

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Petra Kovaříková

Význam antiangiogenní terapie u lymfomu z plášťových buněk

The Role of Antiangiogenic Therapy in Mantle Cell Lymphoma

Disertační práce

Ph.D. Thesis

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

Praha, 2021

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla využita 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, 1. listopadu 2021

MUDr. Petra Kovaříková

Podpis:

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

KOVAŘÍKOVÁ, Petra. *Význam antiangiogenní terapie u lymfomu z plášťových buněk [The Role of Antiangiogenic Therapy in Mantle Cell Lymphoma]*. Praha, 2021. Počet stran: 120; počet příloh: 6. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie. Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Pavel Klener, Ph.D.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce je věnována všem svobodně myslícím lidem, kteří se nespokojí s tím, co znají, ale hledají cesty nové.

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. Pavlu Klenerovi, který nade mnou nezlomil hůl, i když se mi zrovna nedařilo, a za rady, směřování a vedení mé práce. Bylo mi ctí a inspirací s ním pracovat. Dále patří velké díky všem členům naší Lymfomové laboratoře za možnost diskutovat a za nezištnou pomoc, kdykoli to bylo potřeba. Děkuji též prof. Vokurkovi a prof. Trněnému, kteří mi poskytli zázemí jak experimentální (na Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK), tak klinické (na 1. interní klinice VFN).

Je na místě také poděkovat své rodině za podporu a velkou shovívavost v průběhu celého studia, bez níž by tato práce nemohla vzniknout. Věřím, že ví, jak moc si toho vážím.

OBSAH

PROHLÁŠENÍ.....	1
IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM.....	2
PODĚKOVÁNÍ	3
OBSAH	4
SEZNAM ZKRATEK.....	6
ÚVOD.....	10
1. LYMFOM Z PLÁŠŤOVÝCH BUNĚK	10
2. ANGIOGENEZE.....	16
2.1. VEGF/VEGFR SIGNALIZACE	16
2.2. ÚLOHA DRÁHY PI3K/AKT/mTOR V ANGIOGENEZI	18
2.3. NÁDOROVÁ ANGIOGENEZE.....	19
2.3.1. ANGIOGENEZE PUČENÍM A ANGIOGENNÍ PŘEPNUTÍ	20
2.3.2. ALTERNATIVNÍ MECHANISMY ANGIOGENEZE	23
2.4. ANGIOGENEZE U HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT	24
2.4.1. ANGIOGENEZE U MCL.....	25
2.5. IMUNOHISTOCHEMICKÉ HODNOCENÍ VASKULARITY TUMORU.....	26
2.6. CD31/PECAM-1	26
3. ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE	28
3.1. ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE V ONKOLOGII	29
3.2. ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE V HEMATOONKOLOGII	31
3.2.1. BEVACIZUMAB	31
3.2.2. IMUNOMODULAČNÍ LÁTKY (THALIDOMID A LENALIDOMID)	31
3.2.3. TEMSIROLIMUS.....	33

3.2.4. BORTEZOMIB	35
HYPOTÉZY A CÍLE STUDIE.....	37
METODY	39
VÝSLEDKY	48
DISKUZE.....	69
ZÁVĚRY STUDIE.....	77
SUMMARY.....	79
REFERENCE.....	80
SEZNAM PUBLIKACÍ	110
PŘÍLOHY	115

SEZNAM ZKRATEK

AKT	AKT serin/threonin kináza 1
ALL	akutní lymfoblastová leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
Ang-2	angiopoetin 2
ATM	ataxia telangiectasia mutovaný gen
BCL-2	B-buněčný lymfom 2, antiapoptotický protoonkogen
BCR	B-buněčný receptor
B-NHL	B-non-Hodgkinský lymfom
CDKN2A	cyklin dependentní kinázový inhibitor 2A
CD31	destičková/endoteliální adhezivní molekula 1, též známá jako PECAM-1
CDX	xenotransplantát odvozený od buněčné linie (cell line-derived xenograft)
CHOP	kombinace cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu a prednisonu
CLIP	Childhood Leukaemia Investigation Prague
DLBCL	difúzní velkobuněčný B-lymfom
FBS	fetální bovinní sérum
FCM	průtoková cytometrie (Flow Cytometry)
FGF	fibroblastový růstový faktor
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FITC	fluorescein-isothiokyanát
FLT3	FMS-like tyrosinkináza 3
HBL-2	buněčná linie lymfomu z plášťových buněk
HBL-2-VEGF	buněčná linie HBL-2 s transgenní overexpresí VEGFA
HDAC	vysoce dávkovaný cytarabin

HIF	hypoxií indukovaný faktor
ICAM-1	intercelulární adhezivní molekula 1
IHC	imunohistochemie
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
INF α	interferon α
INF γ	interferon γ
JEKO1	buněčná linie lymfomu z plášťových buněk
JEKO1-VEGF	buněčná linie JEKO1 s transgenní overexpresí VEGFA
KD	kostní dřeň
MCL	lymfom z plášťových buněk
MINO	buněčná linie lymfomu z plášťových buněk
MIPI	mezinárodní prognostický index pro lymfom z plášťových buněk
MM	mnohočetný myelom
MMP-2	matrixová metaloproteináza 2
MOI	multiplicity of infection, mnohočetnost infekce
MRD	minimální reziduální nemoc
mRNA	mesengerová ribonukleová kyselina
mTOR	mechanický cíl rapamycin kinázy
MVA	microvessel area, oblast mikrocév
MVD	microvessel density, hustota mikrocév
NF κ B	nukleární faktor kappa B
PBS	fyzilogický roztok puřrovaný fosfáty
PDGFA	destičkový růstový faktor A
PDK1	fosfoinositid-dependentní proteinkináza 1

