování bází vyšší než 20 ve všech souvisejících vzorcích a byly porovnány na základě jejich frekvence. Varianty v patientské germinální DNA s frekvencí vyšší než 0,05 byly z analýzy ve všech případech vyloučeny. Porovnali jsme varianty s frakcí alel větší nebo rovné 0.2 nejméně v jednom z porovnávaných vzorků, které byly přítomny alespoň ve 3 čteních jak ve vzorku s relapsem, tak ve vzorcích odvozených z PDX modelů. Filtrování variant proběhlo v softwaru RS studio, frekvence a počty variant kopií genů byly vyneseny do grafu pomocí knihovny ggplot2 (<http://www.R-project.org>; <http://www.rstudio.com>). Tyto varianty byly manuálně zkontrolovány v Integrative Genomic Viewer (IGV; <http://www.broadinstitute.org/igv>), aby byly vyloučeny sekvenační artefakty. Seznam zkoumaných genů pro každý typ lymfomu byl sestaven na podkladě poznatků z recentních publikací, jednalo se o geny u předmětných lymfomů často mutované (seznam vyšetřovaných variant/genů pro jednotlivé diagnózy jsou uvedeny v tabulce X).

Změny počtu kopií genů byly predikovány pomocí CNV kitu s normalizací oproti referenčním nenádorovým/normálním kontrolním vzorkům. Geny s největšími odchylkami v CNV analýze byly vyneseny do grafu.

3.4. Histopatologické vyšetření

Lidská nádorová tkáň i tkáň získaná z myši byla fixována v 10% roztoku pufrovaného formolu a zpracována standardní histologickou technikou. Imunohistochemické vyšetření (IHC) bylo provedeno na 4 µm silných řezech, vyšetřovány byly tyto antigeny: CD45, Ki-67, MYC, CD31, CD68, CD3, CD4, CD8, CD56, CD20, bcl2, bcl6, CD10, IRF4/MUM1, cyklin D1, SOX11, CD5, ALK, CD23, PD-1, CD7, granzym B, perforin, TIA-1. Dále byly použity protilátky proti

myším antigenům CD31 a CD68. Klony použitých protilátek, výrobce, ředění, způsob detekce a cílové struktury jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Výsledky IHC vyšetření byly vyhodnoceny semikvantitativně odhadem podle počtu pozitivních buněk (0-100 %). Při vyhodnocování Ki-67 indexu bylo považováno za pozitivní každé jádro s hnědým zabarvením jakékoliv intenzity, hodnocena byla celá plocha vyšetřovaného řezu. Skórování bylo založeno na určení oblastí s vysokým, středním a nízkým Ki-67 indexem, z každé takové plochy bylo spočítáno nejméně 100 jader. Kompletní skóre bylo poté vypočítáno z každého vzorku zvlášť a výsledky byly uvedeny v 10 % odstupech.

Detekce vitu Epstein-Barrové (EBV) provedena kitem INFORM EBER (Epstein-Barr virus early RNA) na BenchMark ULTRA automatizované platformě dle instrukcí výrobce (Ventana Benchmark, Roche, Basel, Switzerland). K barvení retikulárních a kolagenní vláken na pozadí nádoru použito barvení dle Gordona-Sweeta and van Giesona. Grading fibrózy jsme vyhodnocovali semikvantitativně jako G0 (žádná fibróza – jen roztroušená jemná retikulární vlákna), G1 (mírná fibróza– řídká síť křížících se retikulárních vláken), G2 (těžká fibróza– hustá síť křížících se silných retikulárních a kolagenních vláken) a G3 (skleróza – kompaktní plochy hyalinizované tkáně).

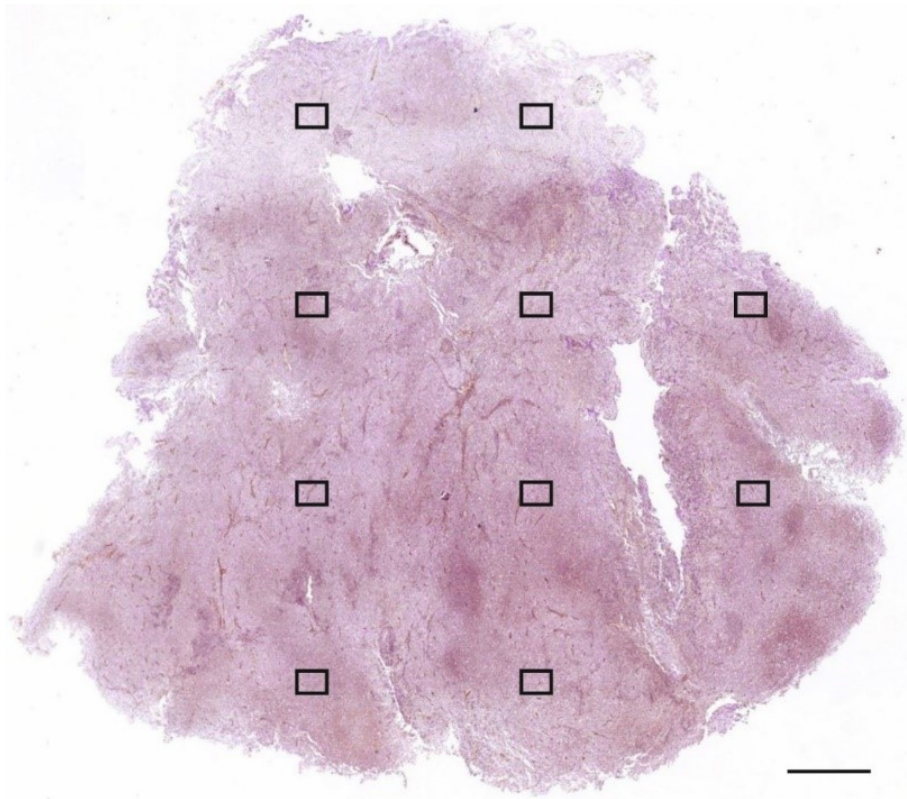
Tabulka č. 4. Použité protilátky v imunohistochemické analýze.

Protilátka	klon	Ředění	Výrobce	Platforma	Detekce	Cílová struktura	Použito u
CD45	2B11 + PD7/26	1:200	Da	PT-link	EN	lidské leukocyty	všech
Ki-67	MIB-1	1:100	Da	Ventana	OV	proliferační index	všech
MYC	Y69	1:20	Ab	Ventana	OV	transkripční faktor MYC	všech
CD31	JC70A	1:50	Da	PT-link	EN	endotel lidských cév	všech
CD31(m)	SP38	1:50	TS	PT-link	EN	endotel myších cév	všech
CD68	PG-M1	1:25	Da	PT-link	EN	lidské makrofágy	všech
CD68 (m)	SP38	1:50	TS	PT-link	EN	myší makrofágy	všech
CD3	LN10	1:500	NL	PT-link	EN	lidské T lymfocyty	všech
CD4	SP35	1:100	DCS	PT-link	EN	pomocné T lymfocyty	všech
CD8	C8/144B	1:100	Da	PT-link	EN	cytotoxické T lymfocyty	všech
CD56	123C3.D5	1:25	ZC	PT-link	EN	NK buňky	všech
CD20	L26	1:400	Da	PT-link	EN	B lymfocyty	DLBCL, MCL, FL, BL
BCL2	124	1:100	Da	PT-link	EN	Anti-apoptotický protein BCL2	DLBCL, MCL, FL, BL
BCL6	PG-B6p	1:10	Da	Ventana	OV	transkripční faktor BCL6	DLBCL, AITL
CD10	56C6	1:50	NL	Ventana	OV	lymfocyty zárodečných center	DLBCL, AITL
IRF4 / MUM1	MUM1p	1:100	Da	PT-link	EN	transkripční faktor IRF4	DLBCL
Cyclin D1	SP4	1:200	Da	Ventana	OV	cyklin D1	MCL
SOX11	MRQ-58	1:200	CM	PT-link	EN	transkripční faktor SOX11	MCL
CD5	4C7	1:400	NL	Ventana	OV	T lymfocyty, B lymfocyty	MCL, ALCL
ALK	5A4	1:100	Z	PT-link	EN	anaplastic lymphoma kinase	ALCL
CD23	1B12	1:100	NL	PT-link	EN	folikulární dendritické buňky	ALCL
PD-1	NAT-105	1:25	CM	PT-link	EN	programmed death receptor 1	AITL
CD7	CBC.37	1:200	Da	Ventana	OV	T lymfocyty	PTCL
Granzym B	11F1	1:40	N	PT-link	EN	cytotoxická granula T lymfocytů	PTCL
Perforin	5B10	1:40	LM	Ventana	OV	cytotoxická granula T lymfocytů	PTCL
TIA-1	2G9A10F5	1:20	BG	Ventana	OV	cytotoxická granula T lymfocytů	PTCL

Výrobce: Ab – Abcam, Cambridge, United Kingdom, BG – BioGenex, Fremont, CA, USA, CM – Cell Marque, Rocklin, CA, USA, Da – Dako, Glostrup, Denmark, DCS – DCS, Innovative Diagnostik-Systeme, Germany, LM – Leica microsystems, Wetzlar, Germany, N – Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany, TS – Termofisher Scientific, Waltham, MA, USA, ZC – Zeta Corporation, Sierra Madre, CA, USA, Z – Zytomed systems, Berlin, Germany; **Platforma:** PT-link – PT link, Agilent, Santa Clara, CA, USA, Ventana – Ventana BenchMark ULTRA, Roche, Basel, Switzerland; **Detekce:** EN – EnVision FLEX (Agilent), OV = OptiView.

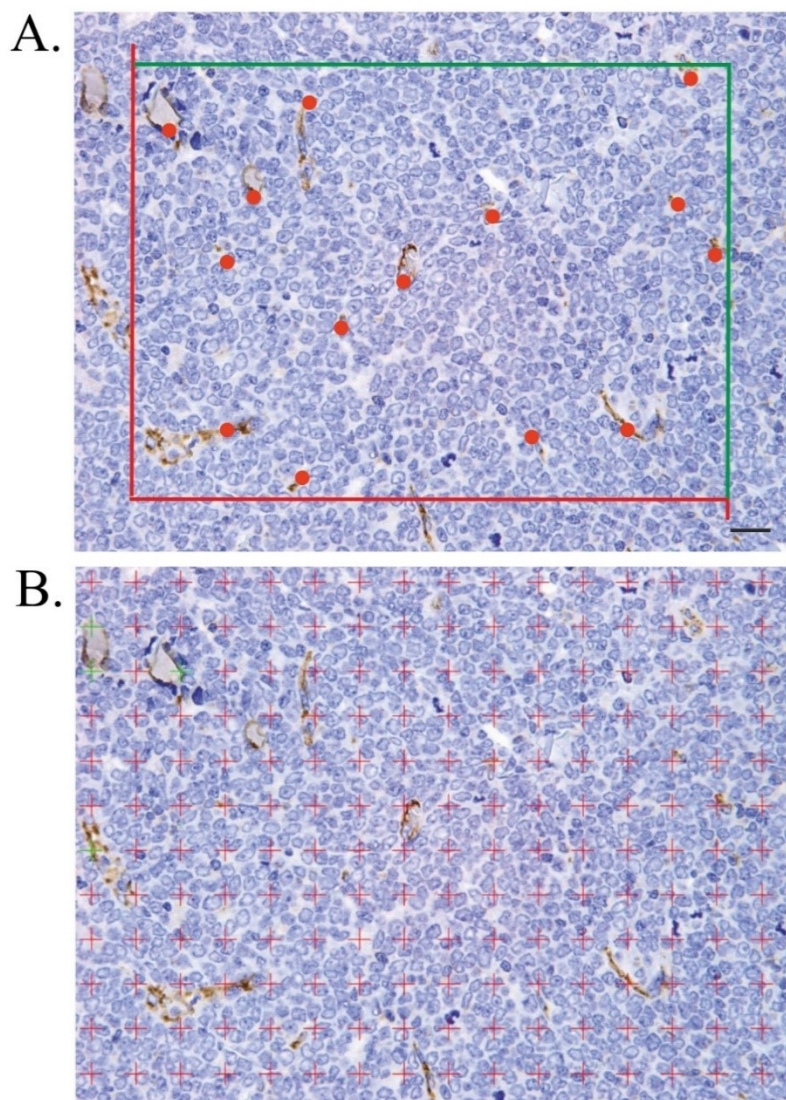
3.5 Vyšetření mikrovaskulární denzity (MVD)

Mikrovaskulární denzita (MVD) představuje hustotu cévních profilů (mikrocév) zachycených v tkáňovém řezu přepočtené na jednotku plochy, respektive udává dvojrozměrný obraz hustoty mikrocév na jednotku plochy tkáňového řezu (mm^2). Mikrovaskulární plocha (Microvessel area, MVA) představuje procentuální poměr tkáně tvořené mikrocévami. Kvantitativní parametry MVA a MVD jsou považovány za komplementární. MVD a MVA byly stanoveny celkem ve 4 párech parafinových bloků zhotovených z nádorové tkáně pacienta a korespondujícího PDX modelu (VFN-D1 vs P1, VFN-D5 vs P5, VFN-M5R1 vs P9, VFN-R4 vs P15) (Tabulka č.5). Z každého bloku bylo zhotoveno postupným prokrájením po 1 mm pět řezů a tyto byly barveny imunohistochemicky s protilátkou CD31 (JC70A cílené na lidské endotelie a SP38 zaměřené na endotelové buňky myši, u PDX modelů provedeno barvení jak s lidskou, tak myší protilátkou). Kvantifikace byla provedena postupem popsáním dříve (Kolinko et al., 2021), hodnoceno bylo 10 zorných polí při zvětšení 40x metodou systematického náhodného výběru v definovaných oblastech (viz obrázek 1 a 2) pomocí mikroskopu s motorizovaným posuvným stolcem (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Úroveň vaskulární denzity nádorové tkáně byla zjišťována na základě vyhodnocení parametrů MVD (mikrovaskulární denzita) metodou tzv. nevychýleném počítání v počítačím rámečku (obrázek 2A) a MVA (mikrovaskulární plocha) stereologickou metodou na základě Cavalieriho principu (obrázek 2B) s pomocí softwaru Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovenská republika). Základní charakteristiky parametrů MVA a MVD uvádí tabulka č. 5.



Obrázek č. 1. Výběr oblastí pro vyšetření MVA a MVD metodou systematického náhodného výběru zorných polí v definované oblasti.

Obdélníky odpovídají náhodně vybraným arbitrárně stanoveným zorným polím se standardizovaným rozestupem. Měřítka odpovídá 1000 μm (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 2. Metody kvantifikace intratumorální mikrovaskulární denzity (MVD, část A), a mikrovaskulární arey (MVA, část B) CD-31 pozitivních vaskulárních profilů (endotelie se barví hnědě).

Oblast ohraničená barevnými přímkami v části A odpovídá počítacímu rámečku v zorném poli použitém při tzv. nevychýleném počítání (cévní profily jež dotýkaly červených přímek nebyly započítávány, profily, jež se dotýkaly zelených přímek započítávány byly). V části „B“ znázorněna stereologická bodová síť použitá při vyhodnocování MVA na základě Cavalieriho principu. Měřítka odpovídá 20 μm (Jaksa et al., 2022).

Tabulka č 5. Charakteristika parametrů MVA a MVD.

Zkratka, jednotka	Kvantitativní parametr	postup měření	Biologický význam
MVD (microvessel density, hustota mikrocév) cévní profily / mm ²)	Počet CD31 pozitivních mikrocév na ploše jednoho řezu	Nevýběrový výřez plochy pro počítání vaskulárních profilů	Dvourozměrný kvantitativní odhad intratumorózního mikrovaskulárního řečiště. V náhodně orientovaných řezech tento parametr vysoce koreluje s trojrozměrnou délkovou hustotou cév.
MVA (oblast mikrocév), na 1 mm	Plošná frakce CD31 pozitivních mikrovaskulárních intratumorózních profilů	Stereologická bodová síť pro odhad plochy mikrovaskulárních profilů	Dvourozměrný kvantitativní odhad stupně anomálních intratumorálních cév

3.6 Ultrazvukové vyšetření vaskularity

Ultrasonografické 3D zobrazení vaskularizace subkutánních myších lymfomů bylo provedeno pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku Vevo 3100 (FUJIFILM VisualSonics, Inc.) a vyšetřeno vysokofrekvenční sondou Mx400 (střední frekvence 30 MHz B-Mód, 24 MHz barevný Doppler, 30 μ m axiální rozlišení, 256 prvků) v barevném Dopplerově módu s anatomickou koregistrací (B-Mód). Velikost zorného pole byla 7-18 mm pro malé a střední nádory a 7-20 mm pro velké nádory. 3D skenování bylo u všech tumorů s konstantním inkrementem 80 μ m. Prostor mezi povrchem sondy a kůži tumoru byl vyplněn ultrasonografickým gelem pro usnadnění přenosu echa. Nastavení parametrů: Celkový Zisk (gain) 36 dB, Pulzní Opakovací Frekvence (PRF): 3, Gate: 3, Citlivost: 3 a 4 (malé / střední a velké nádory), Perzistence: off, Uhel svazku: 0°, Wall Filter: medium. Po provedení volumetrické analýzy (VevoLAB 3.2.6) jednotlivých nádorů bylo stanoveno procento vaskularizace (PV %) což odpovídá MVA.

Jako anestézie byla použita spontánní inhalace plynného isofluranu (3% pro navození a 2% pro udržení).

4. Výsledky

4.1. Charakterizace PDX modelů

Celkem jsme odvodili 15 nových PDX modelů od 15 různých pacientů (9 mužů, 6 žen) s dosud neléčeným lymfomem (n=5), či s relapsem choroby lymfomu (n=10). Jednalo se o difúzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL, n = 7), včetně jednoho DLBCL transformovaného z lymfomu z buněk marginální zóny a jednoho tzv. „double hit“ lymfomu s přestavbou genů MYC a BCL2, Burkittův lymfom (BL, n = 1), lymfom z buněk plášťové zóny (mantle cell lymfom, MCL, n=2), angioimunoblastický T lymfom (AITL, n = 2), periferní T lymfom blíže nespecifikovaný (PTCL, NOS, n = 1), anaplastický velkobuněčný T lymfom (ALCL) ALK pozitivní (n = 1) a ALCL ALK negativní (n = 1). Odvozené lymfomy tak pokrývali hlavní spektrum agresivních NHL.

4.2. Genetická analýza genomu primárních lidských lymfomových buněk a z nich odvozených PDX myších modelů

Celoexomové sekvenování (*Whole exome sequencing*, WES) bylo provedeno u 13 z 15 případů, u nichž byla dostupná DNA. K vyloučení polymorfismu genů bylo ve všech případech použito srovnání s nenádorovou DNA pacientů (bukální stěr).

WES prokázalo, že PDX modely si zachovaly většinu somatických mutací původních transplantovaných lidských lymfomových buněk, ze kterých byly derivovány. Medián frekvence alel somatických mutací, jež byly detekovány jak u primárních vzorků, tak u PDX modelů (sdílené mutace) byl u obou studovaných skupin srovnatelný, u všech studovaných případů činil 0.39 (PDX) versus 0.27 (pacient), u difúzních velkobuněčných lymfomů zjištěny hodnoty 0.44 vs. 0.36 (PDX vs pacient), u lymfomů z buněk pláště 0.45 vs 0.44 (PDX vs pacient) a u Burkittova lymfomu (pouze jeden případ) činila frekvence alel 0.42 vs 0.44 (PDX

vs pacient). Medián VAF u T-NHL souhrnně odpovídal hodnotám 0.41 vs 0.27 (PDX vs pacient).

Podrobné výsledky uvádí tabulka č. tabulka č. 6.

Tabulka č. 6. Medián VAF sdílených mutací u PDX modelů a u primárních lymfomových vzorků.

	Medián VAF u PDX	Medián VAF u patientských vzorků
všechny	0.39	0.27
DLBCL	0.44	0.36
MCL	0.45	0.44
T-NHL	0.41	0.27
BL*	0.42	0.44
VFN-D3 vs P1	0.43	0.38
VFN-D6 vs P2	0.44	0.26
VFN-D1 vs P3	0.47	0.38
VFN-D4 vs P4	0.44	0.3
VFN-D5 vs P5	0.43	0.39
VFN-D20 vs P7	0.47	0.48
VFN-B3 vs P8	0.42	0.44
VFN-M5R1 vs P9	0.45	0.43
VFN-M1 vs P10	0.47	0.44
VFN-T3 vs P11	0.2	0.1
VFN-T6 vs P13	0.42	0.09
VFN-T5 vs P14	0.45	0.42
VFN-T4 vs P15	0.38	0.16
<p>BL - Burkittův lymfom, DLBCL - difúzní velkobuněčný B lymfom, MCL - lymfom z buněk pláště, P1-P15 - vzorky lymfomových buněk získaných od pacientů, T-NHL-T-cell ne Hodgkinovy lymfomy, VFN - PDX modely derivované z primárních patientských buněk P1-15. * - pouze 1 PDX model.</p>		

Somatické mutace, jež nebyly zjištěny u PDX modelů, avšak byly přítomny u patientských vzorků (tzv. „nově nedetekované“, *newly undetected*, N/U) představovaly mutace s nízkou frekvencí (medián 0.15) a jen ojediněle zahrnovaly geny, jejichž mutace se rekurentně vyskytuje u pacientů s lymfomy.