PDX	xenotransplantát odvozený od pacienta (patient-derived xenograft)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	phycoerythrin
PECAM-1	destičková/endoteliální adhezivní molekula 1, též známá jako CD31
PI3K	phosphatidylinositol-3-kináza
PLGF	placentární růstový faktor
PTEN	fosfatázový a tensinový homolog detekovaný na chromozomu 10
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RB1	RB transkripční korepresor 1
RET	gliální neurotropní faktor
R/R	relabující nebo/a refrakterní
R-CHOP	CHOP v kombinaci s rituximabem
RA-CHOP	R-CHOP v kombinaci s bevacizumabem
SOX11	SRY-box transkripční faktor 11
SPC	souhrn údajů o přípravku
TNF- β	transformující růstový faktor beta
TIE2	tyrosinkinázový receptor pro angiopoetin-1 a -2
TNF- α	tumor necrosis factor α
TP53	nádorový protein p53
VCAM-1	vaskulární buněčná adhezivní molekula 1
VEGFA	vaskulární endoteliální růstový faktor A
VEGFB	vaskulární endoteliální růstový faktor B
VEGFC	vaskulární endoteliální růstový faktor C
VEGFD	vaskulární endoteliální růstový faktor D

VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
VFN-M1	xenotransplantát odvozený od pacienta s lymfomem z plášťových buněk, dosud neléčeného ibrutinibem
VFN-M2	xenotransplantát odvozený od pacienta s lymfomem z plášťových buněk, dosud neléčeného ibrutinibem
VFN-M5R1	xenotransplantát odvozený od pacienta s lymfomem z plášťových buněk, dosud neléčeného ibrutinibem
VFN-M11	xenotransplantát odvozený od pacienta s lymfomem z plášťových buněk, po selhání terapie ibrutinibem
VFN-M12	xenotransplantát odvozený od pacienta s lymfomem z plášťových buněk, po selhání terapie ibrutinibem
VPF	vaskulární permeabilní faktor

ÚVOD

1. LYMFOM Z PLÁŠŤOVÝCH BUNĚK

Lymfom z plášťových buněk (MCL) tvoří 5-10 % všech B-non-Hodgkinských lymfomů (B-NHL) (Dreyling and European Mantle Cell Lymphoma, 2014). Za primární onkogenní inzult je v případě MCL považována translokace $t(11;14)(q13;q32)$, jež je charakterizována juxtapozicí genu *CCDN1* do oblasti zesilovače transkripce pro těžké řetězce imunoglobulinů (Bodrug et al., 1994). Díky této translokaci dochází k nadměrné expresi cyklinu D1 a tím k deregulaci buněčného cyklu (Bosch et al., 1994). Během lymfomogeneze ovšem dochází k dalším, sekundárním genetickým změnám, jež prohlubují deregulaci buněčného cyklu, interferují s reparací DNA a apoptózou (programovaná buněčná smrt). Mezi nejčastější sekundární změny popisované u MCL patří delece *TP53* (delece 17p), *ATM* (delece 11q), *CDKN2A* (delece 9p) nebo *RB1* (delece 13q). Všechny tyto změny jsou asociovány se špatnou prognózou (Panayiotidis and Kotsi, 1999; Salaverria et al., 2013). Někdy je popisována též nadměrná exprese anti-apoptotického regulátoru *BCL2* a transkripčního faktoru *MYC*. Tito pacienti se vyznačují vysokou agresivitou a chemorezistencí choroby (Nagy et al., 2003; Williams and Densmore, 2005).

V průběhu vývoje lymfomu z plášťových buněk může docházet k aberantní aktivaci některých drah, např. dráhy PI3K/AKT/mTOR, dráhy B-buněčného receptoru (BCR) nebo dráhy nukleárního faktoru kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$), které vedou k potlačení odpovědi na pro-apoptotické signály, zvyšují proliferační aktivitu buněk a ovlivňují mezibuněčnou signalizaci mezi buňkami lymfomu a nádorového mikroprostředí (Jost and Ruland, 2007; Rudelius et al., 2006; Vivanco and Sawyers, 2002; Young and Staudt, 2013).

Lymfom z pláštěvých buněk obvykle postihuje starší pacienty s mediánem věku 66 let, více muže než ženy (uvádí se poměr 2-3 : 1, někdy i vyšší). MCL se vyznačuje typickým imunofenotypem s pozitivitou CD19, CD20 a CD5 a naopak negativitou CD10, CD23 a CD200, nicméně jsou popisovány i případy CD5 negativních MCL (asi 5 % všech MCL). V těchto případech je stanovena diagnóza MCL na základě buď průkazu translokace (11;14) anebo overexprese cyklinu D1 (Miao et al., 2019).

Pacienti obvykle přicházejí k lékaři s pokročilým stádiem choroby (stádium III-IV dle Ann Arbor), kdy bývá přítomna rozsáhlá lymfadenopatie, často splenomegalie a u cca 70 % pacientů i infiltrace kostní dřeně (Tiemann et al., 2005). U většiny pacientů jsou v periferní krvi detekovatelné monoklonální lymfocyty, někdy dokonce dochází až k hyperleukocytóze, takže nález může mimikovat chronickou lymfocytární leukémii či jiný leukemizovaný lymfom (Ferrer et al., 2007). V případě MCL není vzácností extranodální orgánové postižení. Nejčastěji vidáme infiltraci gastrointestinálního traktu, zejména pak tlustého střeva, žaludku nebo jater (Samaha et al., 1998). V 1 % případů je v době diagnózy zachycen klon MCL i v cerebrospinální tekutině, v průběhu léčby se pak nějaká forma postižení centrálního nervového systému objevuje až u 4 % pacientů (Cheah et al., 2013).

Pro stanovení diagnózy MCL je nezbytný histologický průkaz choroby v lymfatické uzlině, kostní dřeni anebo jiné lymfomem infiltrované (extranodální) tkáni, pokud nelze jinak, je možné u leukemizovaných forem stanovit diagnózu na základě imunofenotypizace periferní krve, ale vždy by měla být prokázána translokace (11;14) (Kodet et al., 2003).

Morfologický nález rozlišuje 3 varianty MCL: klasickou, pleomorfni a blastoidní. Klasická varianta je charakterizována přítomností malých až středních buněk s nepravidelným jádrem (Sabattini et al., 2010). Pro pleomorfni MCL je typická přítomností heterogenní populace buněk, někdy s přítomností velkých buněk s bledě modrou cytoplasmou. Přítomnost velkých

buněk s disperzním chromatinem v jádrech a náznaky jadérek svědčí o blastoidní variantě lymfomu z pláštěvých buněk. Jak již morfologický popis napovídá, pleomorfní a blastoidní varianty jsou nejagresivnějšími formami MCL, což potvrzuje obvykle i vysoká mitotická aktivita a asociace se špatnou prognózou (Bertoni and Ponzoni, 2007).

Pro posuzování prognózy pacientů s MCL při diagnóze byl stanoven mezinárodní prognostický index pro MCL (MIPI), který zohledňuje biologický stav pacienta a agresivitu choroby s použitím 4 nezávislých parametrů (věk, výkonnostní stav pacienta, plasmatická koncentrace laktátdehydrogenázy a počet bílých krvinek při diagnóze). Na základě MIPI je možno rozdělit pacienty do 3 kategorií dle rizika – nízké, střední, vysoké (Hoster et al., 2008). Dalším prognostickým znakem je proliferační aktivita choroby, která se stanovuje imunohistochemicky při diagnóze jako pozitivita Ki-67 (klon MIB1). Pacienti s vysokou proliferační aktivitou ($K-67 \geq 30\%$) mají výrazně horší prognózu než pacienti s nízkou aktivitou, proto vznikla modifikovaná verze MIPI, která zohledňuje právě proliferační aktivitu onemocnění, tzv. kombinované MIPI (MIPIc), pomocí kterého lze pacienty dělit do 4 prognostických kategorií (Vose, 2017).

Jak již bylo zmíněno výše, průkaz některých cytogenetických aberací pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) byl opakovaně asociován s horší prognózou (*TP53*, *CDKN2A*), podobně bylo zjištěno, že akumulace některých mutací, konkrétně kombinace aberace *TP53* a delece *CDKN2A* je silně asociována se špatnou odpovědí na standardní chemoterapii a měl by být v těchto případech zvažován terapeuticky agresivnější přístup s vedením k alogenní transplantaci krvetvorných buněk (Malarikova et al., 2020). Dalším významným prognostickým markerem u MCL je přítomnost nebo nepřítomnost exprese transkripčního faktoru SOX11 (Nordstrom et al., 2014). Přesný molekulární mechanismus zapojení SOX11 do vývoje MCL není znám, nicméně bývá popisován u klasických variant MCL (i u vzácných cyklín D1

negativních forem MCL), naopak jeho nepřítomnost je typická pro indolentní (většinou leukemizované) varianty MCL. SOX11 reguluje expresi PAX5 a blokuje terminální diferenciaci B-lymfocytů (Vegliante et al., 2013). Vysoká exprese SOX11 je naopak asociována s agresivními formami MCL, zvýšenou angiogenezí a zvýšenou infiltrací T-lymfocyty (Annese et al., 2020; Gustavsson et al., 2010; Petrakis et al., 2019).

Po stanovení diagnózy se provádí vstupní zhodnocení rozsahu choroby (staging) pomocí počítačové tomografie (CT) nebo lépe pomocí pozitronové emisní tomografie v kombinaci s CT (PET/CT), která poskytne navíc informaci o metabolické aktivitě choroby. Důležitou složkou vstupního vyšetření je i vyšetření kostní dřeně, obvykle pomocí trepanobiopsie. U pacientů s vysokým rizikem postižení centrálního nervového systému by měl být při diagnóze vyšetřen mozkomíšní mok pomocí průtokové cytometrie. Všechna tato vyšetření jsou následně opakována po léčbě během zhodnocení léčebné odpovědi (restaging). V průběhu léčby a po léčbě lze dále sledovat přítomnost nebo nepřítomnost tzv. minimální reziduální choroby (MRD). Toto vyšetření spočívá v detekci reziduální měřitelné populace MCL buněk, která je pod detekčním limitem obvykle používaných metod hodnocení léčebné odpovědi (tedy CT, PET/CT, či standardní histologické vyšetření kostní dřeně). MRD je měřena v kostní dřeni nebo periferní krvi buď pomocí průtokové cytometrie (sensitivita 10^{-4} až 10^{-5}) anebo pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR; senzitivita 10^{-5} až 10^{-7}) (Pott et al., 2010; Zhou et al., 2021). Pacienti, kteří dosáhnou tzv. molekulární remise (tedy neměřitelné zbytkové nemoci), mají významně lepší prognózu než pacienti s detekovatelnou zbytkovou nemocí (MRD-pozitivní). Dosažení kompletní remise po terapii (tj. PET-negativita, dosažení molekulární remise v kostní dřeni a periferní krvi, případně negativita likvoru) jsou velmi významnými prognostickými faktory (Pott et al., 2010). Při sledování MRD u pacientů v období

po léčbě (follow-up) obvykle dochází k záchytu měřitelné nemoci (tzv. molekulárnímu relapsu) několik měsíců před klinickou manifestací choroby (Ladetto et al., 2020; Zhou et al., 2021).