Somatické mutace nově detekované u PDX modelů, avšak nepřítomné u patientských vzorků (tj. nově získané, *newly detected*, N/D) byly ve srovnání s mutacemi N/U sice početnější, avšak

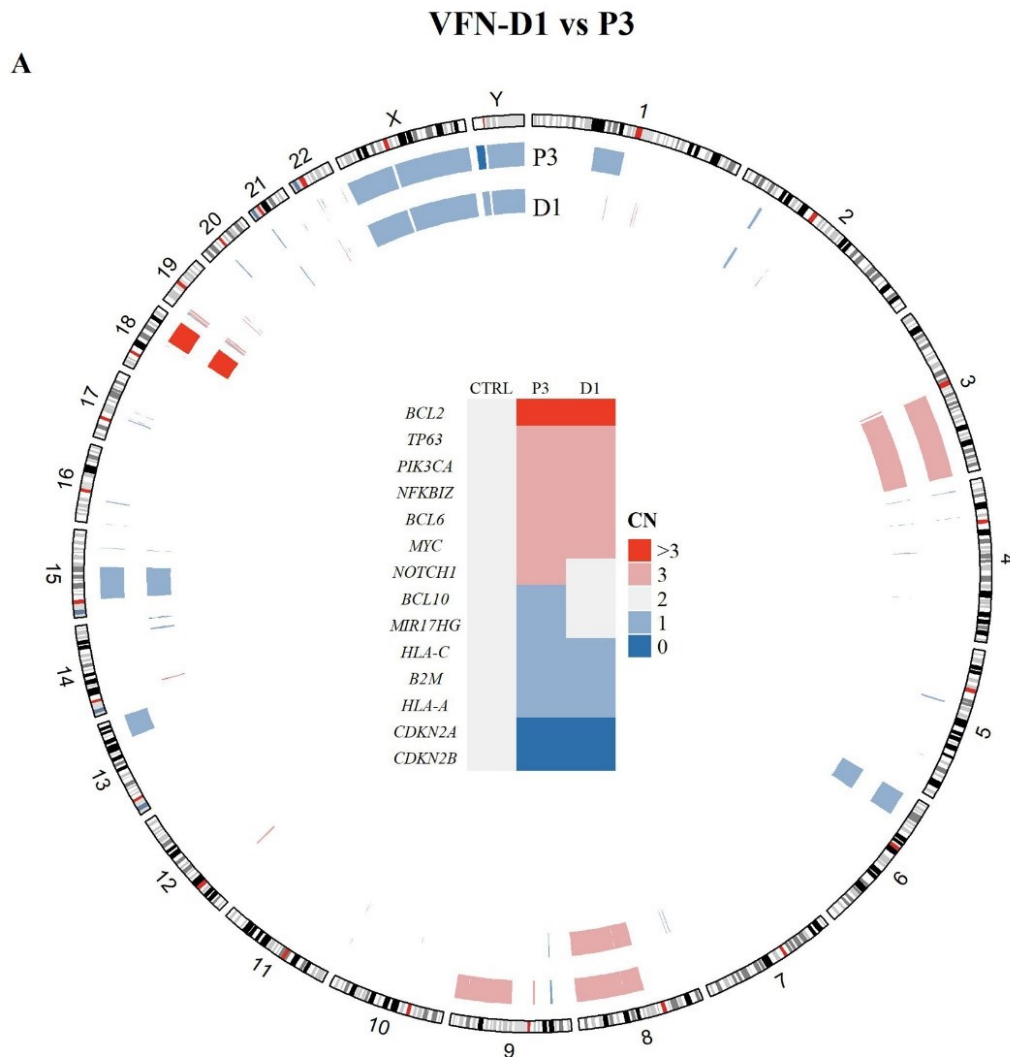
rovněž představovaly převážně nízkofrekvenční mutace s mediánem frekvence alel 0.18. Celkové výsledky frekvence počtu alel N/U a N/D mutací u primárních vzorků a PDX modelů shrnuje tabulka č. 7

Tabulka č. 7. Medián VAF a typů nově detekovaných (N/D) a ztracených (N/U) somatických mutací u PDX modelů.

A.	Medián VAF N/D mutací u PDX modelů	Medián VAF N/U mutací u pacientů
Všechny PDX modely	0.18	0.15
DLBCL	0.27	0.14
MCL	0.18	0.36
T-NHL	0.15	0.14
BL*	0.17	0.11
B.	N/D mutace sledovaných genů	N/D mutace sledovaných genů
VFN-D1 vs P3	<i>ETV6</i>	<i>RUNX1</i>
VFN-D3 vs P1	<i>PDGFRA</i>	0
VFN-D4 vs P4	<i>NF1, HIPK3</i>	0
VFN-D5 vs P5	<i>ITPKB, ENAM</i>	0
VFN-D6 vs P2	<i>IRF4, RNF213, MYC, FOXO1, KLHL14, OSBPL10</i>	0
VFN-D20 vs P7	0	0
VFN-M1 vs P10	0	0
VFN-M5R1 vs P9	0	0
VFN-T3 vs P11	<i>STAT1, ZNF708, RHOA</i>	0
VFN-T4 vs P15	<i>SPEN, FSIP2, DCC, ZNF532</i>	0
VFN-T5 vs P14	<i>AIRD1B, VPS13A, MYD88</i>	0
VFN-T6 vs P13	<i>IRF2BP2, VAV1, TCF20</i>	<i>BIRC6</i>
VFN-B3 vs P8	0	0

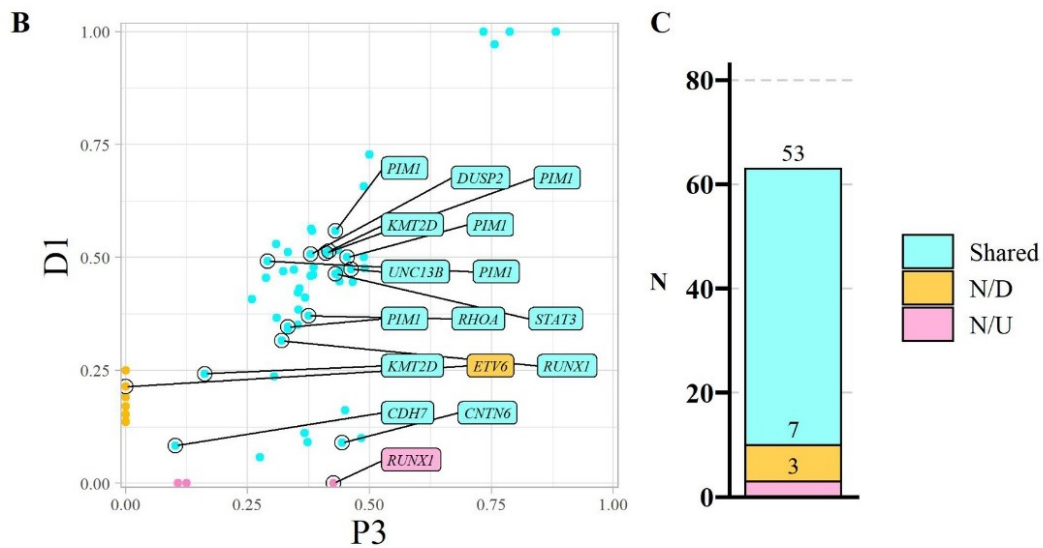
A. Medián VAF nově detekovaných (N/D) mutací u PDX modelů a nově „ztracených“ – nedetekovaných (N/U) mutací u patientských lymfomových buněk. **B.** N/D and N/U varianty sledovaných genů. 0 = žádná varianta studovaného genu. BL - Burkittův lymfom, DLBCL - difúzní velkobuněčný B lymfom, MCL - lymfom z buněk pláště, P1-P15 - vzorky lymfomových buněk získaných od pacientů, T-NHL -T ne Hodgkinové lymfomy, VFN - PDX modely derivované z primárních patientských buněk P1-15. * - pouze jeden PDX model.

Většina z N/D mutací u PDX modelů nebyla identifikována u příslušných primárních lymfomových vzorků (frekvence alel = 0) a většinou sestávaly ze záměny nukleotidů (obrázky č. 9 a 10). Některé N/D mutace byly nalezeny u primárních lymfomových vzorků, avšak jejich frekvence alel nedosahovala pre-definované hranice pro záchyt mutace (tj. frekvence $\geq 10\%$).



Obrázek č. 3A. Výsledky WES u PDX modelu VFN-D1 vs. P3 (DLBCL-non GC).

Část A. Celoexomové sekvenování (WES) primárních lymfomových buněk získaných od pacienta P3 (DLBCL, non-GC) a PDX modelu odvozeného z těchto buněk (VFN-D1). Kruhový ideogram ukazuje predikované počty kopií genových variant (CNVs) u vzorku tkáně získaného od pacienta (P3) a korespondujícího modelu PDX (D1). Vnější kruh znázorňuje pozice predikovaných CNVs (ve srovnání s nenádorovou DNA pacienta). Delece genů jsou zbarveny v odstínech modré (“1”: predikovaná monoalelická delece, “0”: predikovaná bialelická delece). Amplifikace genů jsou znázorněny v odstínech červené (“3”: získání jedné alely, “>3”: získání více než jedné alely). Grafická tabulka v centru kruhu ukazuje CNV vyšetřovaných genů (Jaksa et al., 2022).



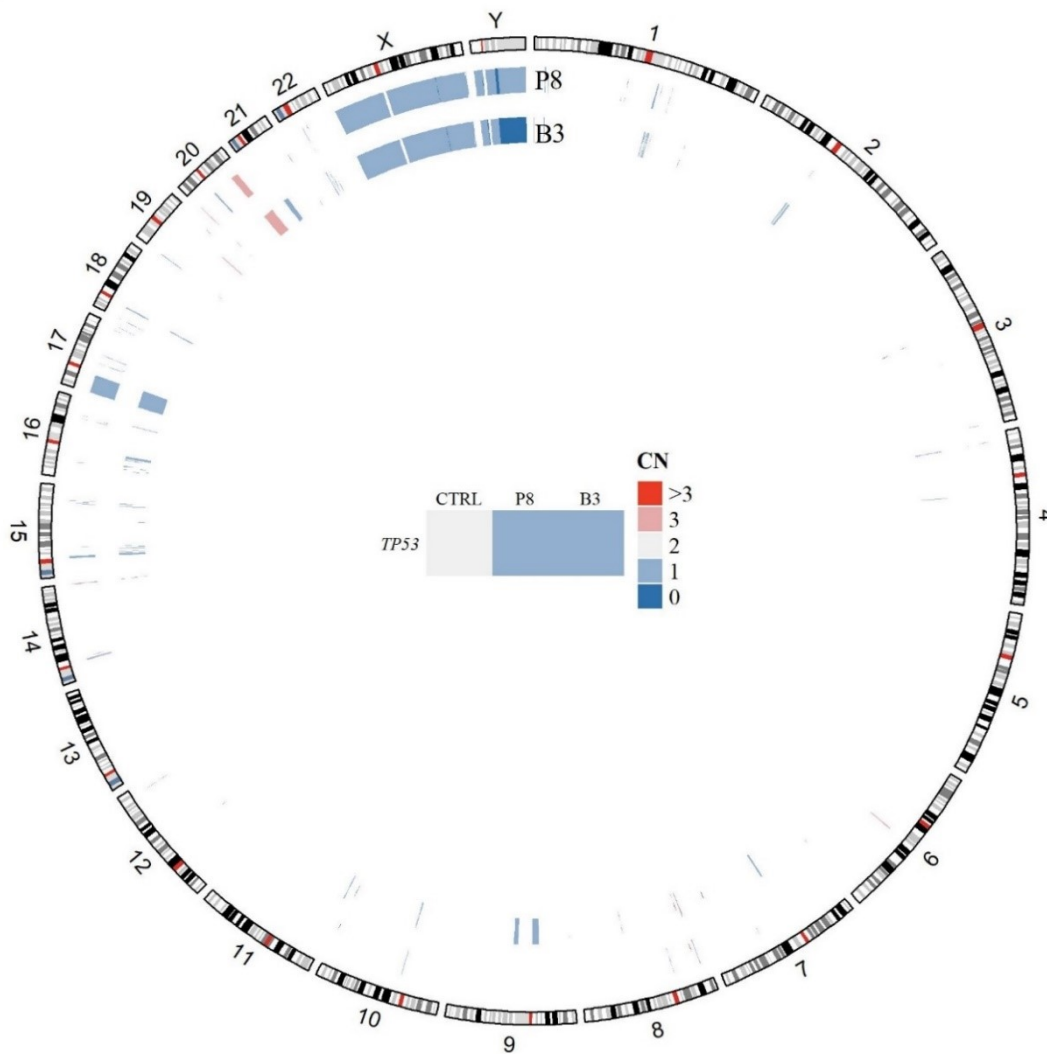
Obrázek č. 3B,C. Výsledky WES u PDX modelu VFN-D1 vs. P3 (DLBCL-non GC).

Část B. Bodový graf ukazuje frekvenci alel sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (ztracených) (N/U) u PDX modelu ve srovnání s pacientovým vzorkem, ze kterého byly získány. Body znázorňují varianty vyšetřovaných genů.

Část C. Skládaný graf ukazuje počet sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (N/U) variant u primárního lidského vzorku a PDX modelu. P pacientský vzorek, CN = počet kopií genu, CTRL = kontrolní (zárodečná) DNA získaná od pacienta, N = počet (Jaksa et al., 2022).

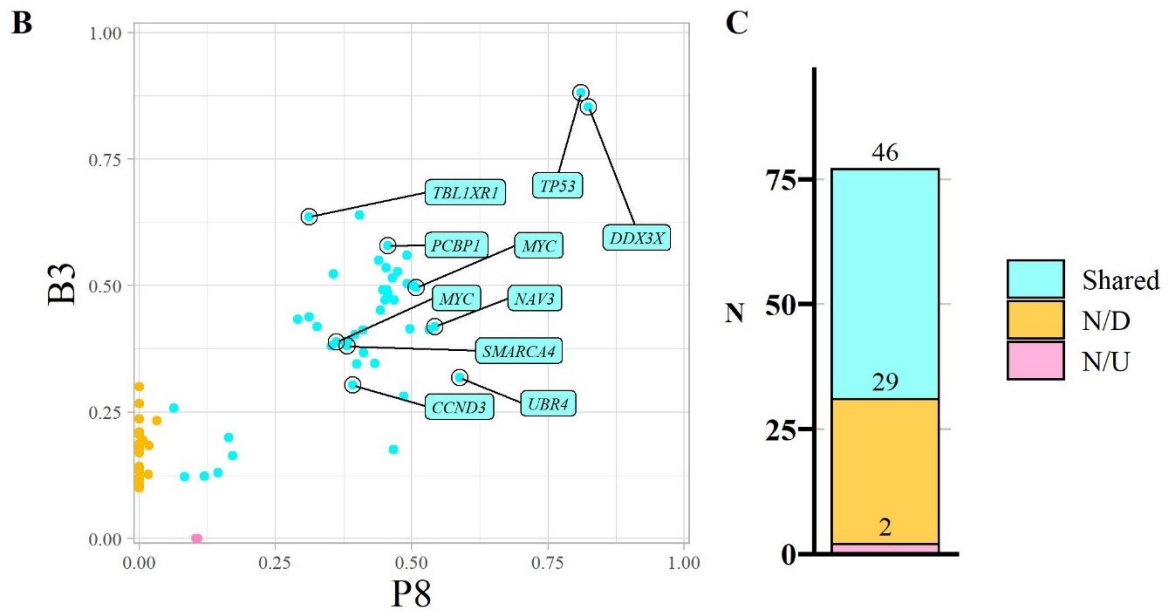
VFN-B3 vs P8

A



Obrázek č. 4A. Výsledky WES u PDX modelu VFN-B3 vs P8 (Burkittův lymfom).

Část A. Celoxomové sekvenování (WES) primárních lymfomových buněk získaných od pacienta P8 (Burkittův lymfom) a PDX modelu odvozeného z těchto buněk (VFN-B3). Kruhový ideogram ukazuje predikované počty kopií genových variant (CNVs) u vzorku tkáně získaného od pacienta (P8) a korespondujícího modelu PDX (B3). Vnější kruh znázorňuje pozice predikovaných CNVs (ve srovnání s nenádorovou DNA pacienta). Delece genů jsou zbarveny v odstínech modré (“1”: predikovaná monoalelická delece, “0”: predikovaná bialelická delece). Amplifikace genů jsou znázorněny v odstínech červené (“3”: získá jedné alely, “>3”: získá více než jedné alely). Grafická tabulka v centru kruhu ukazuje CNV vyšetřovaných genů (Jaksa et al., 2022).



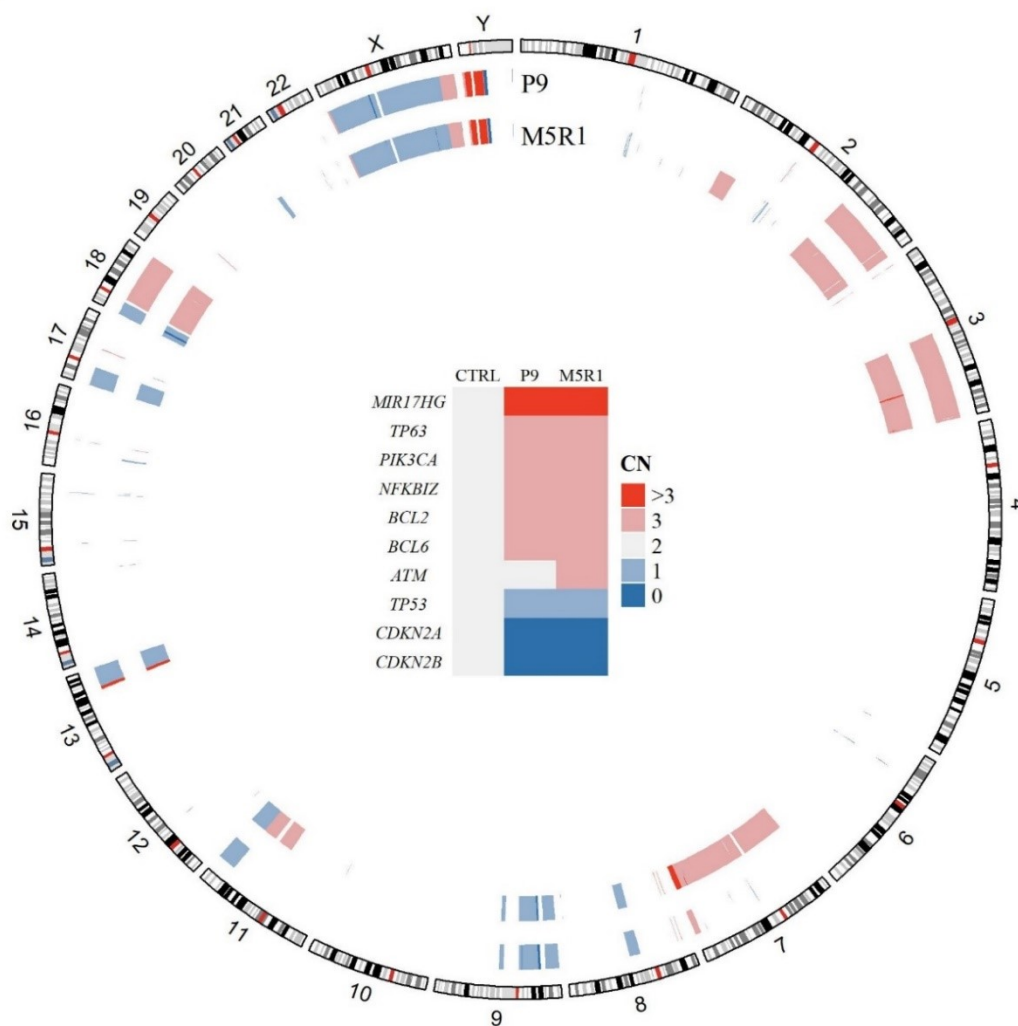
Obrázek č. 4B,C. Výsledky WES u PDX modelu VFN-B3 vs P8 (Burkittův lymfom).

Část B. Bodový graf ukazuje frekvenci alel sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (ztracených) (N/U) u PDX modelu ve srovnání s pacientovým vzorkem, ze kterého byly získány. Body znázorňují varianty vyšetřovaných genů.

Část C. Skládaný graf ukazuje počet sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (N/U) variant u primárního lidského vzorku a PDX modelu. P patientský vzorek, CN = počet kopií genu, CTRL = kontrolní germinální patientská DNA, N = počet (Jaksa et al., 2022).

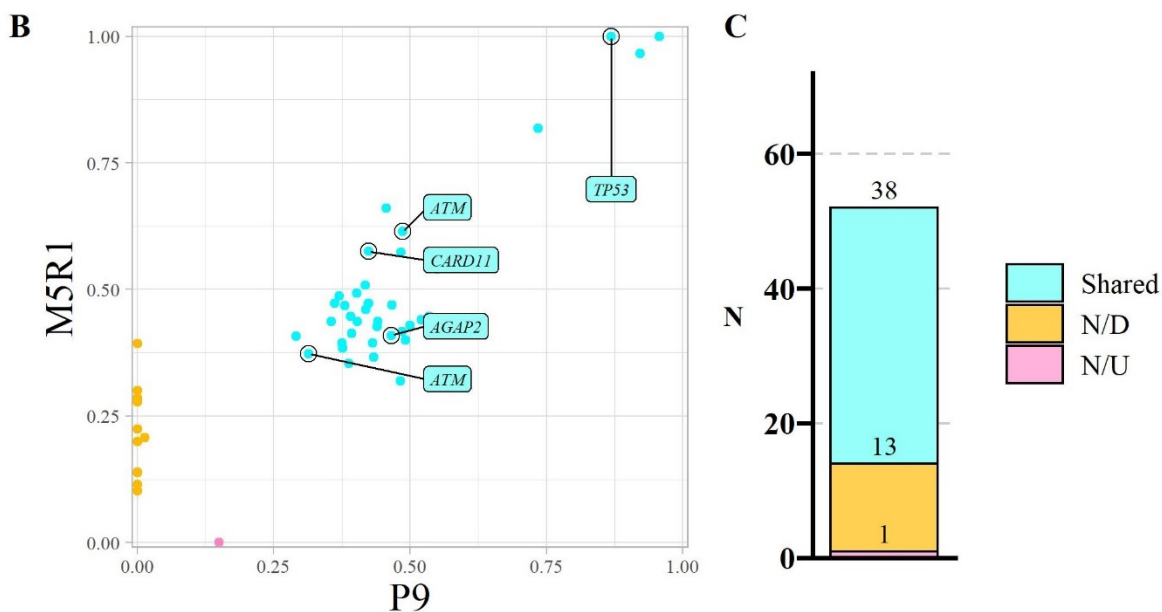
VFN-M5R1 vs P9

A



Obrázek č. 5A. Výsledky WES u PDX modelu VFN-M5R1 vs. P9 (MCL).