MCL patří mezi chemosenzitivní malignity. Standardem první linie je cyklické podávání kombinované imunochemoterapie. Pacienti, kteří jsou schopni podstoupit vysokodávkovanou terapii (většinou mladší pacienti bez významných komorbidit), podstupují obvykle třífázovou terapii: indukční fázi, konsolidaci pomocí vysokodávkované terapie a autologní transplantaci krvetvorných buněk následovanou udržovací fází (Dreyling et al., 2005; Gianni et al., 2003). Hlavním cílem indukční terapie je navození kompletní remise, tedy vymizení všech měřitelných známek choroby. Obvykle je používán intenzivní režim kombinující alkylační cytostatikum cyklofosfamid, anthracyklin doxorubicin (případně adriamycin), vinka-alkaloid vinkristin, vysokodávkovaný cytarabin (HDAC), platinový derivát oxaliplatin, kortikoidy a anti-CD20 monoklonální protilátku rituximab (např. R-MaxiCHOP, R-HyperCVAD, R-HDAC, R-DHA0x). Cílem konsolidace je eradice případné zbytkové nemoci pomocí vysokodávkované terapie (conditioning) a autologní transplantace krvetvorných buněk. Udržovací terapie rituximabem (anti-CD20 protilátkou) se podává v intervalu 2-3 měsíce po dobu 2-3 let a má za cíl zabránit či oddálit relaps onemocnění (Delarue et al., 2013; Dreyling et al., 2005; Gianni et al., 2003; Robinson et al., 2015).

V případě, že se jedná o pacienta staršího či komorbidního, využívá se méně intenzivních léčebných režimů založených na alkylačních látkách a anthracyklinech (např. CHOP – cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison) anebo na cytostatiku bendamustin, s to pokaždé v kombinaci s rituximabem (např. jako R-CHOP či R-Bendamustin). U pacientů, kteří nejsou únosní ani středně dávkované imunochemoterapie z důvodu vysokého věku či komorbidit je možné podat kombinaci monoklonální protilátky a perorálního cytostatika chlorambucil (Kluin-Nelemans and Doorduijn, 2018; Liu et al., 2015).

I přes mnohdy velmi intenzivní léčbu dojde u velké části pacientů buď k nedostatečné odpovědi (mluvíme o refrakterní chorobě) anebo k návratu choroby (tzv. relapsu). V současné době by pacienti s návratem MCL měli být léčeni cíleným inhibítozem Brutonovy tyrosinkinázy ibrutinibem (Dreyling et al., 2014). Použití ibrutinibu výrazně zlepšilo výsledky R/R MCL pacientů (Dreyling et al., 2016; Rule et al., 2019; Rule et al., 2018; Wang et al., 2013). Bohužel u většiny pacientů léčených monoterapií ibrutinibem nakonec dojde k návratu choroby. Klinicky se relapsy po ibrutinibu projevují velice často jako biologicky vysoce agresivní choroby s velmi špatnou prognózou, s mediánem celkového přežití 6-12 měsíců bez ohledu na použitou záchrannou terapii (Epperla et al., 2017; Cheah et al., 2015; Jain et al., 2018; Martin et al., 2016). Vnitřní změny lymfomových buněk stejně jako faktory mikroprostředí mohou aktivovat náhradní metabolické cesty (např. PI3K-AKT-mTOR nebo NFκB) umožňující překonání závislosti MCL buněk na signalizaci z B-buněčného receptoru. Některé z těchto cest jsou též důležitými regulátory angiogeneze. Inhibitor NFκB bortezomib je schválen k léčbě relabovaných či refrakterních (R/R) forem MCL. Inhibitory PI3K-delta (např. pascalisib) vykazaly v rámci klinických studií nadějnou aktivitu u pacientů s R/R MCL a to i po selhání ibrutinibu (Herskovitz-Rokah et al., 2018; Ma et al., 2014; Zhao et al., 2017). Mezi nové cílené léky testované v léčbě MCL patří též inhibitor anti-apoptotického proteinu BCL2 venetoklax. S úspěchem se ale používá i kombinace bendamustinu a cytarabinu, opět v kombinaci s monoklonální protilátkou rituximab (režim R-BAC).

Jedinou potenciálně kurativní metodou u pacientů s R/R MCL představuje alogenní transplantace kostní dřeně, kterou však většina těchto pacientů není schopna podstoupit právě z důvodu vysokého věku či komorbidit (Sandoval-Sus et al., 2019). Recentně byla v léčbě MCL schválena vysoce inovativní buněčná terapie pomocí geneticky modifikovaných autologních T-lymfocytů s tzv. chimerickým antigenním receptorem (CAR T-cells).

Brexucaptogene autoleucel je schopen navodit dlouhodobé remise u těžce předléčených pacientů s MCL včetně pacientů s komplexními cytogenetickými změnami (Anderson et al., 2021; Hanel and Epperla, 2020; Mian and Hill, 2021). Prognóza pacientů s R/R MCL zůstává i přes rozšíření léčebných možností i nadále velmi nejistá (Dreyling et al., 2013; Jain and Wang, 2019).

2. ANGIOGENEZE

Vznik nových cév, neovaskularizace, je nezbytná pro růst tkání, jelikož umožňuje transport kyslíku a živin do nově vznikajících tkání a odvod metabolitů. Proces neovaskularizace je odlišný v embryogenezi, během fyziologických procesů (např. hojení ran nebo růst endometria) anebo během patologických procesů (zánět, růst tumorů), kdy dochází k významné deregulaci angiogeneze (Kopp et al., 2006).

Byly popsány 2 typy neovaskularizace: vaskulogeneze a angiogeneze. Během vaskulogeneze dochází k tvorbě cév z endoteliálních progenitorů (bez preexistujících cév). Tento proces je typický pro embryogenezi. Angiogeneze, vznik nových cév z preexistujících cév, je hlavním mechanismem novotvorby cév v postnatálním období. Angiogeneze je složitý proces striktně regulovaný hladinami proangiogenních a antiangiogenních faktorů (Dome et al., 2007).

2.1. VEGF/VEGFR SIGNALIZACE

Rodina VEGF zahrnuje 5 proteinů: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD a placentální růstový faktor (PlGF). Alternativní splicing pak dává za vznik izoformám s odlišnou biologickou aktivitou. Hlavním stimulatorem angiogeneze jsou izoformy VEGFA₁₂₁ a VEGFA₁₆₅. VEGFA₁₂₁ je solubilní faktor, VEGFA₁₆₅ je částečně vázán na buněčný povrch a extracelulární matrix, částečně

secernován (Ferrara and Kerbel, 2005). VEGFC a VEGFD jsou zapojeny primárně do lymfangiogeneze (Alitalo et al., 2005).

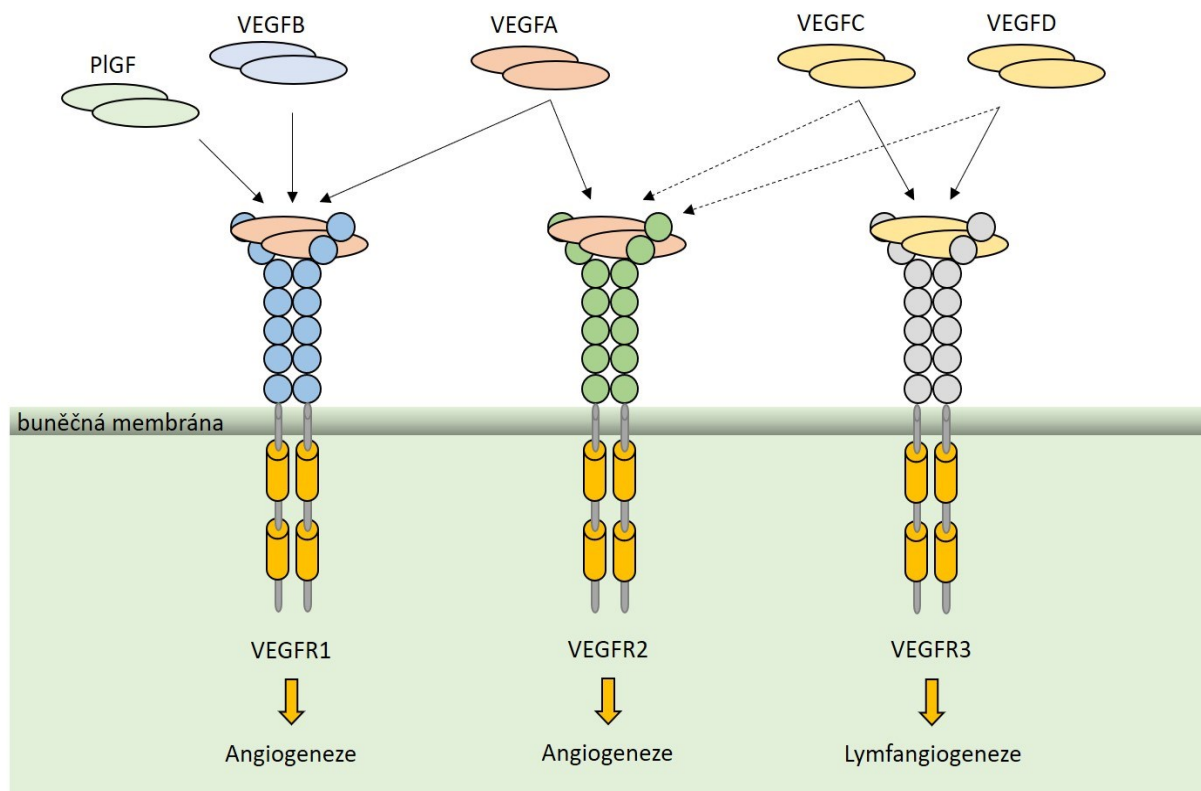
Rodina VEGF je blízká rodině destičkového růstového faktoru (PDGF) svou strukturou zahrnující inter- a intrařetězové disulfidické můstky mezi osmi cysteinovými zbytky. VEGFA obsahuje dva monomerní řetězce v antiparalelním uspořádání tvořící dimerní strukturu. Na každém pólu dimeru se nachází vazebné místo pro receptor (Muller et al., 1997). VEGF růstové faktory jsou obvykle přítomny ve formě homodimerů, ale VEGFA a PlGF se mohou vyskytovat též jako heterodimery (De Falco et al., 2002).

VEGF faktory se mohou vázat na 3 typy tyrosinkinázových receptorů: VEGFR1, VEGFR2 a VEGFR3 (Obrázek 1), případně na některé koreceptory (např. neurofillin 3). VEGFA se váže na VEGFR1 (inhibice angiogeneze) a VEGFR2 (stimulace angiogeneze) a má největší proangiogenní potenciál (Pajusola et al., 1992; Terman et al., 1992). VEGFB a PlGF se vážou na VEGFR1, blokují tak navázání VEGFA, tím zabraňují inhibici angiogeneze a fungují tak jako regulátory buněčné stimulace. VEGFC a VEGFD se váží na VEGFR3, který stimuluje především lymfangiogenezi (Ferrara and Kerbel, 2005), po proteolytickém štěpení se též mohou navázat na VEGFR2 (Pajusola et al., 1992).