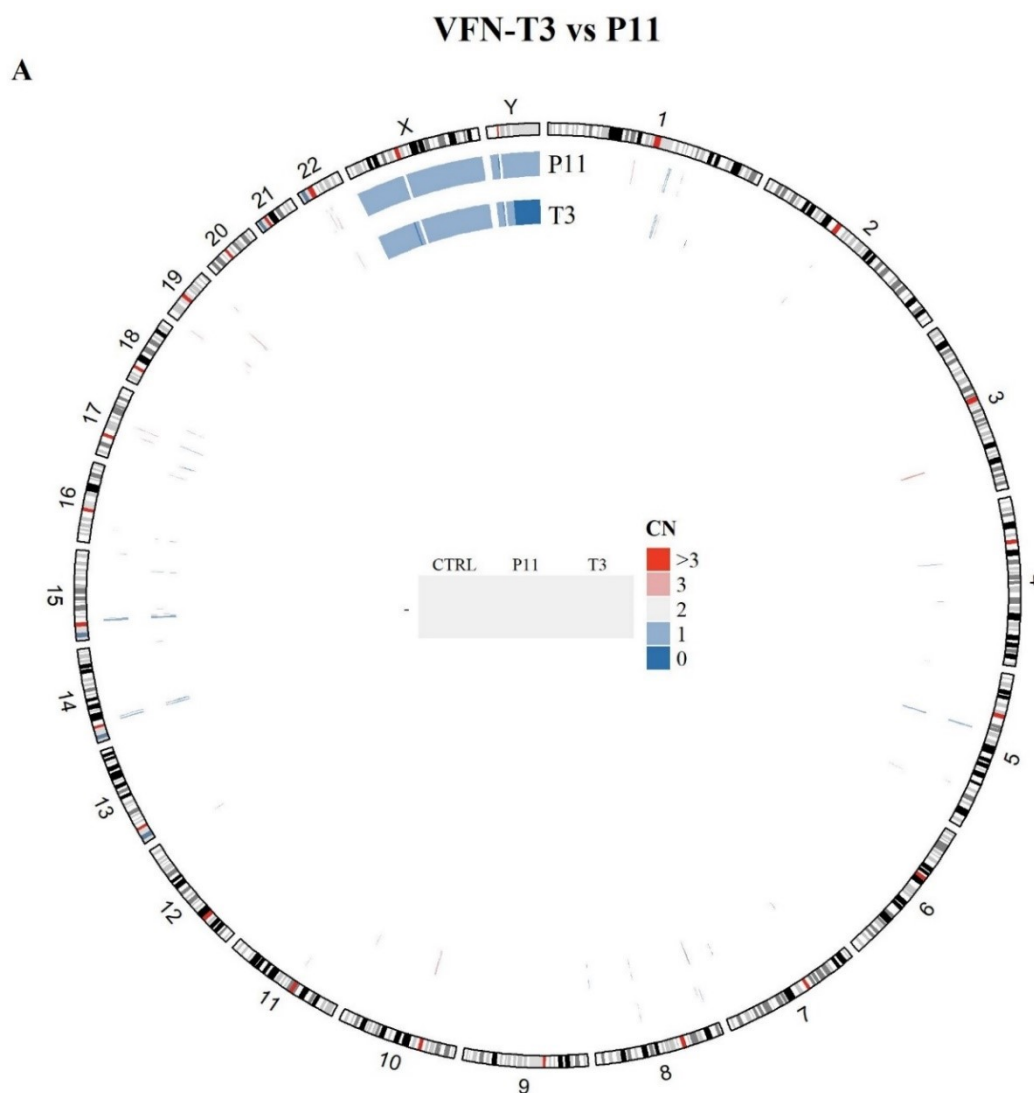
Část A. Celoexomové sekvenování (WES) primárních lymfomových buněk získaných od pacienta P9 (Mantle cell lymfom) a PDX modelu odvozeného z těchto buněk (VFN-M5R1). Kruhový ideogram ukazuje predikované počty kopií genových variant (CNVs) u vzorku tkáně získaného od pacienta (P9) a korespondujícího modelu PDX (M5R1). Vnější kruh znázorňuje pozice predikovaných CNVs (ve srovnání s nenádorovou DNA pacienta). Delece genů jsou zbarveny v odstínech modré (“1”: predikovaná monoalelická delece, “0”: predikovaná bialelická delece). Amplifikace genů jsou znázorněny v odstínech červené (“3”: získání jedné alely, “>3”: získání více než jedné alely). Grafická tabulka v centru kruhu ukazuje CNV vyšetřovaných genů (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 5B,C. Výsledky WES u PDX modelu VFN-M5R1 vs. P9 (MCL).

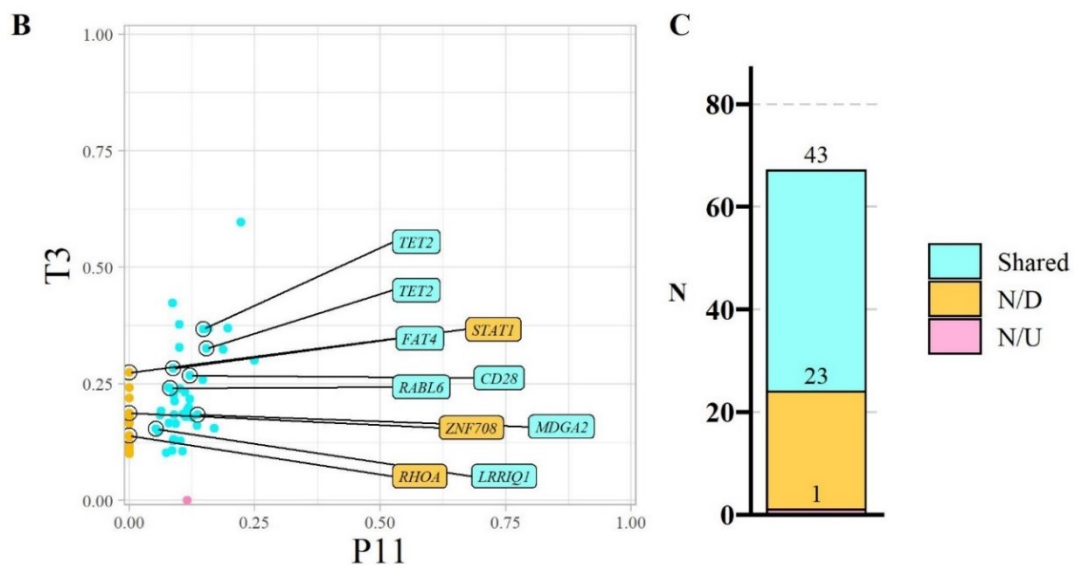
Část B. Bodový graf ukazuje frekvenci alel sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (ztracených) (N/U) u PDX modelu ve srovnání s pacientovým vzorkem, ze kterého byly získány. Body znázorňují varianty vyšetřovaných genů.

Část C. Skládaný graf ukazuje počet sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (N/U) variant u primárního lidského vzorku a PDX modelu. P = pacientový vzorek, CN = počet kopií genu, CTRL = kontrolní germinální patientská DNA, N = počet (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 6A. Výsledky WES u PDX modelu VFN-T3 vs. P11 (AITL).

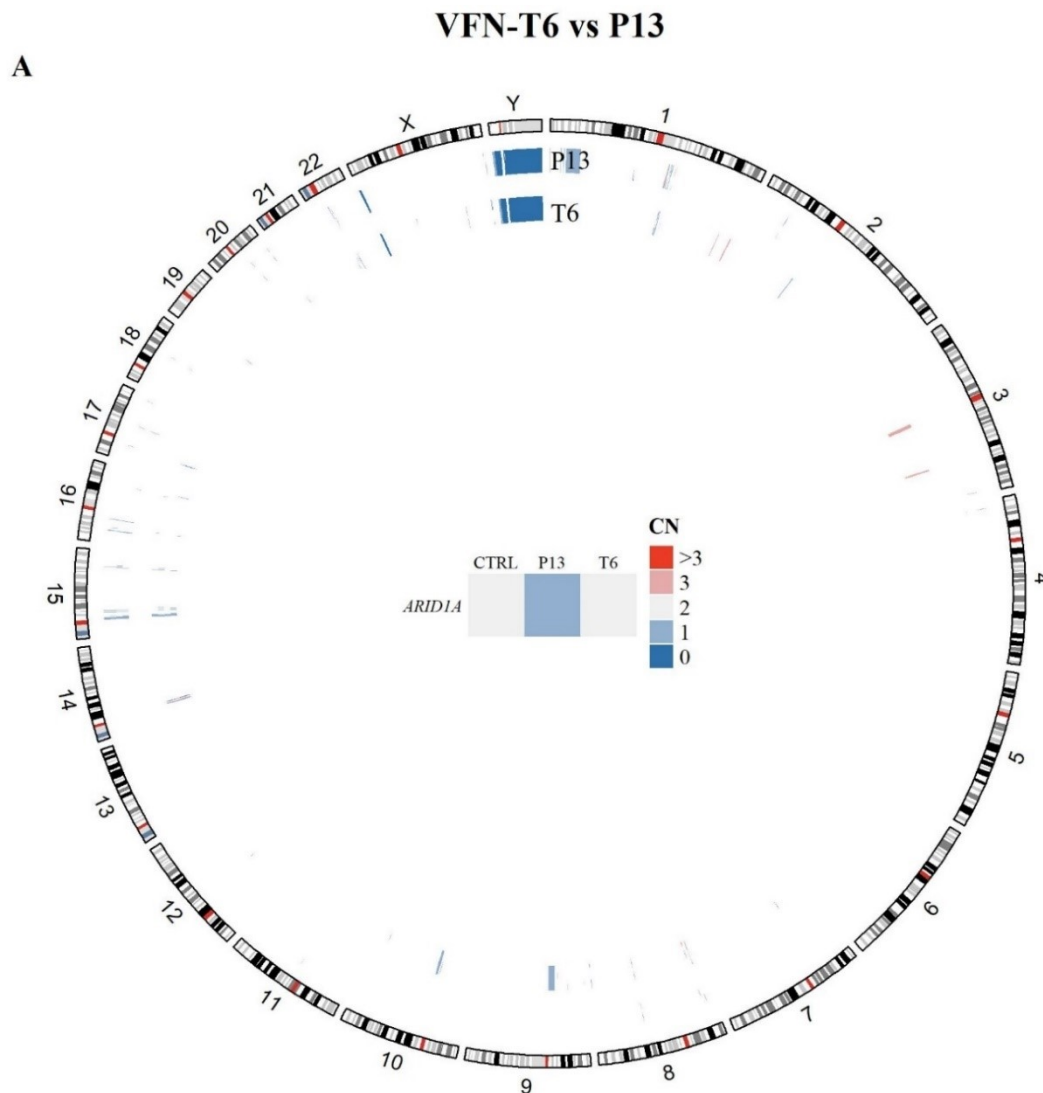
Část A. Celoxomové sekvenování (WES) původních nádorových buněk získaných od pacienta P11 (angioimunoblastický T-lymfom) a PDX modelu z těchto buněk odvozeného (VFN-T3). Kruhový ideogram ukazuje predikované počty kopií genových variant (CNVs) u vzorku tkáně získaného od pacienta (P11) a korespondujícího modelu PDX (T3). Vnější kruh znázorňuje pozice genů predikovaných CNVs. Delece genů jsou zbarveny v odstínech modré (“1”: predikovaná monoalelická delece, “0”: predikovaná bialelická delece). Amplifikace genů jsou znázorněny v odstínech červené (“3”: získání jedné alely, “>3”: získání více než jedné alely). Grafická tabulka v centru kruhu ukazuje CNV vyšetřovaných genů (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 6B,C. Výsledky WES u PDX modelu VFN-T3 vs. P11 (AITL).

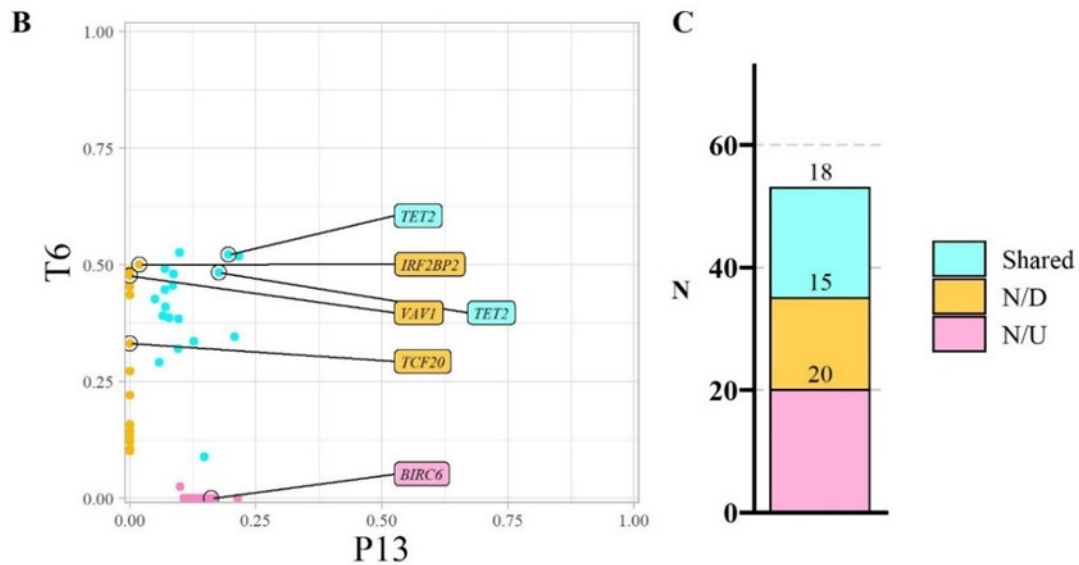
Část B. Bodový graf ukazuje frekvenci alel sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (ztracených) (N/U) u PDX modelu ve srovnání s pacientovým vzorkem, ze kterého byly získány. Body znázorňují varianty vyšetřovaných genů.

Část C. Skládaný graf ukazuje počet sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (N/U) variant u primárního lidského vzorku a PDX modelu. P pacientský vzorek, CN = počet kopií genu, CTRL = kontrolní germinální pacientská DNA, N = počet (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 7A. Výsledky WES u PDX modelu VFN-T6 vs. P13 (PTCL, NOS).

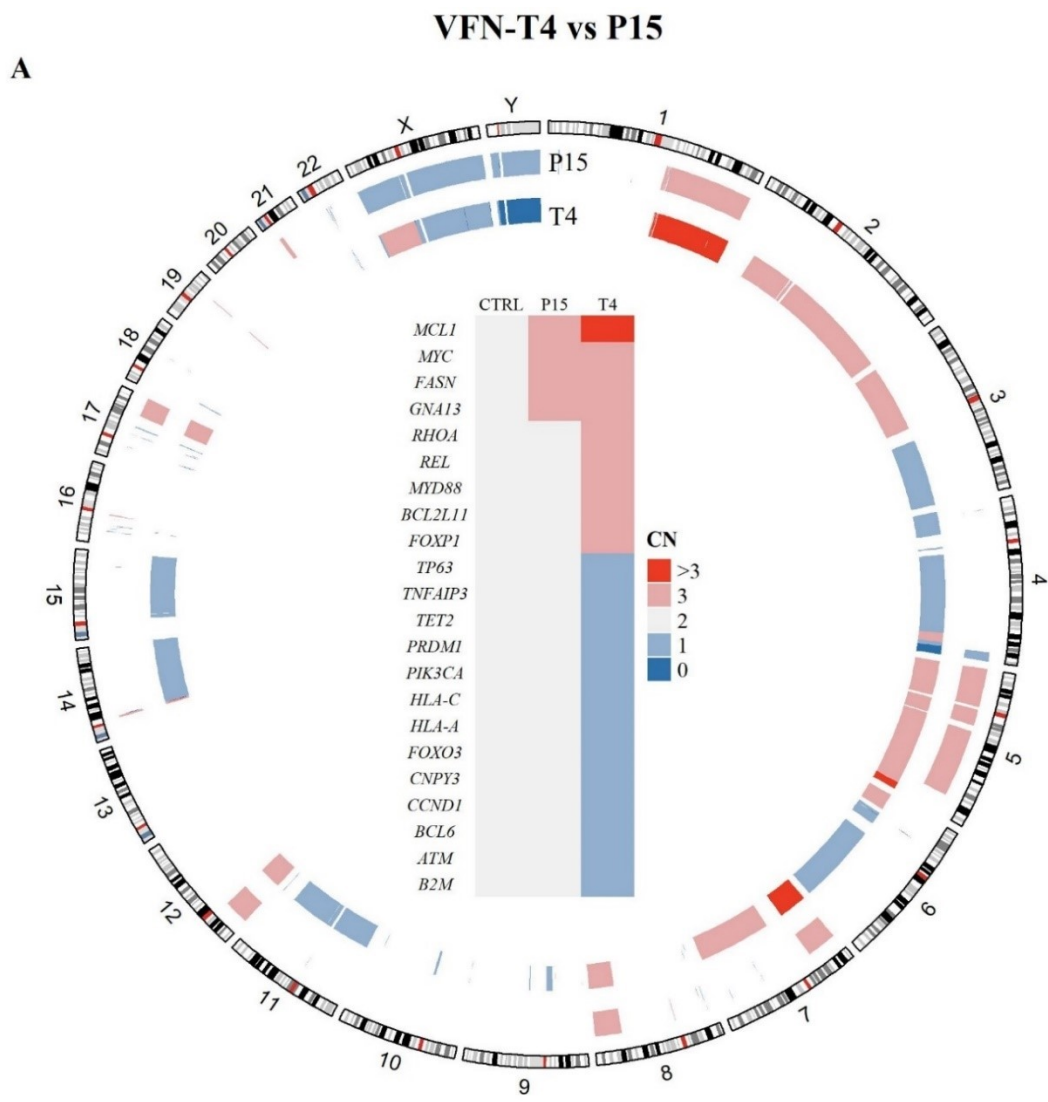
Část A. Celoexomové sekvenování (WES) původních nádorových buněk získaných od pacienta P13 (periferní T-lymfom, blíže neurčený) a PDX modelu z těchto buněk odvozeného (VFN-T6). Kruhový ideogram ukazuje predikované počty kopií genových variant (CNVs) u vzorku tkáně získaného od pacienta (P13) a korespondujícího modelu PDX (T6). Vnější kruh znázorňuje pozice genů predikovaných CNVs. Delece genů jsou zbarveny v odstínech modré (“1”: predikovaná monoalelická delece, “0”: predikovaná bialelická delece). Amplifikace genů jsou znázorněny v odstínech červené (“3”: získání jedné alely, “>3”: získání více než jedné alely). Grafická tabulka v centru kruhu ukazuje CNV vyšetřovaných genů (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 7B,C. Výsledky WES u PDX modelu VFN-T6 vs. P13 (PTCL, NOS).

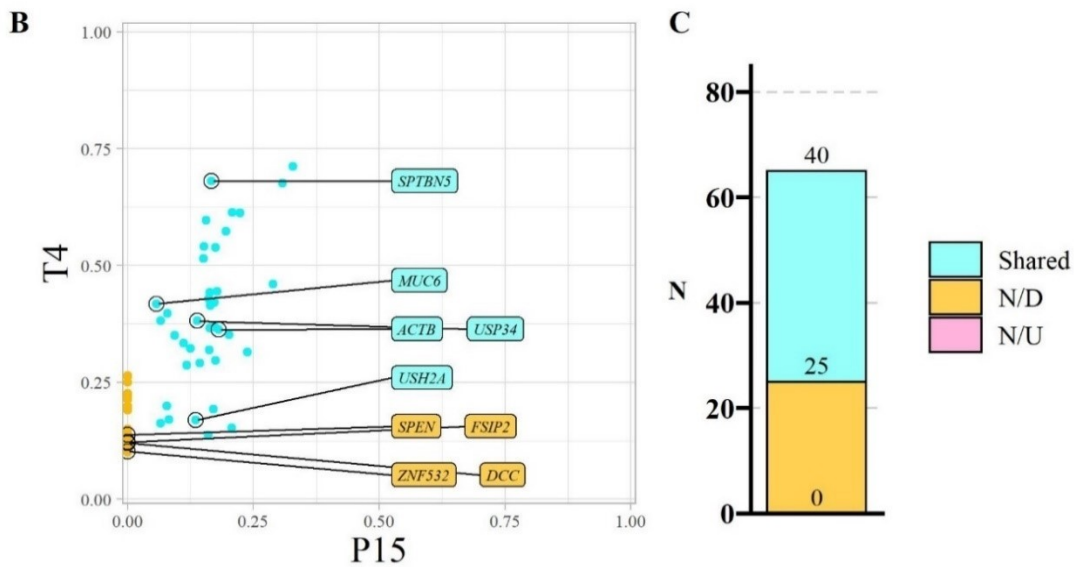
Část B: Bodový graf ukazuje frekvenci alel sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (ztracených) (N/U) u PDX modelu ve srovnání s pacientovým vzorkem, ze kterého byly získány. Body znázorňují varianty vyšetřovaných genů.