Exprese VEGF a VEGFR je pozitivně regulována hypoxií indikovaným faktorem 1 (HIF-1) ať už během fyziologického růstu tkání nebo během patologických procesů (růst nádoru) (Germain et al., 2010). HIF-1 ale není jediným regulátorem angiogeneze – byla popsána řada dalších růstových faktorů a cytokinů, které ovlivňují hladiny VEGF a VEGFR – např. receptory pro epidermální růstový faktor, rodina PDGF, cyklooxygenázy, receptor pro insulin like growth factor-I, hepatocytární růstový faktor, rodina transkripčních faktorů ETS (Dong et al., 2004; Needleman et al., 1986; Randi et al., 2009; Reinmuth et al., 2002; Van Belle et al., 1998), dále

některé onkogeny a tumor-supresory (např. BCR-ABL, p53, Ras, PTEN) (Dias et al., 2001; Fujisawa et al., 2003; Konishi et al., 2000; Zundel et al., 2000) .

VEGF může mít jak autokrinní, tak parakrinní efekt. Zejména jeho autokrinní efekt je esenciální pro přežití endotelových buněk (Lee et al., 2007).



Obrázek 1. VEGF a jejich receptory. Růstové faktory VEGF rodiny se mohou vázat na 3 typy tyrosinkinázových receptorů: VEGFR1, VEGFR2 a VEGFR3 (přerušovanou šipkou je zobrazena vazba možná pouze po proteolytickém štěpení faktoru).

2.2. ÚLOHA DRÁHY PI3K/AKT/mTOR V ANGIOGENEZI

Dráha PI3K/AKT/mTOR má nezastupitelnou roli v buněčném metabolismu, migraci, proliferaci, přežití a též v angiogenezi (Bader et al., 2005). Konstituční aktivace této dráhy byla popsána jako jeden z hnacích mechanismů patogeneze mnoha nádorů, včetně karcinomu

prostaty, prsu, plic apod., stejně jako u některých hematologických malignit - DLBCL a MCL (Luo et al., 2003; Rudelius et al., 2006; Uddin et al., 2006).

Řada povrchových buněčných receptorů využívá fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) jako proximálního posla (mimo jiné i VEGFR2). Fosforylace PI3K vede ke zvýšení hladiny membránového lipidu fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3), jenž plní funkci druhého posla. Hladiny PIP3 jsou negativně regulovány několika fosfatázami, např. fosfatázový a tensinový homolog detekovaný na chromozomu 10 (PTEN) (Toker and Cantley, 1997). PIP3 se váže na AKT a usnadňuje tak jeho fosforylaci fosfoinositid-dependentní proteinkinázou 1 (PDK1). Aktivovaný AKT může stimulovat několik cílových molekul, řada z nich funguje jako regulátor buněčného cyklu, mediátor apoptózy anebo ovlivňují transkripci – např. proapoptotický protein Bad, mammalian target of rapamycin (mTOR), hypoxií indukovaný faktor 1 alfa (HIF1 α) (del Peso et al., 1997; Hay, 2005). Nadměrná stimulace dráhy PI3K/AKT (např. inhibicí PTEN) vede k nadměrné expresi HIF1 α a tím k excesivní produkci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A (VEGFA), který je velmi silným proangiogenním faktorem, jenž pak nadměrně stimuluje angiogenezi (Xue et al., 2018).

2.3. NÁDOROVÁ ANGIOGENEZE

Cévy vzniklé během fyziologických a patologických procesů vykazují rozdílnou strukturu. Fyziologické cévy jsou hierarchicky organizované (arterie – kapilára – vena) a dobře perfundované, na rozdíl od nádorové vaskulatury, která je obvykle chaotická a morfologicky abnormální. Z tohoto důvodu dochází v nádorových cévách často k částečné, někdy i úplné trombotizaci, což snižuje průtok a zvyšuje tkáňovou hypoxii v postižené oblasti. Takto vzniklá hypoxie opět stimuluje nádorovou angiogenezi (Fukumura and Jain, 2007). Nádorové cévy jsou též výrazně propustnější ve srovnání s fyziologickými cévami, a to nejen v důsledku

menšího množství perivaskulární podpůrné tkáně, ale také jako následek vyšší úrovně hypoxie a následné vyšší exprese VEGF, vaskulárního permeabilního faktoru (VPF) a prozánětlivých cytokinů v rostoucím tumoru. Produkce dalších růstových faktorů (např. FGF) pak zvyšuje rychlost růstu nádoru a deregulaci angiogeneze (Fukumura and Jain, 2007).

Dlouhou dobu se předpokládalo, že nádorové cévy mohou vznikat pouze procesem tzv. angiogeneze pučením. Ačkoli je tento typ angiogeneze dominantním mechanismem, byly popsány další, alternativní možnosti novotvorby cév – vaskulogenní mimikry, koopce cév, mozaikové cévy, intususcepce (Dome et al., 2007).

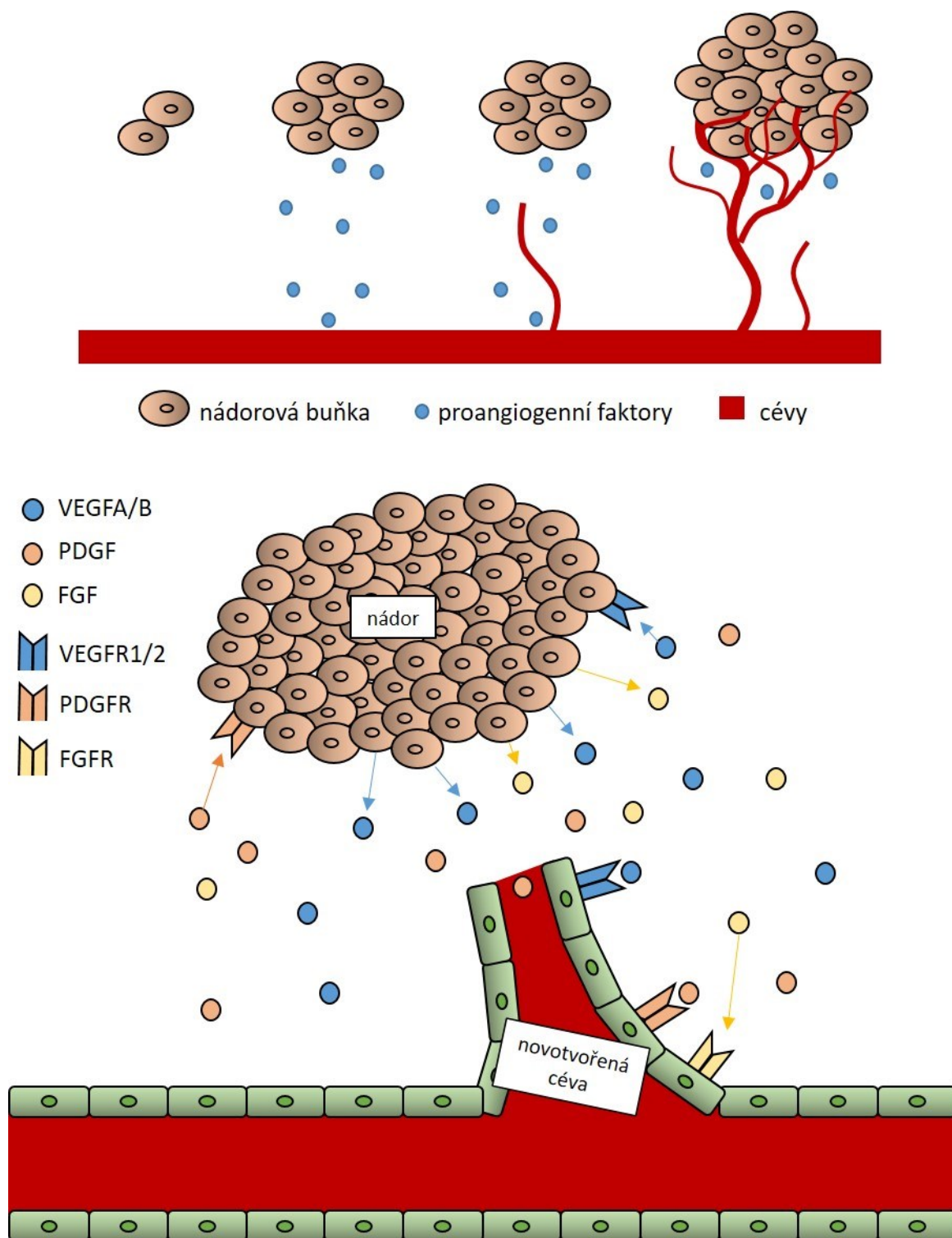
2.3.1. ANGIOGENEZE PUČENÍM A ANGIOGENNÍ PŘEPNUTÍ

Proces angiogeneze pučením („sprouting“ angiogeneze) je silně závislý na tenzi kyslíku v tumoru. Pokud nádorové buňky přerostou tkáňový difúzní limit pro kyslík (tj. 100-200 μ m), vzniklá hypoxie způsobí dimerizaci HIF-1 α s HIF-1 β (a tedy jeho stabilizaci), vzniklý dimer se váže na promotor genu *VEGFA* a indukuje transkripci velkého množství *VEGFA* mRNA. HIF-1 α je tedy odpovědný za hypoxií indukovanou overexpresi *VEGFA* (Harris, 2002; Levy et al., 1995). Během iniciace pučení cévy v odpovědi na stimulaci proangiogenními faktory (zejm. VPF a *VEGFA*) dilatují a stávají se propustnými (efekt zprostředkován zvýšením exprese oxidu dusnatého), dochází k tvorbě fenestrací a redistribuci CD31/PECAM-1 a vaskulárního endoteliálního cadherinu (Carmeliet, 2005; Dvorak et al., 1995). Angiopoetin 2 (Ang-2, mediátor Tie-2 signalizace) se účastní oddělení pericytů a ztráty matrix.

Následná proliferace endotelu a migrace endoteliálních buněk je stimulována působením řady látek - např. transformující růstový faktor β 1 (TGF- β 1), *VEGFA*, FGF, Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), chemokiny, destičkový růstový faktor (PDGF). Během pučení dochází ke zvýšené expresi řady integrinů, z nich nejvýznamnější je α v β 3, který zprostředkovává migraci

endoteliálních buněk ve stromatu nádorů s obsahem fibrin a vazbou na matrixovou metaloproteinázu 2 umožňuje setrvání bazální membrány cév v propustném stavu (Serini et al., 2006). Endoteliální buňky se diferencují. Tzv. špičkové buňky, které exprimují delta-like 4 (DLL4), jsou neproliferativní buňky umístěné v horní části nových cév a vedou směr nové cévy v reakci na signály VEGFA (Jakobsson et al., 2010). Stonkové buňky, které exprimují Notch-1, jsou naopak vysoce proliferativní a mají schopnost prodloužit klíčící cévu, pokud přijímají signalizaci DLL4/Notch (Liu et al., 2014). Během další formace cévy se endotelové progenitorové buňky podílejí na konstrukci vnitřní vrstvy nových krevních cév, přičemž pericyty (specializované svalové buňky) stabilizují cévní trubice poskytnutím strukturální podpory a vytvořením vnější vrstvy kolem endoteliálních buněk, následuje konstrukce bazální membrány (Bergers and Song, 2005).