Část C: Skládaný graf ukazuje počet sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (N/U) variant u primárního lidského vzorku a PDX modelu. P patientský vzorek, CN = počet kopií genu, CTRL = kontrolní germinální patientská DNA, N = počet (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 8A. Výsledky WES u PDX modelu VFN-T4 vs. P15 (ALCL, ALK+)

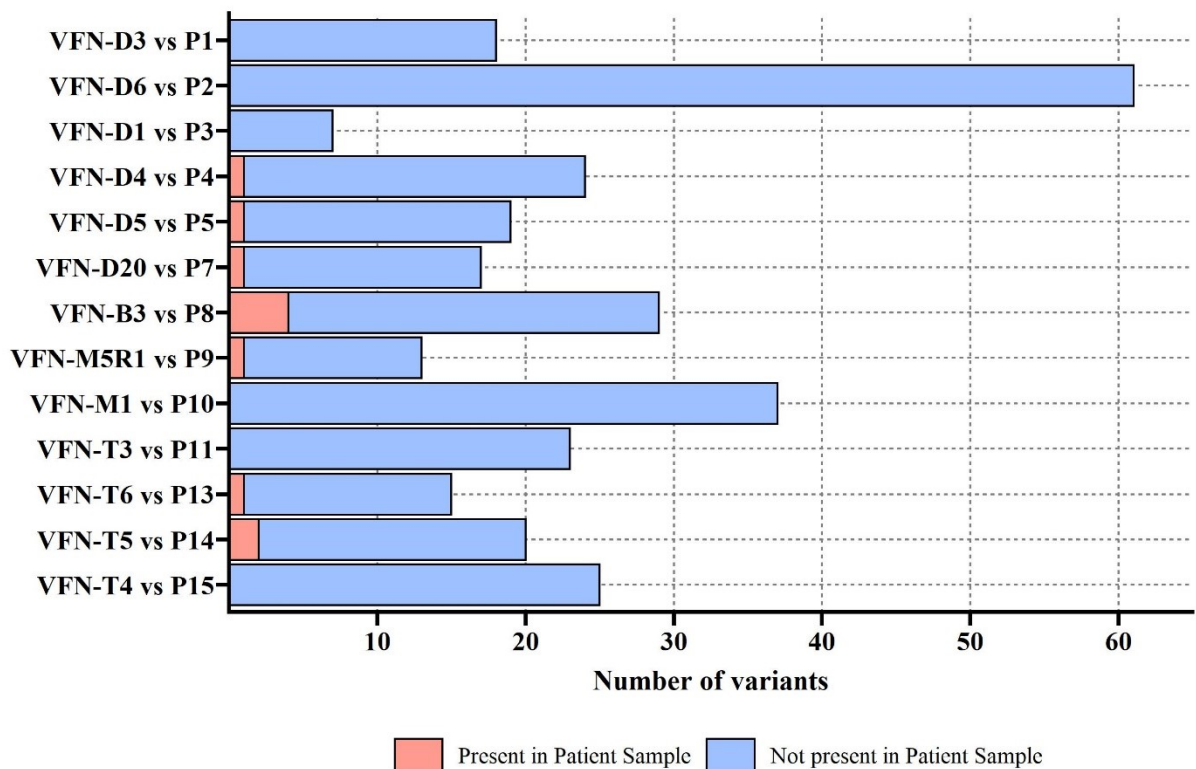
Část A. Celoxomové sekvenování (WES) původních nádorových buněk získaných od pacienta P15 (anaplastický T-lymfom, ALK-pozitivní) a PDX modelu z těchto buněk odvozeného (VFN-T4). Kruhový ideogram ukazuje predikované počty kopií genových variant (CNVs) u vzorku tkáně získaného od pacienta (P15) a korespondujícího modelu PDX (T4). Vnější kruh znázorňuje pozice genů predikovaných CNVs. Delece genů jsou zbarveny v odstínech modré (“1”: predikovaná monoalelická delece, “0”: predikovaná bialelická delece). Amplifikace genů jsou znázorněny v odstínech červené (“3”: získání jedné alely, “>3”: získání více než jedné alely). Grafická tabulka v centru kruhu ukazuje CNV vyšetřovaných genů (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 8B,C. Výsledky WES u PDX modelu VFN-T4 vs. P15 (ALCL, ALK+).

Část B. Bodový graf ukazuje frekvenci alel sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (ztracených) (N/U) u PDX modelu ve srovnání s pacientovým vzorkem, ze kterého byly získány. Body znázorňují varianty vyšetřovaných genů.

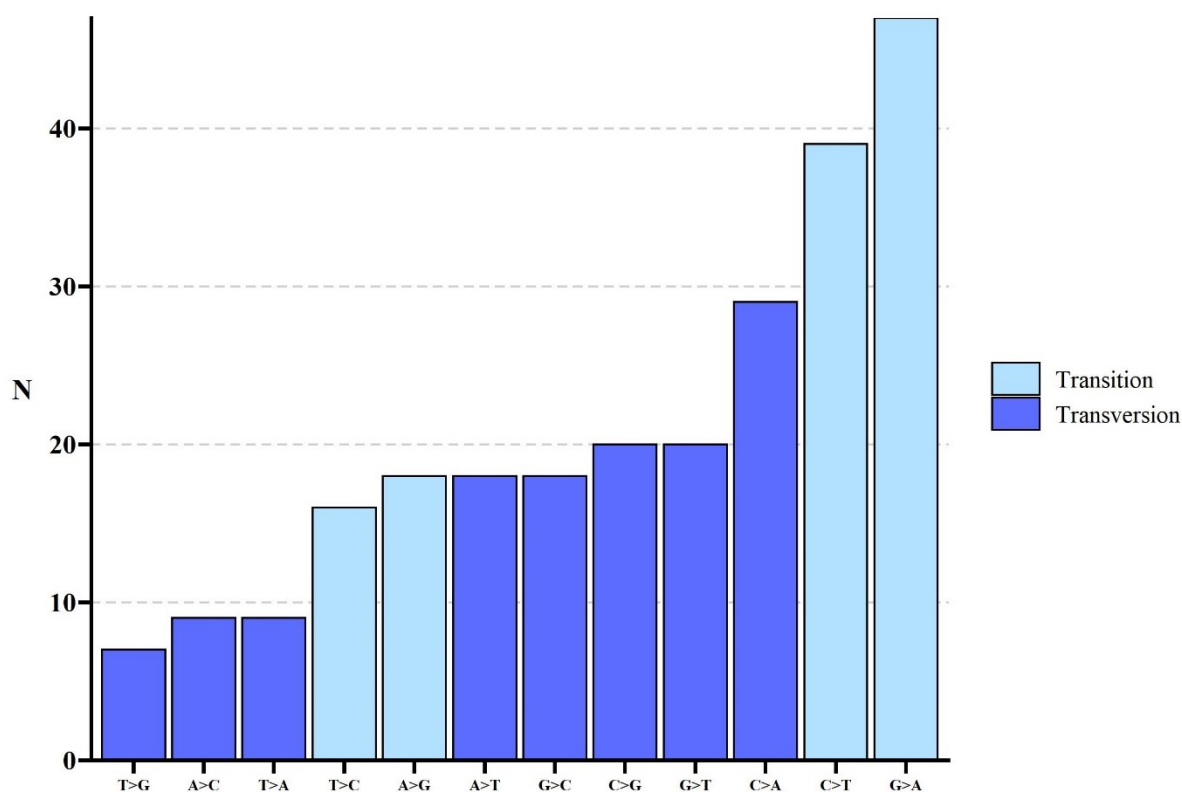
Část C. Skládaný graf ukazuje počet sdílených, nově získaných (N/D) a nově nedetekovaných (N/U) variant u primárního lidského vzorku a PDX modelu. P pacientský vzorek, CN = počet kopií genu, CTRL = kontrolní germinální pacientská DNA, N = počet (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 9. Grafické vyjádření poměru N/U a N/D mutací u PDX modelů.

Většina N/D mutací zjištěných u PDX modelů nebyla detekována u příslušného primárního (pacientského) lymfomového vzorku.

Vysvětlivky: osa X: počet nově detekovaných (N/D) mutací u PDX modelů, osa Y: N/D mutace detekované u PDX modelů ve srovnání s příslušnými primárními pacientskými vzorky (P1-P15), modrá barva (“*Not present in Patient Sample*”) - N/D mutace, jež nebyly identifikovány u primárních pacientských vzorků (frekvence alel = 0), červená barva (“*Present in Patient Sample*”) - N/D mutace, jež byly detekovány u primárních pacientských vzorků, avšak frekvence alel nedosahovala hranice 10 % (Jaksa et al., 2022).



Obrázek č. 10. Analýza substituce nukleotidů u N/D mutací poukazuje na mechanismus somatických hypermutací v procesu vzniku *de novo* mutací u PDX modelů.

A: adenin; C: cytosin; G: guanin; T: thymin; N: počet N/D mutací u všech PDX modelů. Znaménko “>” = záměna za (substituce) (Jaksa et al., 2022).

Závěr 1: Výsledky WES dokazují, že genetický profil PDX myších modelů je z hlediska sdílených mutací srovnatelný s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly odvozeny, včetně zachování genetické heterogenity lymfomových populací. Z genetického hlediska tudíž PDX modely představují relevantní modely agresivních lymfomů. Přítomnost nově detekovaných mutací, včetně mutací rekurentně nacházených u pacientů s lymfomy, svědčí pro biologický vývoj lymfomové populace během její propagace v myším organismu (např. z důvodu pokračující somatické hypermutace).

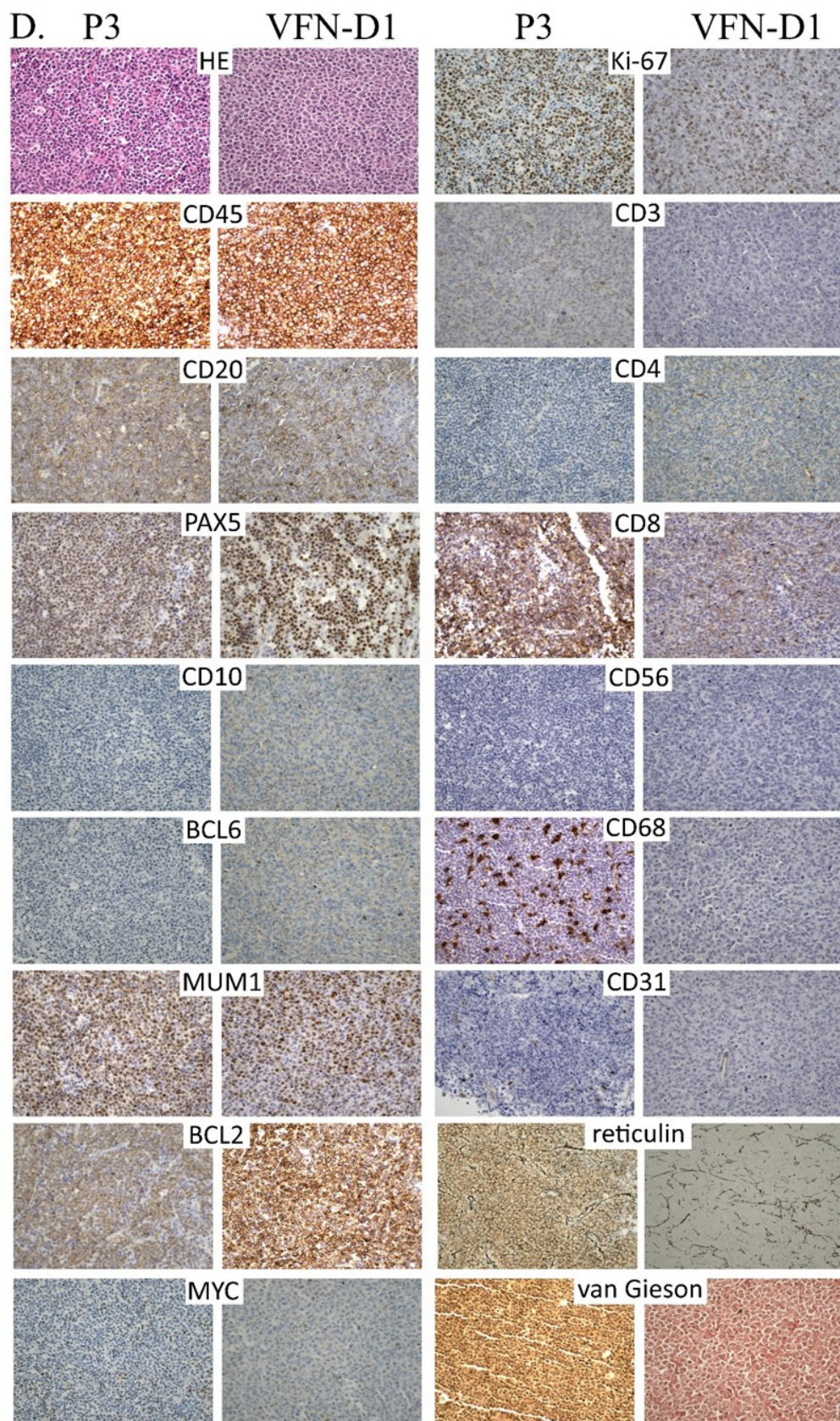
4.3. Histopatologické porovnání PDX modelů a primárních nádorů

U některých PDX modelů DLBCL byly ve srovnání s primárními lidskými nádory pozorovány znaky vyšší agresivity onemocnění v podobě větší velikosti nádorových buněk (blastů) či přítomnosti většího počtu blastů a / nebo vyšší stupeň pleomorfie (tvarových a velikostních nepravidelností), jmenovitě (VFN-D3, VFN-D5, DLBCL). U zbylých modelů byla morfologie nádorových buněk srovnatelná. Imunofenotyp všech B-NHL u PDX modelů zůstal ve srovnání s primárními vzorky prakticky shodný, zaznamenány byly pouze mírné rozdíly jako snížení intenzity exprese cyklinu D1 a SOX11 u lymfomů z plášťové zóny (VFN M5R1 a VFN-M1). Viditelnější změny imunofenotypu byly pozorovány u PDX modelů odvozených od pacientů s T-lymfomy. U periferního T-lymfomu, blíže nespecifického (VFN-T6 vs P13) byla ve srovnání s primárním nádorem zjištěna zvýšená exprese CD30, CD4 a CD5, a naopak redukce exprese CD8, ztráta exprese CD7 a snížení exprese cytotoxických granul. Podobně jsme zaznamenali jisté změny imunofenotypu u dalších případů T-NHL, u ALK negativního ALCL (VFN-T5) se jednalo ztrátu exprese CD3 a zvýšení exprese CD4. V posledním ze studovaných T-NHL (ALK pozitivní ALCL) byla nově zaznamenána exprese znaku CD5. U jednoho z případů AITL (VFN-T3) došlo ve srovnání s primárním vzorkem k proliferaci blastických, EBER-pozitivních B-lymfocytů. V žádném z případů AITL (VFN-T3 a VFN-T7) nebyla u PDX modelů zjištěna přítomnost lidských folikulárních dendritických buněk, jejichž expanze je pro AILT typická.

U velké většiny PDX modelů došlo ke zvýšení proliferační aktivity (Ki-67 indexu), pouze ve třech případech PDX modelů - VFN-D20 (DLBCL), VFN-M5R1 (MCL) a VFN-T7 (AITL) - došlo ke snížení proliferačního indexu a ve třech případech – VFN-D1 (DLBCL), VFN-M1 (MCL) a VFN-T (ALK negativní ALCL) se proliferační aktivita PDX modelu shodovala nebo více méně odpovídala primárnímu nádoru. Přítomnost reziduálních lidských T lymfocytů byla pozorována jen u několika málo PDX modelů, ve všech případech šlo o DLBCL. Přítomnost

lidských makrofágů byla zaznamenána pouze u případů VFN-D12 (DLBCL) a VFN-T4 (ALK pozitivní ALCL). Nejviditelnější byla absence lidských makrofágů u případu PTCL, NOS (VFN-T6, primárně se jednalo u tzv. Lennertovu variantu s účastí četných epiteloidních histiocyty). Infiltrace myšími makrofágy v xenotransplantovaných nádorech nebyla zjištěna ani v jednom případě PDX modelů navzdory tomu, že jsme jejich přítomnost ověřili imunohistochemicky v kontrolních vzorcích ze sleziny, jater a kostní dřeně u zdravého zvířete. CD56 pozitivní NK buňky nebyli zachyceny u žádného z PDX modelů.

Úroveň vaskularizace byla u PDX modelů ve srovnání s primárními nádory ze semikvantitativního pohledu zřetelně nižší, omezovala se na velmi řídkou síť kapilár. Rozdíly v úrovni vaskularizace vynikaly zejména u případů angioimunoblastických lymfomů (VFN-T3, VFN-T7). Imunohistochemickým průkazem myšího antigenu CD31 bylo zjištěno, že se jednalo výhradně o myší cévy, přítomnost lidských endotelových CD31 pozitivních buněk u PDX modelů jsme neprokázali. Přítomnost nekróz byla zaznamenána u dvou PDX modelů DLBCL (VFN-D4 a VFN-D12), u prvního uvedeného případu byly přítomny nekrózy také u primárního nádoru. Pouze v jednom PDX modelu byla zaznamenána výraznější fibrotizace intersticia (VFN-T4, ALK negativní ALCL).



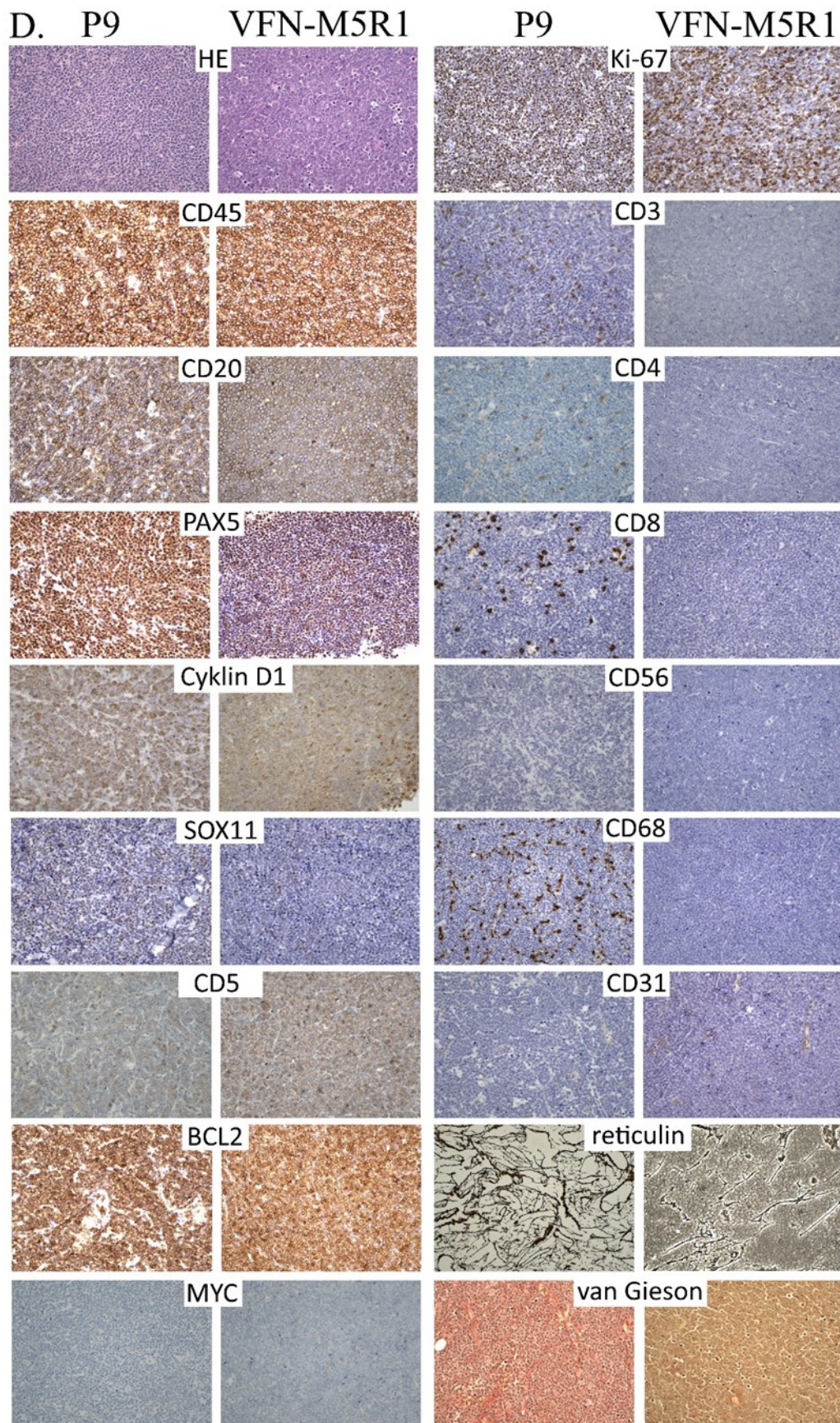
Obrázek č. 11 VFN-D1 vs. P3 (DLBCL-non GC)

(Jaksa et al., 2022)

Tabulka č. 8. VFN-D1 vs. P3 (DLBCL-non GC), popis snímků v obrázku č. 11.

Antigen	P3	VFN-D1
HE	střední až velké buňky podobné centroblastům, morfolgie částečně ovlivněna autolýzou (nádor diagnostikován ve střevě)	značně pleomorfní velké blasty s tvarově a velikostně nepravidelnými jádry, většina s jemným chromatinem a několika jádérky, jiné buňky hyperchromní
nekrózy	bez nekróz	bez nekróz
CD45	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD20	membránové 2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
PAX5	jaderné 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	jaderné 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD10	negativní	negativní
BCL6	negativní	negativní
MUM1	jaderné 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	jaderné 2-3+ pozitivita v 95 % nádorových buněk
BCL2	cytoplazmatické 2-3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	cytoplazmatické 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
MYC	jaderné 1-2+ v méně než 1 % nádorových buněk	jaderné 1-2+ pozitivita ve 30 % nádorových buněk
Ki-67	95 %	95 %
CD3	membránové 2-3+ pozitivita v ojedinělých malých T lymfocytech	negativní
CD4	membránové 1+ pozitivita v T lymfocytech	negativní
CD8	membránové 3+ pozitivita v T lymfocytech	negativní
CD56	negativní	negativní
CD68	cytoplazmatické 3+ pozitivita v četných histiocytech	negativní
CD31	řidká síť kapilár, pozitivita v ojedinělých histiocytech	ojedinělé kapiláry (myši)
retikulum	řidká síť jemných, ojediněle hrubých křížících se retikulárních, občas kolagenních vláken (G1-2)	bez fibrózy (G0)
van Gieson	řidká síť kolagenních vláken	bez fibrózy (G0)

Histopatologické porovnání morfolgie nádorových buněk ukazuje na vyšší stupeň pleomorfie u PDX modelu. Imunofenotyp (včetně aberantní exprese CD8, a to i u PDX modelu) a proliferační aktivita jsou shodné. U PDX modelu nebyla zaznamenána přítomnost T lymfocytů, makrofágů ani (stejně jako v primárním nádoru) NK buněk. Úroveň fibrotizace je v obou případech shodná.

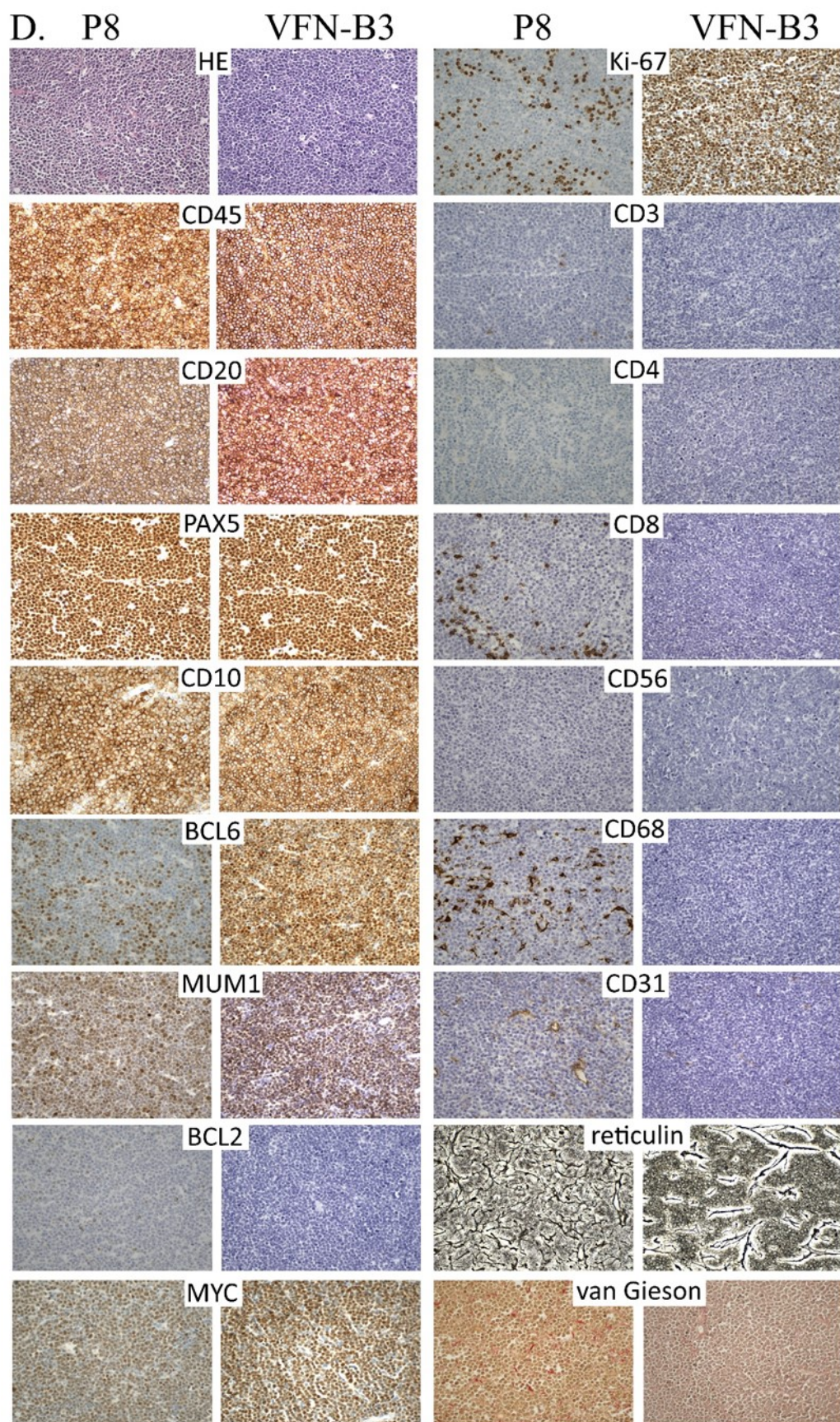


Obrázek č. 12 VFN-M5R1 vs. P9 (lymfom z buněk pláště) (Jaksa et al., 2022)

Tabulka č. 9. VFN-M5R1 vs. P9 (MCL), popis snímků v obrázku č. 12.

Antigen	P9	VFN-M5R1
HE	středně velké blastoidní buňky s lehce tvarově nepravidelnými jádry, četné mitózy	velké okrouhlé uniformní blasty, četné mitózy a apoptózy
nekrózy	bez nekróz	bez nekróz
CD45	membránové 3+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk	membránové 3+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk
CD20	membránové 2+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk	membránové 2+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk
PAX5	jaderné 3+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk	jaderné 1-2+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk
cyklin D1	jaderné 2+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk	jaderné 1-2+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk
SOX11	jaderné 2+ pozitivivity ve 60-70 % nádorových buněk	jaderné 1-2+ pozitivivity ve 30 % nádorových buněk
CD5	membránové 1-2+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk	membránové 2+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk
BCL2	cytoplazmatické 3+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk	cytoplazmatické 3+ pozitivivity ve 100 % nádorových buněk
MYC	jaderné 1+ pozitivivity jen v ojedinělých nádorových buňkách	negativní (slabé pozadí)
Ki-67	95 %	85-90 %
CD3	membránové 2-3+ pozitivivity v řídké disperzních malých T lymfocytech	negativní
CD4	membránové 2+ pozitivivity v T lymfocytech	negativní
CD8	membránové 3+ pozitivivity v T lymfocytech	negativní
CD56	negativní	negativní
CD68	cytoplazmatické 3+ pozitivivity v disperzních histiocytech	negativní
CD31	řidká síť kapilár	řidká síť kapilár (myších)
retikulum	difúzní síť hrubějších křížících se retikulárních vláken (G1-2)	bez fibrózy (G0)
van Gieson	řidká síť jemných kolagenních vláken (G1-2)	bez fibrózy (G0)

Morfologie nádorových buněk u PDX v přehledném barvení HE je odlišná, bastické lymfocyty jsou sice uniformnější, zato však zřetelně větší, imunofenotyp je shodný, pouze intenzita exprese cyklinu D1 je slabší, totéž pozorováno u antigenu SOX11, zde exprese nižší i z kvantitativního hlediska (ve zřetelně nižším počtu buněk). Přítomnost lidských lymfocytů, makrofágů ani NK buněk neprokázána, úroveň vaskularizace byla semikvantitativně zhruba na stejné úrovni. U PDX modelu nebyla, na rozdíl od primárního nádoru, zjištěna výraznější fibrotizace.

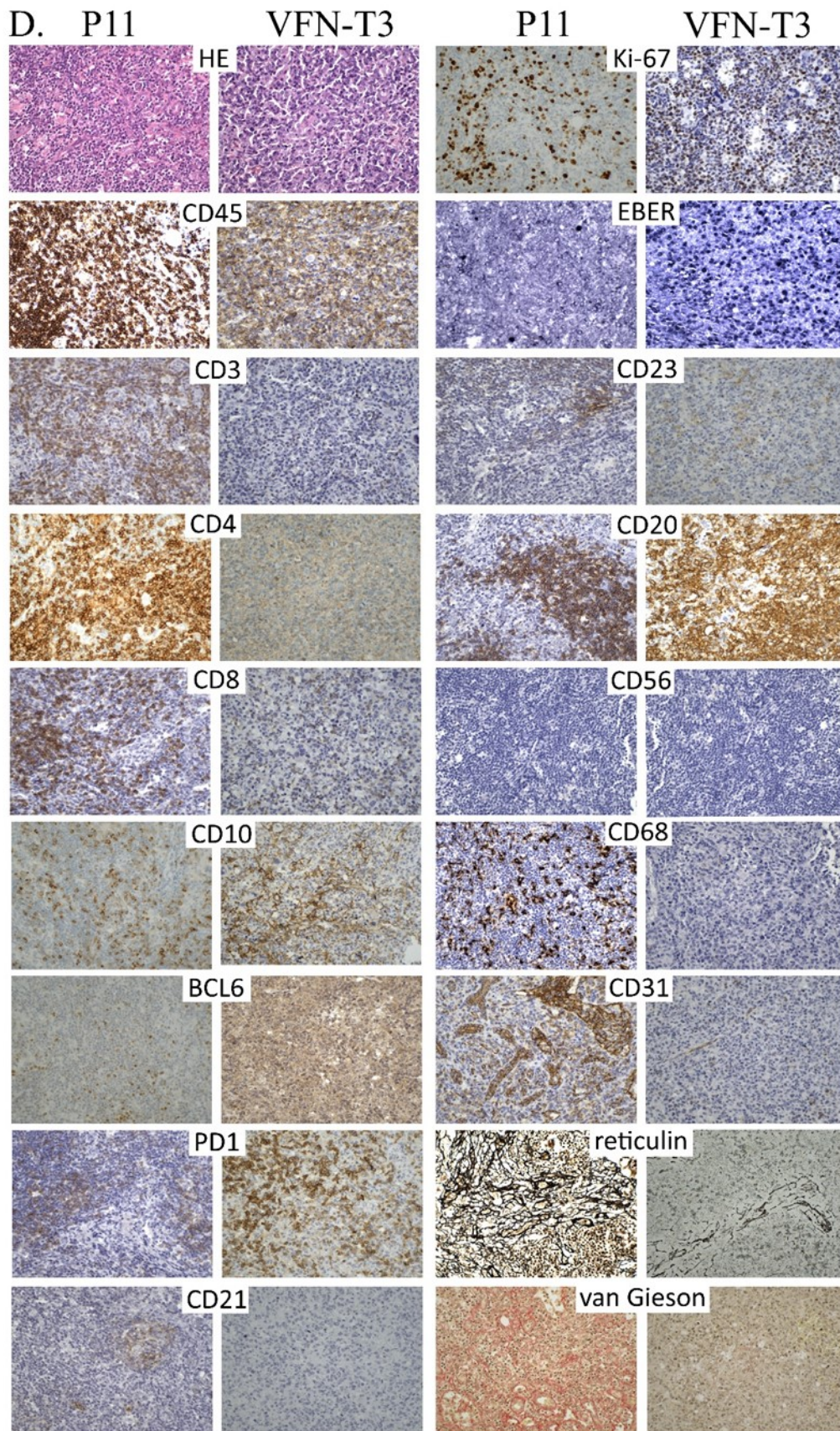


Obrázek č. 13. VFN-B3 vs. P8 (Burkittův lymfom) (Jaksa et al., 2022)

Tabulka č. 10. VFN-B3 vs. P8 (BL), popis snímků v obrázku č. 13.

Antigen	P8	VFN-B3
HE	velké blasty s „hrnatými“ jádry, občasné pleomorfní buňky, četné mitózy	velké blasty s „hrnatými“ jádry, početné mitózy
nekrózy	bez nekróz	bez nekróz
CD45	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD20	membránové 2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD10	membránové 2-3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
BCL6	jaderné 3+ pozitivita ve 30 % nádorových buněk	jaderné 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
MUM1	jaderné 2-3+ pozitivita ve 95 % nádorových buněk	jaderné 2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
BCL2	cytoplazmatické 1+ pozitivita v ojedinělých nádorových buňkách a občasných malých lymfocytech	negativní
MYC	jaderné 2+ pozitivita v 95 % nádorových buněk	jaderné 2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
Ki-67	20 %	95 %
CD3	membránové 1-2+ pozitivita v ojedinělých malých T lymfocytech	negativní
CD4	membránové 1+ pozitivita v ojedinělých malých T lymfocytech	negativní
CD8	membránové 3+ pozitivita v řídké disperzních malých T lymfocytech	negativní
CD56	negativní	negativní
CD68	cytoplazmatické 3+ pozitivita in disperzních histiocytech	negativní
CD31	četnější drobné cévy (převážně kapiláry)	velmi řídká síť kapilár (myších)
retikulum	bez fibrózy (G0)	bez fibrózy (G0)
van Gieson	bez fibrózy (G0)	bez fibrózy (G0)

Morfologie nádorových buněk je o primárního nádoru i PDX modelu shodná, shoduje se i imunofenotyp, zcela neobvyklá byla nízká proliferační aktivita nádorových buněk u primárního vzorku. Lidské T lymfocyty, makrofágy ani NK buňky u PDX modelu neprokázány, semikvantitativně pozorována nižší úroveň vaskularizace u PDX modelu, fibrotizace nebyla vyjádřena.

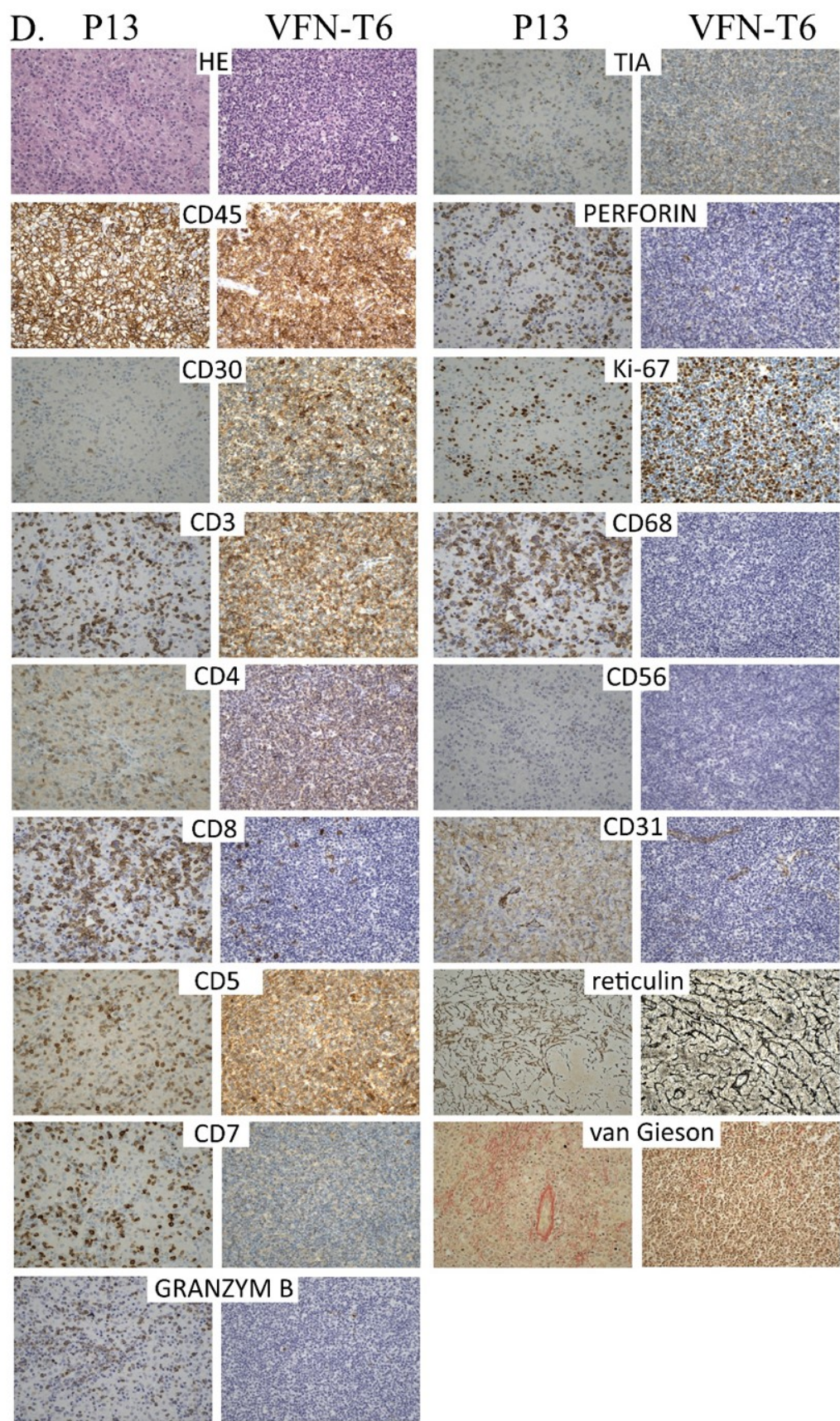


Obrázek č. 14. VFN-T3 vs. P11 (angioimunoblastický T lymfom)(Jaksa et al., 2022)

Tabulka č. 11. VFN-T3 vs. P11 (AITL), popis snímků v obrázku č. 14.

Antigen	P11	VFN-T3
HE	převážně malé buňky, občasné velké blasty, četné cévy různého kalibru na pozadí	směs malých a velkých nádorových buněk
nekrózy	bez nekróz	bez nekróz
CD45	membránové 1+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk, 3+ pozitivita v malých lymfocytech	membránové 1-2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD3	membránové 1-2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	negativní
CD4	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 1-2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD8	membránové 3+ pozitivita ve 50-60 % nádorových buněk	jaderné 1+ pozitivita v ojedinělých nádorových buněk
CD10	membránové 2+ pozitivita ve 40 % nádorových buněk	membránové 2+ pozitivita v ojedinělých nádorových buňkách, četné pozitivita ve stromálních buňkách na pozadí
BCL-6	jaderné 1-2+ pozitivita ve 30 % nádorových buněk	nespecifické cytoplazmatické pozitivita v nádorových buňkách, jaderné pozitivita jen ojedinělé
PD-1	membránové 1-2+ pozitivita ve 30 % nádorových buněk	membránové 2-3+ pozitivita v 50 % nádorových buněk
CD21	membránové a cytoplazmatické 1-2+ pozitivita ve fragmentované síti dendritických buněk	negativní
Ki-67	40 %	90 %
EBER	jaderné pozitivita ve sporadických buňkách	jaderné pozitivita v 60 % nádorových buněk
CD23	membránové 2-3+ pozitivita v řídké disperzní ve fragmentované síti dendritických buněk	negativní (nespecifické cytoplazmatické pozitivita v nádorových buňkách)
CD20	membránové 1-2+ pozitivita v disperzních malých B lymfocytech	membránové 3+ pozitivita v četných velkých B lymfocytech
CD56	negativní	negativní
CD68	cytoplazmatické 3+ pozitivita v disperzních histiocytech	negativní
CD31	výrazná síť cév různého kalibru	řídká síť kapilár (myších)
retikulum	hustá síť hrubých křížicích se retikulárních a jemných kolagenních vláken (G2-3)	bez fibrózy (G0)
van Gieson	síť křížicích se jemných kolagenních (G2-3)	bez fibrózy (G0)

V barvení HE je zřetelná výrazně rozdílná morfologie nádorových buněk u primárního nádoru a PDX modelu. Zatímco u primárního nádoru se jednalo o směs převážně malých buněk s občasnými velkými blasty a charakteristickou proliferací cév různého kalibru, u PDX modelu se jednalo o převážně velké buňky s absencí výraznějších cév na pozadí. Rozdílný byl i imunofenotyp (exprese CD3, CD4 a CD8, CD10 a částečně i BCL-6). Folikulární dendritické buňky u primárního nádoru nebyly výrazněji zmnoženy, u PDX modelu zcela chyběly. U PDX modelu navíc došlo k proliferaci velkých blastických CD20+ EBER+ B lymfocytů a s tím spojené proliferativní aktivity (Ki-67). Makrofágy, NK buňky ani přesvědčivé nenádorové T lymfocyty nebyly u PDX modelu nerokázány, stejně tak ne proliferace cév a fibrotizace.

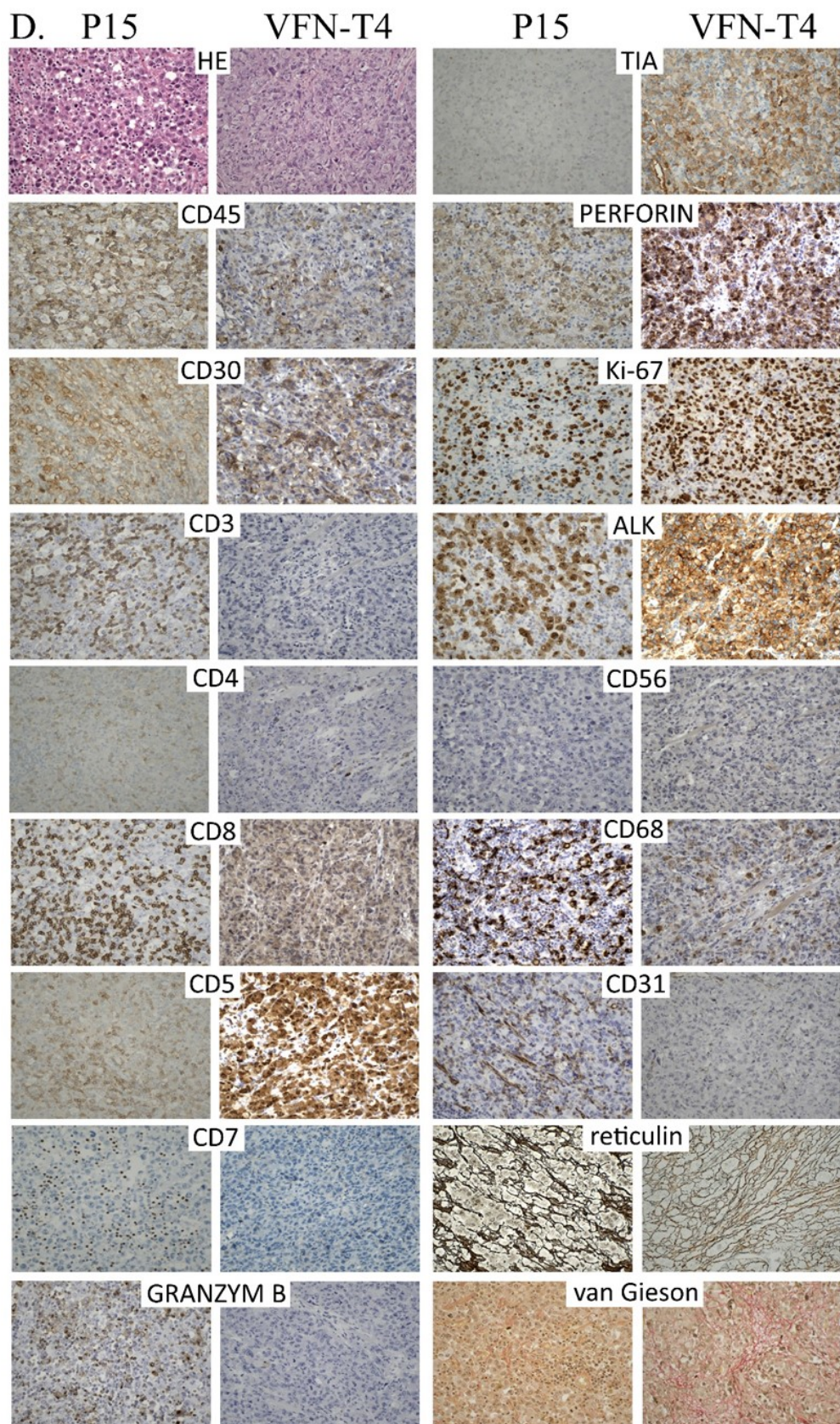


Obrázek č. 15. VFN-T6 vs. P13 (periferní T lymfom, nespecifikovaný)
 (Jaksa et al., 2022).

Tabulka č. 12. VFN-T6 vs. P13 (PTCL, NOS), popis snímků v obrázku č. 15.

Antigen	P13	VFN-T6
HE	směs malých, středních a velkých nádorových buněk, občasné pleomorfní buňky, na pozadí epiteloidní histiocyty	převážně malé a střední, ojediněle velké blastické až pleomorfní nádorové buňky, histiocyty nepozorovány
nekrózy	bez nekróz	bez nekróz
CD45	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD30	membránové 1+ pozitivita v ojedinělých nádorových buňkách a plazmocycitech	membránové a cytoplazmatické 2-3+ pozitivita v 60-70 % nádorových buněk
CD3	membránové 3+ pozitivita v četných malých T lymfocycitech a ojedinělých nádorových buňkách	membránové 2-3+ pozitivita v 90 % nádorových buněk
CD4	membránové 2+ pozitivita v četných malých T lymfocycitech a 1+ v histiocytech	membránové 1-2+ pozitivita ve 90 % nádorových buněk
CD8	membránové 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 3+ pozitivita v ojedinělých T lymfocycitech, spíše nádorových.
CD5	membránové 2-3+ pozitivita v četných malých T lymfocycitech	membránové 2-3+ pozitivita ve nádorových T lymfocycitech
CD7	membránové 3+ pozitivita v četných malých T lymfocycitech	membránové 1+ pozitivita ve většině nádorových T lymfocytů
Granzym B	cytoplazmatické 2+ pozitivita v četných malých T lymfocycitech a mnohých nádorových buňkách	cytoplazmatické 2-3+ pozitivita v ojedinělých malých T lymfocycitech
TIA	cytoplazmatické 2+ pozitivita v malých T lymfocycitech	cytoplazmatické 2+ pozitivita v malých T lymfocycitech (slabé nespecifické pozitivita na pozadí)
perforin	cytoplazmatické 2-3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk a některých malých T lymfocycitech	cytoplazmatické 2+ pozitivita v ojedinělých malých T lymfocycitech
Ki-67	60-70 %	80 %
CD68	cytoplazmatické 3+ pozitivita v četných histiocytech	negativní
CD56	negativní	negativní
CD31	membránové 1+ pozitivita v histiocytech, řídká síť kapilár a postkapilárních venul	velmi řídká síť kapilár (myších)
retikulum	nepřavidelná řídká síť křížících se jemných retikulárních a kolagenních vláken (G1-2)	bez fibrózy (G0)
van Gieson	nepřavidelná řídká síť křížících se jemných kolagenních vláken (G1-2)	bez fibrózy (G0)

V přehledném barvení HE je viditelná zřetelná absence epiteloidních histiocyty u PDX modelu (původně jse jednalo o tzv. Lennertovu variantu PTCL), což potvrzeno i imunohistochemicky. Rozdíly pozorovány i v imunofenotypu – exprese CD3, CD4, CD8 a CD30 má u PDX modelu prakticky „inverzní“ charakter, navíc, s výjimkou TIA došlo k redukcii exprese ostatních cytotoxických granul. U PDX modelů neprokázána přítomnost lidských makrofágů ani NK buněk, posouzení přítomnosti nenádorových lidských T lymfocytů je v tomto případě obtížné, spíše absentují. Semikvantitativně zřetelně nižší úroveň vaskularizace. Fibrotizace není vyjádřena.



Obrázek č. 16 VFN-T4 vs. P15 (anaplastický velkobuněčný T lymfom, ALK+)
 (Jaksa et al., 2022)

Tabulka č. 13. VFN-T4 vs P15 (ALCL, ALK+), popis snímků v obrázku č. 16.

Antigen	P15	VFN-T4
HE	velké atypické „ledvinovité“ či „podkovovité“ (diagnostické) nádorové buňky četné mitózy a apoptózy, na pozadí řídké malé lymfocyty	četné diagnostické buňky, větší pleomorfie některých nádorových buněk, žádné malé lymfocyty na pozadí
nekrózy	bez nekróz	bez nekróz
CD45	membránové 1+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk a 3+ v malých T lymfocytech	membránové 2-3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD30	membránové 1-2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	membránové 2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD3	membránové 2-3+ pozitivita v malých T lymfocytech	negativní
CD4	membránové 1+ pozitivita v malých T lymfocytech	membránové 1-2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD8	membránové 3+ pozitivita v malých T lymfocytech	negativní
CD5	membránové 1+ pozitivita v malých T lymfocytech	membránové a cytoplazmatické 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
CD7	membránové 3+ pozitivita v disperzních malých T lymfocytech	negativní
Granzym B	cytoplazmatické 2-3+ pozitivita v některých nádorových buňkách a T lymfocytech	negativní
TIA	cytoplazmatické 1-2+ pozitivita v některých nádorových buňkách a T lymfocytech	cytoplazmatické 2-3+ pozitivita v 90 % nádorových buněk
perforin	cytoplazmatické 2+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	cytoplazmatické 3+ pozitivita v 100 % nádorových buněk
ALK	cytoplazmatické 2-3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk	cytoplazmatické 3+ pozitivita ve 100 % nádorových buněk
Ki-67	70-80 %	100 %
CD68	cytoplazmatické 3+ pozitivita v četných histiocytech	cytoplazmatické 2-3+ pozitivita v řídké disperzních histiocytech a některých nádorových buňkách
CD56	negativní	negativní
CD31	hustá síť četných kapilár	velmi řídká síť kapilár (myších)
retikulum	bez fibrózy (G0)	hustá síť křížících se hrubých retikulárních a kolagenních vláken (G2)
van Gieson	bez fibrózy (G0)	hustá síť křížících se hrubých kolagenních vláken (G2)

Morfologie nádorových buněk je v barvení HE srovnatelná, u primárního nádoru četnější apoptózy a mitózy, zřetelná je řídká populace malých lymfocytů na pozadí. Rozdílná je exprese antigenů CD3, CD4, CD5 a CD7, intenzita exprese CD30 a CD45 a na rozdíl od primárního nádoru je více vyjádřen cytotoxický imunofenotyp. U PDX modelu je vyšší i Ki-67 index. Přítomnost malých T lymfocytů na pozadí se hodnotí obtížně, zdá se však, že chybí. Zachyceny však CD68+ lidské histiocyty. Úroveň vaskularizace hodnocená semikvantitativně je u pDX modelu na zřetelně nižší úrovni. Naopak, více (oproti primárnímu nádoru) vyjádřena fibrotizace.

4.4. Vyšetření parametrů neovaskularizace (MVA a MVD)

Vyšetření mikrovaskulární density (MVD) a mikrovaskulární plochy (MVA) bylo provedeno u čtyřech PDX modelů B-NHL a příslušných korespondujících primárních vzorků (P-3-VFN-D1, P-5-VFN-D5, P9-VFN-M5R1 a P10-VFN-M1). U všech případů byly zjištěny signifikantně nižší hodnoty MVD i MVA u PDX modelů ve srovnání s primárními nádory: P3 (DLBCL-non GC) průměrná hodnota MVD 142,5 / 1 mm² při standardní odchylce (SD) 20,7 a průměrná MVA 20,6 ‰ při SD 8,3 versus PDX (VFN-D1) průměrná hodnota MVD 78 / 1 mm² při SD 19,7, průměrná MVA 2,5 ‰ při SD 0,3 (2,1x vyšší MVD a 8,6x vyšší MVA ve prospěch primárního vzorku); P5 (DLBCL, non GC) průměrná hodnota MVD 102,7 / 1 mm² při SD 19,3, průměrná MVA 23,6 ‰ při SD 4,6 versus PDX (VFN-D5), kde průměrná hodnota MVD 67,6 / 1 mm² při SD 11,0, průměrná MVA 6,9 ‰ při SD 2,8 (1,5x vyšší MVD a 3,4x vyšší MVA ve prospěch primárního vzorku); P9 (MCL) průměrná hodnota MVD 276,8 / 1 mm² při SD 21,6, průměrná MVA 22,7 ‰ při SD 3,3 versus PDX (VFN-M5R1), kde průměrná hodnota MVD 103,8 / 1 mm² při SD 11,1, průměrná MVA 5,9 ‰ při SD 1,2 (2,7x vyšší MVD a 3,8x vyšší MVA ve prospěch primárního vzorku) a P10 (MCL) průměrná hodnota MVD 150,9 / 1 mm² při SD 19,8, průměrná MVA 47,3 ‰ při SD 10,9 versus PDX (VFN-M10), kde průměrná hodnota MVD 97,6 / 1 mm² při SD 25,1, průměrná MVA 8,5 ‰ při SD 2,8 (1,5x vyšší MVD a 5,6x vyšší MVA ve prospěch primárního vzorku). Výsledky morfometrické analýzy tak podporují histopatologická pozorování. Kompletní výsledky shrnuje tabulka číslo 13.

Tabulka č. 14. Kvantifikace intratumorální mikrovaskulární denzity (MVD) a plochy (MVA).

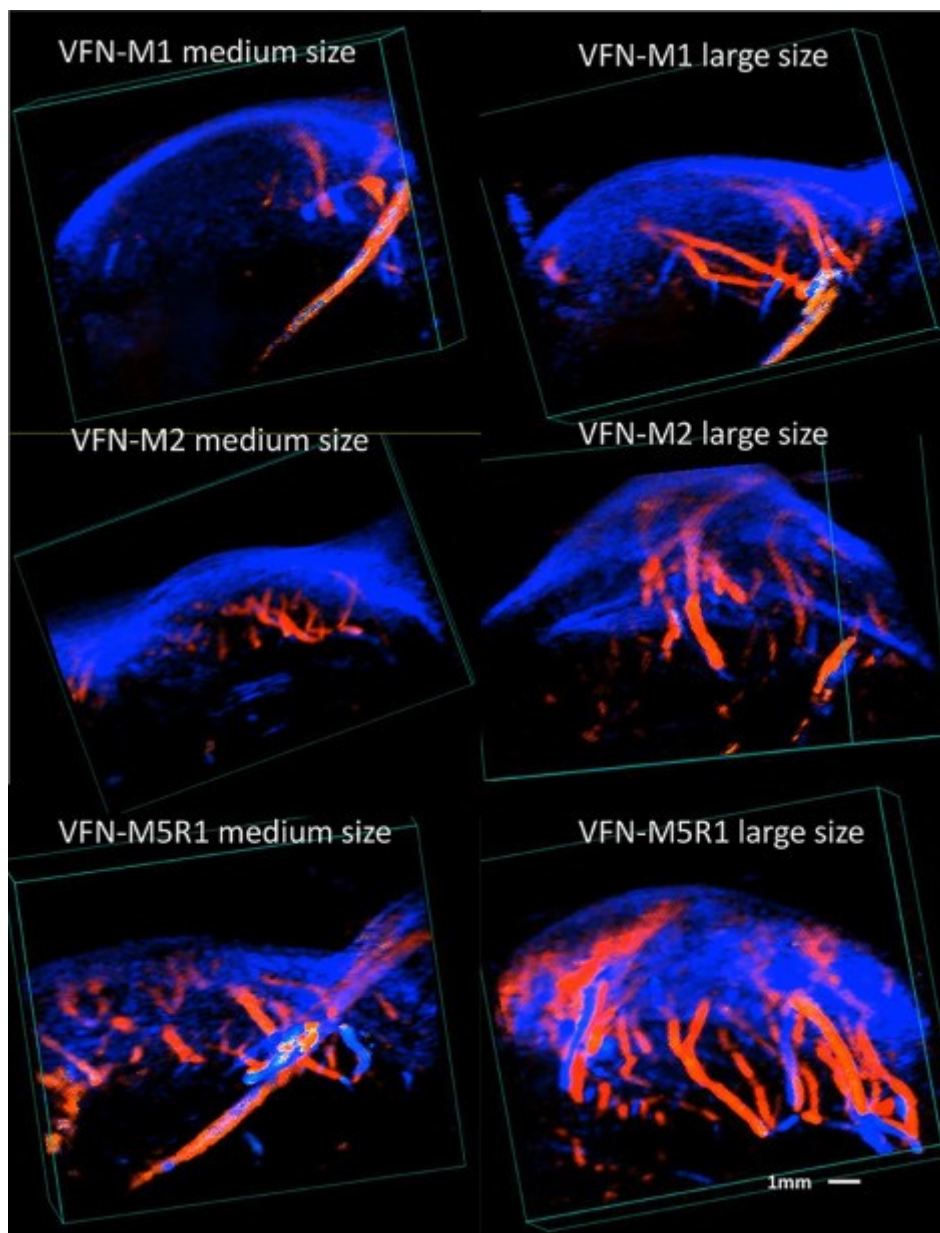
Pacient	Preparát č.	MVD (vaskulární profil / mm ²)	MVA (%)	Pacient	Preparát č.	MVD (vaskulární profil / mm ²)	MVA (%)
P3	1	161.3	11.5	P5	1	95.4	19.4
	2	140.3	31.9		2	89.8	23.3
	3	158.5	24.7		3	102.4	20.8
	4	109.4	13.5		4	89.8	23.3
	5	143.1	21.2		5	136.0	31.3
průměr		142.5	20.6	průměr		102.7	23.6
SD		20.7	8.3	SD		19.3	4.6
VFN-D1	1	78.5	2.4	VFN-D5	1	64.5	5.2
	2	106.6	2.8		2	63.1	6.6
	3	85.6	2.4		3	56.1	9.4
	4	60.3	2.8		4	68.7	3.5
	5	58.9	2.1		5	85.6	10.1
průměr		78.0	2.5	průměr		67.6	6.9
SD		19.7	0.3	SD		11.0	2.8
poměr pacient / PDX		2.1 x	8.6 x	poměr pacient / PDX		1.5 x	3.4 x
P9	1	244.0	18.1	P10	1	171.1	37.2
	2	274.9	23.3		2	151.5	51
	3	280.5	27.1		3	120.6	38.2
	4	304.3	23.6		4	165.5	63.9
	5	280.5	21.5		5	145.9	46.2
průměr		276.8	22.7	průměr		150.9	47.3
SD		21.6	3.3	SD		19.8	10.9
VFN-M5R1	1	91.2	5.9	VFN-M10	1	102.4	4.5
	2	120.6	7.3		2	71.5	9.2
	3	102.4	6.6		3	74.3	6.9
	4	109.4	5.6		4	108	11.6
	5	99.6	4.2		5	131.8	10.4
průměr		103.8	5.9	průměr		97.6	8.5
SD		11.1	1.2	SD		25.1	2.8
Poměr pacient / PDX		2.7 x	3.8 x	Poměr pacient / PDX		1.5 x	5.6 x

MVA – mikrovaskulární plocha, MVD – mikrovaskulární denzita, SD - směrodatná odchylka

Závěr 2: Výsledky histopatologického porovnání primárních nádorů a jejich PDX modelů ukazují na určité změny morfologie xenotransplantovaných nádorových buněk (agresivnější charakter v podobě vyššího počtu blastů a / nebo pleomorfie s většinou vyšší proliferací) a změny imunofenotypu, především u PDX modelů odvozených od pacientů s T-lymfomy. Významné rozdíly byly zaznamenány zejména ve složení nádorového mikroprostředí. Jednalo se v zásadě o absenci nenádorových komponent lidských tumorů, tj. lidských T lymfocytů, NK buněk a až na výjimky také lidských makrofágů (které nebyly nahrazeny myšími makrofágy přítomnými v játrech, slezině či kostní dřeni imunodeficientních myší). Dalším významným zjištěním byla signifikantně nižší úroveň vaskularizace složená výhradně z cév myšího původu. Obrázky č. 11-16 ukazují morfolologii a imunofenotyp primárních nádorů ve srovnání s jejich PDX protějšky, z kapacitních důvodů zařazeno 6 případů reprezentující jeden typ ze studovaných NHL (výběr odpovídá výše zobrazeným případům z WES analýzy), zvětšení 200x. V připojených tabulkách č. 8-12 následuje podrobný popis.

4.4. Přímé srovnání dynamického monitorování vaskularizace PDX modelů agresivních lymfomů v průběhu jejich růstu pomocí ultrazvuku a pomocí histologie

Mikrovaskulární plocha (MVA) byla hodnocena na třech různých PDX modelech lymfomu z pláštěvých buněk pomocí vysokofrekvenčního ultrazvukového přístroje (Vevo 3100/LAZR-X) *in vivo* na myších uvedených do celkové anestezie, a to ve dvou stádiích - u malých tumorů (průměr do 1cm) a u velkých tumorů (průměr cca 2cm). Vypočítané hodnoty byly porovnány s hodnocení MVA zjištěnými pomocí standardní imunohistochemie (tj. pomocí barvení na CD31 na tumorech odebraných z usmrcených myší). U malých tumorů byly hodnoty MVA vypočítané pomocí IHC analýzy (profily CD31-pozitivních endoteliálních buněk) ve všech případech nižší než hodnoty MVA vypočítané na základě UZ vyšetření. Konkrétně pro PDX modely VFN-M1, VFN-M2 and VFN-M5R1 byly hodnoty (IHC versus UZ) následující: $6.8 \pm 0.2\%$ versus $18.4 \pm 2.3\%$ (VFN-M1), $8.0 \pm 0.7\%$ versus $15.8 \pm 1.0\%$ (VFN-M2) a $6.9 \pm 0.5\%$ versus $16.5 \pm 2.7\%$ (VFN-M3). Naproti tomu u velkých tumorů byly hodnoty MVA vypočítané pomocí IHC analýzy mírně vyšší než hodnoty MVA zjištěné pomocí ultrazvuku. Konkrétně pro PDX modely VFN-M1, VFN-M2 and VFN-M5R1 byly hodnoty (IHC versus UZ) následující: $4.8 \pm 0.3\%$ versus $2.8 \pm 0.1\%$ (VFN-M1), $8.6 \pm 0.6\%$ versus $3.8 \pm 0.8\%$ (VFN-M2) a $10.7 \pm 0.8\%$ versus $10.3 \pm 2.7\%$ (VFN-M3). Předpokládáme, že vyšší hodnoty naměřené pomocí ultrazvuku způsobeny retrakcí kapilár v rámci zpracování tkáně během zalití do parafinu. Nižší hodnoty MVA naměřené pomocí UZ u větších tumorů lze vysvětlit tím, že MVA hodnocená pomocí IHC analýzy je vždy prováděna z viabilní tkáně, zatímco MVA hodnocená pomocí UZ počítá MVA z celé plochy tumoru, která ve fázi velkých tumorů zahrnuje poměrně rozsáhlé oblasti nekrotizace (které nejsou u malých tumorů přítomny). Navzdory tomu, že UZ neumí rozpoznat kapiláry menší než 50 mikrometrů, naše výsledky jasně prokázaly, že barevný dopplerovský UZ lze využít pro dynamické *in vivo* monitorování mikrovaskulární plochy bez nutnosti podávání kontrastní látky či usmrcení myši.



Obrázek č. 17. Trojrozměrný barevný dopplerovský model nádorové vaskularizace v různých fázích růstu PDX tumorů. Modrá barva ukazuje krev proudící od sondy, červená barva reprezentuje krev proudící k sondě.

5. Diskuse

Provedli jsme komplexní histopatologickou a genetickou analýzu 15 PDX modelů odvozených od pacientů s nejčastějšími typy agresivních NHL včetně difúzního velkobuněčného B lymfomu (DLBCL-non GC i GC, tzv. „double hit“ DLBCL a DLBCL transformovaný z MZL), Burkittova lymfomu (MCL), lymfomu z plášťové zóny (MCL), angioimunoblastického T lymfomu (AITL), periferního T lymfomu blíže nespécifikovaného (PTCL, NOS) a anaplastického velkobuněčného T lymfomu (ALCL), ALK pozitivního i negativního, včetně vyšetření vybraných faktorů mikroprostředí. Genetická analýza WES prokázala, že u většiny odvozených PDX modelů bylo možno detekovat většinu somatických mutací, které se nacházely u primárních lymfomových buněk (ze kterých byly PDX modely odvozeny). Tyto výsledky se shodují s dříve publikovanými daty (Forde et al., 2021; Chapuy et al., 2016; Townsend et al., 2016; Woo et al., 2021; Zhang et al., 2017). PDX modely sdílely nejen stejné typy mutací, nýbrž i podobnou frekvenci těchto mutací (VAF). Vedle srovnatelného mutačního profilu byly v PDX buňkách pomocí WES predikovány i srovnatelné změny počtu kopií DNA (copy number variants, CNV), tj. delece či amplifikace příslušných genových oblastí. Data z analýzy WES tudíž potvrdila, že se v naprosté většině případů nejedná o subklony původních, více heterogenních lymfomů, ale že si PDX tumory zachovávají plnou genetickou diverzitu dárcovských lymfomů. Ve většině analyzovaných PDX modelů počet sdílených mutací převyšoval jak počet mutací nově detekovaných (N/D), tak počet mutací nově nedetekovaných (N/U). Vyšší nálož N/D a N/U mutací byla zjištěna pouze ve 3 případech - VFN-D6 (P2, DLBCL), VFN-M1 (P10, MCL) a VFN-T6 (P13, T-NHL). S výjimkou VFN-T6 byl počet N/D mutací vždy vyšší než počet N/U mutací. Většina N/D mutací nebyla detekována u primárních lymfomových buněk (tj. jejich alelická frekvence byla rovna nule). Menšina N/D mutací byla u primárních lymfomových buněk sice detekována, ale pod nastaveným limitem (tj. $VAF < 10\%$). Tato pozorování naznačují, že velká většina N/D mutací představuje *de novo* mutace

získané v průběhu dělení lymfomových buněk v myším organismu, např. mechanismem somatické hypermutace, což odpovídá dříve publikovaným sdělením (Di Noia & Neuberger, 2007; Choi et al., 2016). Na druhé straně, N/U mutace byly méně četné a v naprosté většině nízkofrekventní. Jejich biologický význam zůstává nejasný, ale s největší pravděpodobností se jedná o nevýznamné (passenger) mutace, které byly ztraceny v průběhu *in vivo* růstu PDX tumoru.

Na rozdíl od v zásadě shodného genetického profilu PDX modelů a primárních lymfomových buněk, histologická analýza odhalila určité fenotypické alterace PDX buněk i mikroprostředí PDX tumorů ve srovnání s primárními lymfomovými buňkami, resp. mikroprostředím lymfomem infiltrované uzliny. Morfologie PDX buněk vykazovala výraznější změny ve smyslu větší velikosti a / nebo vyššího stupně pleomorfie. PDX tumory vykazovaly obvykle vyšší proliferační aktivitu dle Ki-67 ve srovnání s příslušnou dácovskou lymfomovou tkání. Tyto výsledky poukazují na agresivnější fenotyp engraftovaných PDX buněk. Pokud vezmeme v úvahu genetickou podobnost PDX modelů a primárních lymfomů, mohou být tyto rozdíly vysvětleny odlišným složením TME.

Vedle morfologických změn byly u některých PDX modelů pozorovány i rozdíly v jejich imunofenotypu. - např. nižší exprese cyklinu D1 a SOX11 u PDX modelů MCL nebo snížení míry exprese či úplná ztráta exprese cytotoxických granúl a některých CD antigenů u PDX modelů odvozených od pacientů s T-NHL. Mechanismy vedoucí ke změně imunofenotypu zůstávají nejasné. U PDX modelu VFN-T3 odvozeného od pacienta s AITL byla zaznamenána proliferace CD20-pozitivních, EBV-pozitivních velkých blastických lymfocytů. Zůstává otázkou, zda šlo o rozvoj sekundárního EBV-pozitivního difúzního velkobuněčného B lymfomu, což je komplikace, jež u případů AITL dokumentována (Chen et al., 2018; Yang et al., 2012) nebo o engraftment B buněčného, virem EBV infikovaného subklonu, jež se může u

PDX modelů vyvinout. Přítomnost jednotlivých EBER-pozitivních buněk byla v primárním vzorku (tj. infiltrované lymfatické uzlině) prokázána.

Ačkoli PDX modely popsané v naší práci sdíleli podobný genetický profil a (s určitými odchylkami) i podobný imunofenotyp, došlo u PDX tumorů ke kompletní ztrátě heterogenity TME ve smyslu absence nenádorových komponent běžně pozorovaných u lymfomů. U všech PDX modelů jsme potvrdili absenci lidských T lymfocytů a makrofágů, ačkoli buněčná suspenze primárních nádorů použitá pro xenotransplantaci nebyla nijak purifikována. V PDX modelech nebyly nalezeny ani myší makrofágy a to navzdory tomu, že jsme jejich přítomnost prokázali v řadě myších orgánů, konkrétně ve slezině, játrech a kostní dřeni. Absence buněk TME může být vysvětlena jejich ztrátou v průběhu zpracování nádorové tkáně nebo nedostatečnými podmínkami v organismu hostitele a jejich zániku v období po jejich přenosu. Absence buněk TME u xenograftované tkáně se může odrazit nejen ve změně fenotypu u PDX modelů, ale také v úspěšnosti „přihojení“ nádorové populace. Na rozdíl od infiltrovaných uzlin tak PDX modely představují v zásadě homogenní nakupení PDX buněk s minimální příměsí myších buněk, zejména cév a fibroblastů.

Z hlediska nádorové angiogeneze byla u PDX modelů ve srovnání s primárními nádory zjištěna signifikantně nižší úroveň vaskularizace (parametry MVA a MVD), přičemž se jednalo výhradně o myší, nikoliv lidské cévy. Nižší MVD a MVA mohou si vysvětlujeme suboptimální stimulací myší angiogeneze endoteliálním růstovým faktorem (VEGF) produkovaným lymfomovými buňkami v důsledku hypoxie. Nižší úroveň MVD / MVA myších cév může mít zásadní vliv na výsledky preklinických studií v terapii antiangiogenními léčivy založenými na pasivní akumulaci léčiva v nádorové tkáni (nanoterapeutika cílená zejména pomocí tzv. enhanced permeability and retention [EPR] efektu).

Burack (Burack et al., 2017) se ve své práci zaměřil na PDX modely nízké maligních lymfomů (folikulární lymfom a lymfom z marginální zóny), u kterých je vliv TME na přežití nádorových buněk *ex vivo* všeobecně znám. Použil tzv. OTX modely (*omental tumor xenografts*), které umožňují přihojení nádorových i nenádorových buněk (B a T lymfocyty, plazmatické buňky). Do omenta imunodeficientních myší implantoval jednak purifikované buněčné suspenze zahrnující pouze nádorové buňky „očištěné“ od buněk TME, jednak neselektované suspenze homogenizovaných uzlin získaných od pacientů s indolentními lymfomy. Jednoznačně byla prokázána vyšší úspěšnost „engraftmentu“ za přítomnosti CD3+, CD4+ T lymfocytů a v některých případech i nenádorových B lymfocytů, zatímco absence CD8+ lymfocytů v úspěšnosti přihojení nehrála roli. Mimo jiné, stejně jako my, neprokázal v žádném z xenograftů makrofágy ani dendritické buňky. Zůstává otázkou, zda PDX modely v této studii reprezentují selekci případů nádorů nejméně závislých na faktorech lidského TME. Během cca 10 leté trvalé snahy vyvinout PDX modely různých NHL v lymfomové laboratoři na Ústavu patologické fyziologie 1.LF UK se úspěšnost přihojení engraftovaných buněk pohybuje okolo 20 % (tedy cca 1 z 5 pacientů). Dá se předpokládat, že lymfomové buňky, jejichž přežití je plně závislé na lidském TME, nemohou v myši přežít. Rozdíly v úspěšnosti xenotransplantace však mohou být způsobeny i takovými faktory, jako jsou charakter primárního vzorku, ze kterého byly nádorové buňky získány, způsoby implantace (implantace do subrenálního tukového pouzdra, omenta, intravenózní a subkutánní nebo intraperitoneální injekce), předchozí ozáření myší, použití čerstvých xenotransplantovaných buněk nebo buněk zmrazených. V naší předešlé práci (Klanova et al., 2014) jsme porovnávali způsob engraftmentu ustálených lymfomových linií (tj. CDX modely) a primárních lymfomových buněk po i.v. xenotransplantaci. Zatímco lymfomové linie engraftovali primárně v kostní dřeni xenotransplantovaných zvířat, lymfomové buňky získané od pacienta engraftovaly primárně v myší slezině. Dále jsme prokázali, že u lymfomových linií lze pozorovat plastickou změnu transkriptomu z *in vitro*

profilu (buňky kultivované v podmínkách tkáňových kultur) do *in vivo* profilu (po engraftmentu lymfomových linií v imunodeficientních myších) a zpět do *in vitro* profilu po *ex vivo* (re)kultivaci lymfomových buněk získaných z infiltrovaných myších orgánů v podmínkách tkáňových kultur.

Forde (Forde et al., 2021) uvádí nejvyšší úspěšnost přihojení Burkittova lymfomu z buněk získaných z pleurálního výpotku, o něco nižší úspěšnost u buněk získaných z periferní krve a kostní dřeně (při intraperitoneální a subkutánní infiltraci) a nulovou úspěšnost u lymfomových buněk získaného ze solidního nádoru. Také my jsme pozorovali největší úspěšnost při xenotransplantaci lymfomových buněk získaných z maligních výpotků a leukemizované krve ve srovnání s xenotransplantací homogenizátů lymfatických uzlin. Toto pozorování lze vysvětlit nižší závislostí lymfomových buněk rostoucích ve formě „suspence“ v maligních výpotcích na lidském TME ve srovnání s lymfomovými buňkami rostoucími v infiltrovaných lymfatických uzlinách.

Townsend (Townsend et al., 2016) uvádí, že míra přihojení po první pasáži z pacienta do zvířete se lišila dle agresivity oncomecnění, nejúspěšnější byly výsledky s agresivními typy leukémie (akutní lymfoblastické následované akutní myeloidní (v rozmezí 23-67 %), zatímco u lymfomů to bylo jen okolo 20 % (tedy výsledek odpovídající našim vlastním zkušenostem). Vyšší úspěšnost přihojení u lymfomů byla pozorována u dalšího přepasážování (76,9 %) a s použitím implantace do subrenálního tukového pouzdra. Intravenózní aplikace dokonce vedla k ortotopickému postižení myších orgánů podobně jako tomu bylo u primárních nádorů pacientů. Můžeme jen spekulovat, který z *in vivo* faktorů přispívá k přežití xenotransplantátů, zda je to přímý mezibuněčný kontakt, hypoxie, růstové faktory, metabolické změny či jiné faktory.

6. Shrnutí

Odvodili jsme 15 PDX modelů od pacientů s různými typy ne Hodgkinských lymfomů a provedli jsme jejich zevrubnou genetickou a imunohistochemickou analýzu v přímém srovnání s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly PDX modely odvozeny. Jednoznačně jsme prokázali, že většina PDX modelů sdílí klíčové genetické mutace (tzv. driver mutace) s primárními lymfomovými buňkami. Z genetického hlediska tudíž PDX modely představují relevantní nástroj pro studium biologie lymfomů. Imunohistochemická analýza vybraných znaků prokázala mírné odchylky v imunofenotypu lymfomových buněk ve srovnání s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly PDX modely odvozeny. Imunohistochemická analýza zaměřená na nádorové mikroprostředí prokázala absenci nenádorových komponent běžně nacházených v lymfomem infiltrované uzlině včetně T-lymfocytů, makrofágů, či NK buněk. PDX tumory vykazovaly signifikantně sníženou vaskularitu složenou výhradně z myších cév. Ačkoli tedy PDX modely představují cenný nástroj preklinického studia agresivních lymfomů, je třeba mít na paměti výrazné odlišnosti mezi PDX tumorem a původní lymfomovou uzlinou, například při testování terapeutických postupů zaměřených na nádorové mikroprostředí (antiangiogenní terapie, různé formy imunoterapie, nanoterapeutika závislá na EPR efektu apod.)

7. Summary

We derived 15 PDX models from patients with various subtypes of aggressive lymphomas. We implemented complex genetic and immunohistochemical analysis of the established PDX models head-to-head with the patient's primary lymphoma cells, from which the PDXs were derived. We clearly confirmed that the established PDX cells shared majority of somatic mutations with the patient's primary cells, from which they were derived. Thus, from the genetic perspective the PDX models represent relevant tools for the study of lymphoma biology. Immunohistochemistry analysis of selected antigens revealed some differences between the PDXs and patients' primary cells. Importantly, the analysis demonstrated complete loss of non-malignant cellular components of the tumor microenvironment frequently observed in lymphoma infiltrated lymph nodes, including T-cells, macrophages or NK cells. In addition, the PDX tumors had significantly lower extent of microvessel density and microvessel area composed exclusively of vessels of murine origin. Although PDX models represent relevant tools for translational study of malignant lymphomas, the differences described in our study must be taken into account during experiments that address the tumor microenvironment, e.g. experimental anti-angiogenic treatment approaches, various forms of immunotherapy, or nanotherapeutics that rely on enhanced permeability and retention (EPR) effect.

8. Reference

- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. D., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W. J., Choi, J. K., Chuang, S. S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., . . . Xiao, W. B. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, *36*(7), 1720-1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Ame-Thomas, P., & Tarte, K. (2014). The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol*, *24*, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.001>
- Apollonio, B., Ioannou, N., Papazoglou, D., & Ramsay, A. G. (2021). Understanding the Immune-Stroma Microenvironment in B Cell Malignancies for Effective Immunotherapy. *Front Oncol*, *11*, 626818. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.626818>
- Bejarano, L., Jordao, M. J. C., & Joyce, J. A. (2021). Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discovery*, *11*(4), 933-959. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-20-1808>
- Blonska, M., Agarwal, N. K., & Vega, F. (2015). Shaping of the tumor microenvironment: Stromal cells and vessels. *Semin Cancer Biol*, *34*, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.002>
- Bruneau, J., Canioni, D., Renand, A., Marafioti, T., Paterson, J. C., Martin-Garcia, N., Gaulard, P., Delfau, M. H., Hermine, O., Macintyre, E., Brousse, N., & Asnafi, V. (2010). Regulatory T-cell depletion in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Pathol*, *177*(2), 570-574. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100150>
- Buckanovich, R. J., Facciabene, A., Kim, S., Benencia, F., Sasaroli, D., Balint, K., Katsaros, D., O'Brien-Jenkins, A., Gimotty, P. A., & Coukos, G. (2008). Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med*, *14*(1), 28-36. <https://doi.org/10.1038/nm1699>

- Burack, W. R., Spence, J. M., Spence, J. P., Spence, S. A., Rock, P. J., Shenoy, G. N., Shultz, L. D., Bankert, R. B., & Bernstein, S. H. (2017). Patient-derived xenografts of low-grade B-cell lymphomas demonstrate roles of the tumor microenvironment. *Blood Adv*, *1*(16), 1263-1273. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017005892>
- Cai, Q. C., Liao, H., Lin, S. X., Xia, Y., Wang, X. X., Gao, Y., Lin, Z. X., Lu, J. B., & Huang, H. Q. (2012). High expression of tumor-infiltrating macrophages correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Med Oncol*, *29*(4), 2317-2322. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0123-6>
- Catala, E., Iacoboni, G., & Barba, P. (2022). Chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy in patients with aggressive B-cell lymphomas. Current outlook after a decade of treatment. *Medicina Clinica*, *158*(7), 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2021.10.005>
- Cohen, N., Shani, O., Raz, Y., Sharon, Y., Hoffman, D., Abramovitz, L., & Erez, N. (2017). Fibroblasts drive an immunosuppressive and growth-promoting microenvironment in breast cancer via secretion of Chitinase 3-like 1. *Oncogene*, *36*(31), 4457-4468. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.65>
- Cols, M., Barra, C. M., He, B., Puga, I., Xu, W., Chiu, A., Tam, W., Knowles, D. M., Dillon, S. R., Leonard, J. P., Furman, R. R., Chen, K., & Cerutti, A. (2012). Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol*, *188*(12), 6071-6083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102066>
- Comito, G., Giannoni, E., Segura, C. P., Barcellos-de-Souza, P., Raspollini, M. R., Baroni, G., Lanciotti, M., Serni, S., & Chiarugi, P. (2014). Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene*, *33*(19), 2423-2431. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.191>
- Coupland, S. E. (2011). The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. *Histopathology*, *58*(1), 69-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03706.x>

- Cozar, B., Greppi, M., Carpentier, S., Narni-Mancinelli, E., Chiossone, L., & Vivier, E. (2021). Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells. *Cancer Discov*, *11*(1), 34-44.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0655>
- Day, C. P., Merlino, G., & Van Dyke, T. (2015). Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell*, *163*(1), 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.068>
- de Leval, L., Rickman, D. S., Thielen, C., Reynies, A., Huang, Y. L., Delsol, G., Lamant, L., Leroy, K., Briere, J., Molina, T., Berger, F., Gisselbrecht, C., Xerri, L., & Gaulard, P. (2007). The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*, *109*(11), 4952-4963. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-055145>
- Di Noia, J. M., & Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem*, *76*, 1-22.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740>
- Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Zhu, Z. P., Wu, Y., Witte, L., Hicklin, D. J., Tateno, M., Bohlen, P., Moore, M. A. S., & Rafii, S. (2001). Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(19), 10857-10862. [https://doi.org/DOI 10.1073/pnas.191117498](https://doi.org/DOI%2010.1073/pnas.191117498)
- Dierks, C., Grbic, J., Zirlik, K., Beigi, R., Englund, N. P., Guo, G. R., Veelken, H., Engelhardt, M., Mertelsmann, R., Kelleher, J. F., Schultz, P., & Warmuth, M. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med*, *13*(8), 944-951.
<https://doi.org/10.1038/nm1614>
- Dome, B., Hendrix, M. J., Paku, S., Tovari, J., & Timar, J. (2007). Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, *170*(1), 1-15.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060302>
- Forde, S., Matthews, J. D., Jahangiri, L., Lee, L. C., Prokoph, N., Malcolm, T. I. M., Giger, O. T., Bell, N., Blair, H., O'Marcaigh, A., Smith, O., Kenner, L., Bomken, S., Burke, G. A. A., &

- Turner, S. D. (2021). Paediatric Burkitt lymphoma patient-derived xenografts capture disease characteristics over time and are a model for therapy. *Br J Haematol*, *192*(2), 354-365.
<https://doi.org/10.1111/bjh.17043>
- Gaulard, P., & de Leval, L. (2014). The microenvironment in T-cell lymphomas: emerging themes. *Semin Cancer Biol*, *24*, 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.004>
- Giese, M. A., Hind, L. E., & Huttenlocher, A. (2019). Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*, *133*(20), 2159-2167. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844548>
- Gok Yavuz, B., Gunaydin, G., Gedik, M. E., Kosemehmetoglu, K., Karakoc, D., Ozgur, F., & Guc, D. (2019). Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1(+) TAMs. *Sci Rep*, *9*(1), 3172.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39553-z>
- Guenova, E., Watanabe, R., Teague, J. E., DeSimone, J. A., Jiang, J., Dowlatschahi, M., Schlapbach, C., Schakel, K., Rook, A. H., Tawa, M., Fischer, D. C., Kupper, T. S., & Clark, R. A. (2014). Th2 cytokines from malignant cells suppress Th1 responses and enforce a global Th2 bias in leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *Experimental Dermatology*, *23*(3), E50-E50. <Go to ISI>://WOS:000332335500317
- Herek, T. A., & Cutucache, C. E. (2017). Using Murine Models to investigate Tumor-Lymphoid interactions: Spotlight on Chronic Lymphocytic Leukemia and Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *Frontiers in Oncology*, *7*. <https://doi.org/ARTN 8610.3389/fonc.2017.00086>
- Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Tang, C., Myklebust, J. H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A. C., Chan, C. K., Tan, B. T., Park, C. Y., Zhao, F., Kohrt, H. E., Malumbres, R., Briones, J., Gascoyne, R. D., Lossos, I. S., Levy, R., Weissman, I. L., & Majeti, R. (2010). Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell*, *142*(5), 699-713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.044>

- Chapuy, B., Cheng, H., Watahiki, A., Ducar, M. D., Tan, Y., Chen, L., Roemer, M. G., Ouyang, J., Christie, A. L., Zhang, L., Gusenleitner, D., Abo, R. P., Farinha, P., von Bonin, F., Thorner, A. R., Sun, H. H., Gascoyne, R. D., Pinkus, G. S., van Hummelen, P., . . . Shipp, M. A. (2016). Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease. *Blood*, *127*(18), 2203-2213. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-672352>
- Chen, B. J., Dashnamoorthy, R., Galera, P., Makarenko, V., Chang, H., Ghosh, S., & Evens, A. M. (2019). The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, *10*(21), 2030-2040. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26771>
- Chen, H., Xue, Y. N., Xin, C. M., Xiong, J. S., Ni, X., & Sun, J. F. (2018). Secondary Cutaneous Epstein-Barr Virus-associated Diffuse Large B-cell Lymphoma with Hodgkin/Reed-Sternberg-like Cells in a Patient with Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Acta Derm Venereol*, *98*(10), 981-982. <https://doi.org/10.2340/00015555-2996>
- Chen, L., Xie, T., Wei, B., & Di, D. L. (2022). Current progress in CAR-T cell therapy for tumor treatment. *Oncology Letters*, *24*(4). <https://doi.org/ARTN 358>
10.3892/ol.2022.13478
- Chen, X., & Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov*, *18*(2), 99-115. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>
- Chiu, D. K. C., Tse, A. P. W., Xu, I. M. J., Di Cui, J., Lai, R. K. H., Li, L. L., Koh, H. Y., Tsang, F. H. C., Wei, L. L., Wong, C. M., Ng, I. O. L., & Wong, C. C. L. (2017). Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/ARTN 517>
10.1038/s41467-017-00530-7
- Choi, Y. Y., Lee, J. E., Kim, H., Sim, M. H., Kim, K. K., Lee, G., Kim, H. I., An, J. Y., Hyung, W. J., Kim, C. B., Noh, S. H., Kim, S., & Cheong, J. H. (2016). Establishment and characterisation

- of patient-derived xenografts as preclinical models for gastric cancer. *Sci Rep*, 6, 22172.
<https://doi.org/10.1038/srep22172>
- Jaillon, S., Ponzetta, A., Di Mitri, D., Santoni, A., Bonecchi, R., & Mantovani, A. (2020). Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 20(9), 485-503. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0281-y>
- Jaksa, R., Karolova, J., Svaton, M., Kazantsev, D., Grajciarova, M., Pokorna, E., Tonar, Z., Klanova, M., Winkowska, L., Malarikova, D., Vockova, P., Forsterova, K., Renesova, N., Dolnikova, A., Nozickova, K., Dundr, P., Fronkova, E., Trneny, M., & Klener, P. (2022). Complex genetic and histopathological study of 15 patient-derived xenografts of aggressive lymphomas. *Lab Invest*, 102(9), 957-965. <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00784-w>
- Joyce, J. A., & Fearon, D. T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, 348(6230), 74-80. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6204>
- Junttila, M. R., & de Sauvage, F. J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467), 346-354. <https://doi.org/10.1038/nature12626>
- Kang, C. (2022). Mosunetuzumab: First Approval. *Drugs*, 82(11), 1229-1234.
<https://doi.org/10.1007/s40265-022-01749-5>
- Kim, S., Kwon, D., Koh, J., Nam, S. J., Kim, Y. A., Kim, T. M., Kim, C. W., & Jeon, Y. K. (2020). Clinicopathological features of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand-1 expression in the tumor cells and tumor microenvironment of angioimmunoblastic T cell lymphoma and peripheral T cell lymphoma not otherwise specified. *Virchows Arch*, 477(1), 131-142. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02790-z>
- Klanova, M., Soukup, T., Jaksa, R., Molinsky, J., Lateckova, L., Maswabi, B. C., Prukova, D., Brezinova, J., Michalova, K., Vockova, P., Hernandez-Ilizaliturri, F., Kulvait, V., Zivny, J., Vokurka, M., Necas, E., Trneny, M., & Klener, P. (2014). Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research. *Lab Invest*, 94(7), 806-817.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.61>

- Kline, J., Godfrey, J., & Ansell, S. M. (2020). The immune landscape and response to immune checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Blood*, *135*(8), 523-533.
<https://doi.org/10.1182/blood.2019000847>
- Kohrt, H. E., Thielens, A., Marabelle, A., Sagiv-Barfi, I., Sola, C., Chanuc, F., Fuseri, N., Bonnafous, C., Czerwinski, D., Rajapaksa, A., Waller, E., Ugolini, S., Vivier, E., Romagne, F., Levy, R., Blery, M., & Andre, P. (2014). Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood*, *123*(5), 678-686. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-519199>
- Kuramoto, K., Sakai, A., Shigemasa, K., Takimoto, Y., Asaoku, H., Tsujimoto, T., Oda, K., Kimura, A., Uesaka, T., Watanabe, H., & Katoh, O. (2002). High expression of MCL1 gene related to vascular endothelial growth factor is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, *116*(1), 158-161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03253.x>
- Lai, Y., Wei, X., Lin, S., Qin, L., Cheng, L., & Li, P. (2017). Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *J Hematol Oncol*, *10*(1), 106.
<https://doi.org/10.1186/s13045-017-0470-7>
- Lamb, M. G., Rangarajan, H. G., Tullius, B. P., & Lee, D. A. (2021). Natural killer cell therapy for hematologic malignancies: successes, challenges, and the future. *Stem Cell Res Ther*, *12*(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02277-x>
- Leidi, M., Gotti, E., Bologna, L., Miranda, E., Rimoldi, M., Sica, A., Roncalli, M., Palumbo, G. A., Introna, M., & Golay, J. (2009). M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *J Immunol*, *182*(7), 4415-4422.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713732>
- Lemasson, Q., Akil, H., Feuillard, J., & Vincent-Fabert, C. (2021). Genetically Engineered Mouse Models Support a Major Role of Immune Checkpoint-Dependent Immunosurveillance Escape in B-Cell Lymphomas. *Front Immunol*, *12*, 669964.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669964>

- Lin, Y. X., Xu, J. X., & Lan, H. Y. (2019). Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*.
[https://doi.org/ARTN 76](https://doi.org/ARTN%2076)
10.1186/s13045-019-0760-3
- Lindemann, R. K. (2008). Stroma-initiated hedgehog signaling takes center stage in B-cell lymphoma. *Cancer Res*, *68*(4), 961-964. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5500>
- Liu, Y., Zhou, X., & Wang, X. (2021). Targeting the tumor microenvironment in B-cell lymphoma: challenges and opportunities. *J Hematol Oncol*, *14*(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01134-x>
- Marinaccio, C., Ingravallo, G., Gaudio, F., Perrone, T., Nico, B., Maoirano, E., Specchia, G., & Ribatti, D. (2014). Microvascular density, CD68 and tryptase expression in human diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res*, *38*(11), 1374-1377.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.09.007>
- McWilliams, E. M., Mele, J. M., Cheney, C., Timmerman, E. A., Fiazuddin, F., Strattan, E. J., Mo, X., Byrd, J. C., Muthusamy, N., & Awan, F. T. (2016). Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*, *5*(10), e1226720. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1226720>
- Menter, T., Tzankov, A., & Dirnhofer, S. (2021). The tumor microenvironment of lymphomas: Insights into the potential role and modes of actions of checkpoint inhibitors. *Hematol Oncol*, *39*(1), 3-10. <https://doi.org/10.1002/hon.2821>
- Myers, J. A., & Miller, J. S. (2021). Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *18*(2), 85-100. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0426-7>
- Negaard, H. F., Svennevig, K., Kolset, S. O., Iversen, N., Lothe, I. M., Ostenstad, B., Sandset, P. M., & Iversen, P. O. (2009). Alterations in regulators of the extracellular matrix in non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*, *50*(6), 998-1004.
<https://doi.org/10.1080/10428190902889270>

- Noble, J. N., & Mishra, A. (2019). Development and Significance of Mouse Models in Lymphoma Research. *Curr Hematol Malig Rep*, 14(2), 119-126. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00504-0>
- Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, 41(1), 49-61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- Okita, R., Sacki, T., Takashima, S., Yamaguchi, Y., & Toge, T. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 14(5), 1269-1273. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211295>
- Pascual, M., Mena-Varas, M., Robles, E. F., Garcia-Barchino, M. J., Panizo, C., Hervas-Stubbs, S., Alignani, D., Sagardoy, A., Martinez-Ferrandis, J. I., Bunting, K. L., Meier, S., Sagaert, X., Bagnara, D., Guruceaga, E., Blanco, O., Celay, J., Martinez-Baztan, A., Casares, N., Lasarte, J. J., . . . Roa, S. (2019). PD-1/PD-L1 immune checkpoint and p53 loss facilitate tumor progression in activated B-cell diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 133(22), 2401-2412. <https://doi.org/10.1182/blood.2018889931>
- Ping, Q., Yan, R., Cheng, X., Wang, W., Zhong, Y., Hou, Z., Shi, Y., Wang, C., & Li, R. (2021). Correction: Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther*, 28(9), 1074. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00343-3>
- Rabenhorst, A., Schlaak, M., Heukamp, L. C., Forster, A., Theurich, S., von Bergwelt-Baildon, M., Buttner, R., Kurschat, P., Mauch, C., Roers, A., & Hartmann, K. (2012). Mast cells play a protumorigenic role in primary cutaneous lymphoma. *Blood*, 120(10), 2042-2054. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415638>
- Ranganathan, R., Shou, P. S., Ahn, S., Sun, C., West, J., Savoldo, B., & Dotti, G. (2021). CAR T cells Targeting Human Immunoglobulin Light Chains Eradicate Mature B-cell Malignancies While Sparing a Subset of Normal B Cells. *Clinical Cancer Research*, 27(21), 5951-5960. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-20-2754>

- Ren, P., Zhang, C. Y., Li, W. P., Wang, X., Liang, A. B., Yang, G., Xu, H. T., & Ma, P. X. (2022). CAR-T Therapy in Clinical Practice: Technical Advances and Current Challenges. *Advanced Biology*, 6(8). <https://doi.org/ARTN 2101262>
- 10.1002/adbi.202101262
- Ribatti, D., Molica, S., Vacca, A., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A. M., & Dammacco, F. (2003). Tryptase-positive mast cells correlate positively with bone marrow angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17(7), 1428-1430. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402970>
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Pure, E., . . . Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*, 20(3), 174-186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>
- Salven, P., Orpana, A., Teerenhovi, L., & Joensuu, H. (2000). Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma: a single-institution study of 200 patients. *Blood*, 96(12), 3712-3718. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090051>
- Scott, D. W., & Gascoyne, R. D. (2014). The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*, 14(8), 517-534. <https://doi.org/10.1038/nrc3774>
- Singh, R. R., Kim, J. E., Davuluri, Y., Drakos, E., Cho-Vega, J. H., Amin, H. M., & Vega, F. (2010). Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation. *Leukemia*, 24(5), 1025-1036. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.35>
- Smits, N. C., & Sentman, C. L. (2016). Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs) as Treatment of B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 34(10), 1131-+. <https://doi.org/10.1200/Jco.2015.64.9970>

- Stadlbauer, K., Andorfer, P., Stadlmayr, G., Ruker, F., & Wozniak-Knopp, G. (2022). Bispecific mAb(2) Antibodies Targeting CD59 Enhance the Complement-Dependent Cytotoxicity Mediated by Rituximab. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9).
<https://doi.org/ARTN 5208>
- 10.3390/ijms23095208
- Steidl, C., Lee, T., Shah, S. P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S. J., Iqbal, J., Weisenburger, D. D., Bast, M. A., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Rimsza, L. M., Campo, E., Delabie, J., Braziel, R. M., Cook, J. R., Tubbs, R. R., . . . Gascoyne, R. D. (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 362(10), 875-885. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905680>
- Stewart, M., Talks, K., Leek, R., Turley, H., Pezzella, F., Harris, A., & Gatter, K. (2002). Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*, 40(3), 253-260. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01357.x>
- Sugio, T., Miyawaki, K., Kato, K., Sasaki, K., Yamada, K., Iqbal, J., Miyamoto, T., Ohshima, K., Maeda, T., Miyoshi, H., & Akashi, K. (2018). Microenvironmental immune cell signatures dictate clinical outcomes for PTCL-NOS. *Blood Adv*, 2(17), 2242-2252.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018018754>
- Takahashi, M., Ikeda, U., Masuyama, J., Funayama, H., Kano, S., & Shimada, K. (1996). Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*, 8(11), 817-821.
<https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0109>
- Takheaw, N., Sittithumcharee, G., Kariya, R., Kasinrerak, W., & Okada, S. (2021). Anti-human CD99 antibody exerts potent antitumor effects in mantle cell lymphoma. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 70(6), 1557-1567. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02789-0>
- Tarte, K. (2017). Role of the microenvironment across histological subtypes of NHL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017(1), 610-617. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.610>

- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Padala, S. A., Barsouk, A., & Rawla, P. (2021). Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci (Basel)*, 9(1).
<https://doi.org/10.3390/medsci9010005>
- Tian, X., Shen, H., Li, Z., Wang, T., & Wang, S. (2019). Tumor-derived exosomes, myeloid-derived suppressor cells, and tumor microenvironment. *J Hematol Oncol*, 12(1), 84.
<https://doi.org/10.1186/s13045-019-0772-z>
- Tjin, E. P., Bende, R. J., Derksen, P. W., van Huijstee, A. P., Kataoka, H., Spaargaren, M., & Pals, S. T. (2005). Follicular dendritic cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation in the germinal center microenvironment by secreting the serine protease HGF activator. *J Immunol*, 175(5), 2807-2813. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2807>
- Townsend, E. C., Murakami, M. A., Christodoulou, A., Christie, A. L., Koster, J., DeSouza, T. A., Morgan, E. A., Kallgren, S. P., Liu, H. Y., Wu, S. C., Plana, O., Montero, J., Stevenson, K. E., Rao, P., Vadhi, R., Andreeff, M., Armand, P., Ballen, K. K., Barzaghi-Rinaudo, P., . . . Weinstock, D. M. (2016). The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice (vol 29, pg 574, 2016). *Cancer Cell*, 30(1), 183-183.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.008>
- Tripodo, C., Gri, G., Piccaluga, P. P., Frossi, B., Guarnotta, C., Piconese, S., Franco, G., Vetri, V., Pucillo, C. E., Florena, A. M., Colombo, M. P., & Pileri, S. A. (2010). Mast Cells and Th17 Cells Contribute to the Lymphoma-Associated Pro-Inflammatory Microenvironment of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *American Journal of Pathology*, 177(2), 792-802.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091286>
- Vesela, P., Tonar, Z., Salek, D., Vokurka, S., Trneny, M., Kodet, R., Moulis, M., Kasparova, P., Vernerova, Z., Velenska, Z., Stritesky, J., Michal, M., & Boudova, L. (2014). Microvessel density of mantle cell lymphoma. A retrospective study of its prognostic role and the correlation with the Ki-67 and the mantle cell lymphoma international prognostic index in 177 cases. *Virchows Archiv*, 465(5), 587-597. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1632-4>

- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., . . . Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185-S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
- Wang, J., Li, D. Y., Cang, H. X., & Guo, B. (2019). Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Medicine*, 8(10), 4709-4721. <https://doi.org/10.1002/cam4.2327>
- Wong, H. K., Mishra, A., Hake, T., & Porcu, P. (2011). Evolving Insights in the Pathogenesis and Therapy of Cutaneous T-cell lymphoma (Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome). *British Journal of Haematology*, 155(2), 150-166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08852.x>
- Woo, X. Y., Giordano, J., Srivastava, A., Zhao, Z. M., Lloyd, M. W., de Bruijn, R., Suh, Y. S., Patidar, R., Chen, L., Scherer, S., Bailey, M. H., Yang, C. H., Cortes-Sanchez, E., Xi, Y., Wang, J., Wickramasinghe, J., Kossenkov, A. V., Rebecca, V. W., Sun, H., . . . Eur, O. C. (2021). Conservation of copy number profiles during engraftment and passaging of patient-derived cancer xenografts. *Nat Genet*, 53(1), 86-99. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00750-6>
- Yang, Q. X., Pei, X. J., Tian, X. Y., Li, Y., & Li, Z. (2012). Secondary cutaneous Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a case report and review of literature. *Diagn Pathol*, 7, 7. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-7>
- Yang, Z. Z., Novak, A. J., Ziesmer, S. C., Witzig, T. E., & Ansell, S. M. (2009). Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, 69(13), 5522-5530. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0266>
- Yu, B., Miao, Z. H., Jiang, Y., Li, M. H., Yang, N., Li, T., & Ding, J. (2009). c-Jun protects hypoxia-inducible factor-1alpha from degradation via its oxygen-dependent degradation domain in a

nontranscriptional manner. *Cancer Res*, 69(19), 7704-7712. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0808>

Zhang, L., Nomic, K., Zhang, H., Bell, T., Pham, L., Kadri, S., Segal, J., Li, S., Zhou, S., Santos, D., Richard, S., Sharma, S., Chen, W., Oriabure, O., Liu, Y., Huang, S., Guo, H., Chen, Z., Tao, W., . . . Wang, M. (2017). B-Cell Lymphoma Patient-Derived Xenograft Models Enable Drug Discovery and Are a Platform for Personalized Therapy. *Clin Cancer Res*, 23(15), 4212-4223. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2703>

Zhao, W. L., Mourah, S., Mounier, N., Leboeuf, C., Daneshpouy, M. E., Legres, L., Meignin, V., Oksenhendler, E., Le Maignin, C., Calvo, F., Briere, J., Gisselbrecht, C., & Janin, A. (2004). Vascular endothelial growth factor-A is expressed both on lymphoma cells and endothelial cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related to lymphoma progression. *Laboratory Investigation*, 84(11), 1512-1519. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700145>

Zhou, J., Nefedova, Y., Lei, A. H., & Gabrilovich, D. (2018). Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Seminars in Immunology*, 35(C), 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.004>

Zullo, K., Amengual, J. E., O'Connor, O. A., & Scotto, L. (2012). Murine models in mantle cell lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 25(2), 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2012.04.009>

9. Seznam publikací

Publikace vztahující se k tématu disertace

1. **Jakša R**, Karolová J, Svatoň M, Kazantsev D, Grajciarová M, Pokorná E, Tonar Z, Klánová M, Winkowska L, Maláriková D, Vočková P, Forsterová K, Renešová N, Dolníková A, Nožičková K, Dundr P, Froňková E, Trněný M, Klener P. Complex genetic and histopathological study of 15 patient-derived xenografts of aggressive lymphomas. *Lab Invest.* 2022 Sep;102(9):957-965. doi: 10.1038/s41374-022-00784-w. Epub 2022 Apr 29. PMID: 35488033; PMCID: PMC9420679.
2. Keša P, Pokorná E, Grajciarová M, Tonar Z, Vočková P, Trochet P, Kopeček M, **Jakša R**, Šefc L, Klener P. Quantitative In Vivo Monitoring of Hypoxia and Vascularization of Patient-Derived Murine Xenografts of Mantle Cell Lymphoma Using Photoacoustic and Ultrasound Imaging. *Ultrasound Med Biol.* 2021 Apr;47(4):1099-1107. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.12.010. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33455807.

Ostatní publikace

1. Dundr P, Cibula D, Foretová L, Macek M Jr, Kopečková K, Petruželka L, Němejcová K, Bártů M, Hojný J, Hájková N, **Jakša R**, Janega P, Stružinská I. Gynecological lesions in hereditary cancer predisposition syndromes. *Cesk Patol.* 2021 Summer;57(2):96-104. English. PMID: 34275319.
2. Dundr P, Staněk L, Němejcová K, **Jakša R**. Molekulární testování melanocytárních lézí [Molecular testing in malignant melanoma]. *Cesk Patol.* 2014 Jul;50(3):127-31. Czech. PMID: 25186593.
3. Dundr P, Němejcová K, Bártů M, Tichá I, **Jakša R**. Hodnocení zánětlivé infiltrace (tumor infiltrujících lymfocytů - TIL) u maligního melanomu [Evaluation of inflammatory cells

- (tumor infiltrating lymphocytes - TIL) in malignant melanoma]. *Cesk Patol.* 2018 Spring;54(1):27-31. Czech. PMID: 29631409.
4. Dundr P, Bártů M, Hojný J, Michálková R, Hájková N, Stružinská I, Krkavcová E, Hadravský L, Kleissnerová L, Kopejsková J, Hiep BQ, Němejcová K, **Jakša R**, Čapoun O, Řezáč J, Jirsová K, Franková V. HNF1B, EZH2 and ECI2 in prostate carcinoma. Molecular, immunohistochemical and clinico-pathological study. *Sci Rep.* 2020 Sep 1;10(1):14365. doi: 10.1038/s41598-020-71427-7. PMID: 32873863; PMCID: PMC7463257.
 5. Důra M, Němejcová K, **Jakša R**, Bártů M, Kodet O, Tichá I, Michálková R, Dundr P. Expression of Glut-1 in Malignant Melanoma and Melanocytic Nevi: an Immunohistochemical Study of 400 Cases. *Pathol Oncol Res.* 2019 Jan;25(1):361-368. doi: 10.1007/s12253-017-0363-7. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29128957.
 6. Novotný J, Strnadová K, Dvořánková B, Kocourková Š, **Jakša R**, Dundr P, Pačes V, Smetana K Jr, Kolář M, Lacina L. Single-Cell RNA Sequencing Unravels Heterogeneity of the Stromal Niche in Cutaneous Melanoma Heterogeneous Spheroids. *Cancers (Basel).* 2020 Nov 10;12(11):3324. doi: 10.3390/cancers12113324. PMID: 33182777; PMCID: PMC7697260.
 7. Bartáková H, Novák J, **Jakša R**, Beneš J Jr, Votruba J. Endobronchial involvement as an extremely rare manifestation of the Waldenström's disease. *Clin Respir J.* 2018 Feb;12(2):816-819. doi: 10.1111/crj.12567. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27696747.
 8. Tichá I, Hojný J, Michálková R, Kodet O, Krkavcová E, Hájková N, Němejcová K, Bártů M, **Jakša R**, Dura M, Kanwal M, Martiniková AS, Macurek L, Zemanková P, Kleibl Z, Dundr P. A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci Rep.* 2019

Nov 19;9(1):17050. doi: 10.1038/s41598-019-53636-x. PMID: 31745173; PMCID: PMC6863855.

9. Němejcová K, Tichá I, Bártů M, Kodet O, Důra M, **Jakša R**, Michálková R, Dundr P. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019 May;32(3):412-423. doi: 10.1111/pcmr.12757. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30506645.
10. Dundr P, Simon K, Němejcová K, Bártů M, Tichá I, Michálková R, **Jakša R**, Věcková Z, Kodet O. Stathmin is a potential therapeutic target but not a prognostic marker in melanoma: an immunohistochemical study of 323 melanocytic lesions. *Melanoma Res.* 2019 Apr;29(2):157-162. doi: 10.1097/CMR.0000000000000550. PMID: 30422880.
11. Dundr P, Bazalová B, Bártů M, Bosse T, Drozenová J, Fabian P, Fadare O, Hausnerová J, **Jakša R**, Laco J, Lax SF, Matěj R, McCluggage WG, Méhes G, Michálková R, Němejcová K, Singh N, Stolnicu S, Škapa P, Švajdler M, Stružinská I. The cytokeratin 17 expression in primary ovarian tumors has diagnostic but not prognostic significance. *Virchows Arch.* 2022 Aug;481(2):201-212. doi: 10.1007/s00428-022-03338-z. Epub 2022 May 13. PMID: 35554675.
12. Klanova M, Kazantsev D, Pokorna E, Zikmund T, Karolova J, Behounek M, Renesova N, Sovilj D, Kelemen CD, Helman K, **Jaksa R**, Havranek O, Andera L, Trneny M, Klener P. Anti-apoptotic MCL1 Protein Represents Critical Survival Molecule for Most Burkitt Lymphomas and BCL2-negative Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Mol Cancer Ther.* 2022 Jan;21(1):89-99. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0511. Epub 2021 Nov 2. PMID: 34728569.
13. Klanova M, Andera L, Brazina J, Svadlenka J, Benesova S, Soukup J, Prukova D, Vejmelkova D, **Jaksa R**, Helman K, Vockova P, Lateckova L, Molinsky J, Maswabi BC,

- Alam M, Kodet R, Pytlik R, Trneny M, Klener P. Targeting of BCL2 Family Proteins with ABT-199 and Homoharringtonine Reveals BCL2- and MCL1-Dependent Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2016 Mar 1;22(5):1138-49. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1191. Epub 2015 Oct 14. Erratum in: *Clin Cancer Res.* 2016 Aug 1;22(15):3984. PMID: 26467384.
14. Klanova M, Soukup T, **Jaksa R**, Molinsky J, Lateckova L, Maswabi BC, Prukova D, Brezinova J, Michalova K, Vockova P, Hernandez-Ilizaliturri F, Kulvait V, Zivny J, Vokurka M, Necas E, Trneny M, Klener P. Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research. *Lab Invest.* 2014 Jul;94(7):806-17. doi: 10.1038/labinvest.2014.61. Epub 2014 May 26. PMID: 24862967.
15. Klener P, Fronkova E, Berkova A, **Jaksa R**, Lhotska H, Forsterova K, Soukup J, Kulvait V, Vargova J, Fiser K, Prukova D, Alam M, Calvin Lenyeletse Maswabi B, Michalova K, Zemanova Z, Jancuskova T, Pekova S, Trneny M. Mantle cell lymphoma- variant Richter syndrome: Detailed molecular-cytogenetic and backtracking analysis reveals slow evolution of a pre-MCL clone in parallel with CLL over several years. *Int J Cancer.* 2016 Nov 15;139(10):2252-60. doi:10.1002/ijc.30263. Epub 2016 Aug 2. PMID: 27407063.
16. Svec A, Rangaiah M, Giles M, **Jaksa R**, McAulay KA. EBV+ diffuse large B-cell lymphoma arising within atrial myxoma. An example of a distinct primary cardiac EBV+ DLBCL of immunocompetent patients. *Pathol Res Pract.* 2012 Mar 15;208(3):172-6. doi: 10.1016/j.prp.2011.12.001. Epub 2012 Feb 10. PMID: 22326256.
17. Klener P, Salek D, Pytlik R, Mocikova H, Forsterova K, Blahovcova P, Campr V, Prochazka V, Obr A, **Jaksa R**, Kuntscherova J, Boudová L, Kodet R, Janikova A, Trneny M. Rituximab maintenance significantly prolongs progression-free survival of patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma treated with the Nordic MCL2 protocol and

autologous stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2019 Feb;94(2):E50-E53. doi: 10.1002/ajh.25362. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30474171.

18. Klanova M, Lorkova L, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, Vockova P, Mavis C, Lateckova L, Kulvait V, Vejmelkova D, **Jaksa R**, Hernandez F, Trneny M, Vokurka M, Petrak J, Klener P Jr. Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Mol Cancer.* 2014 Jun 27;13:159. doi: 10.1186/1476-4598-13-159. PMID: 24972933; PMCID: PMC4094598.

10. Přílohy

Publikace vztahující se k tématu dizertace