Angiogenním přepnutím (tzv. angiogenní „switch“) rozumíme přechod tumoru z avaskulárního do vaskulárního stavu, tedy jeho vlastní napojení na systémové cévní řečiště (Ribatti et al., 2007) (Obrázek 2).



Obrázek 2. Angiogeneze pučením. Nádorové buňky při nedostatku kyslíku a živin uvolňují proangiogenní faktory, které aktivují a stimulují proliferaci endoteliálních buněk. Napojením na krevní oběh („angiogenní přepnutí“) nádor dále prosperuje.

2.3.2. ALTERNATIVNÍ MECHANISMY ANGIOGENEZE

Mezi alternativní mechanismy angiogeneze řadíme koopci cév, vaskulogenní mimikry, mozaikové cévy a intususcepci (schematické znázornění viz Obrázek 3).

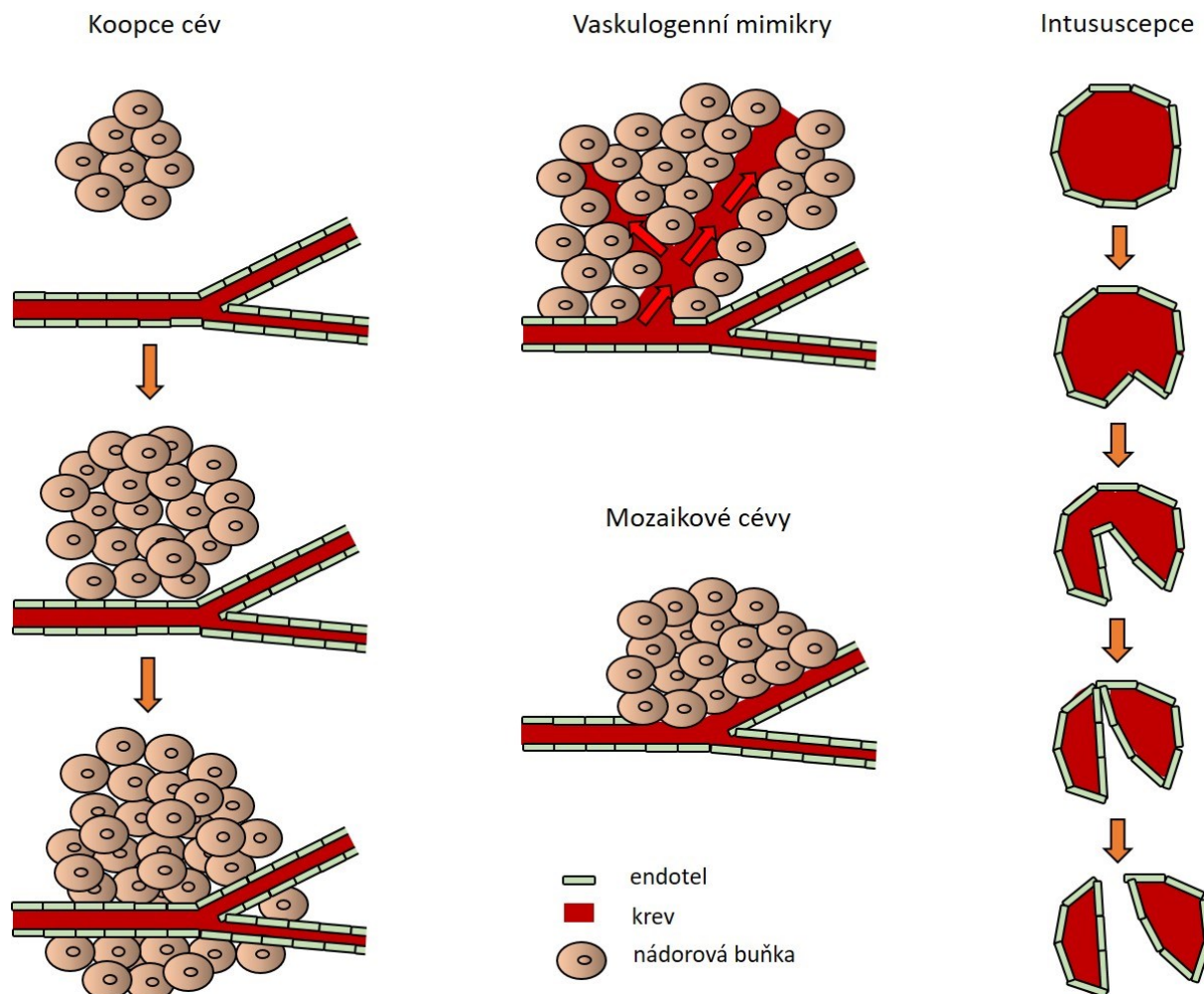
Jako jeden z prvních alternativních mechanismů angiogeneze byla popsána tzv. **koopce cév**.

Roku 1999 Holash et al. publikoval první studii zmiňující, že tumor by mohl získat cévy inkorporací již existujících „hostitelských“ kapilár (Holash et al., 1999). Nejprve se předpokládalo, že se jedná pouze o iniciační proces tumorigeneze, později ale bylo dokázáno, že koopce může být přítomna po celou dobu růstu tumoru bez ohledu na to, jestli jde o primární tumor nebo již metastázu (Dome et al., 2002; Vermeulen et al., 2001).

Dalším alternativním mechanismem jsou **vaskulogenní mimikry**. Jedná se o formaci obsahující mikrocirkulační kanály, které jsou ohraničeny neendoteliálními buňkami. Vaskulogenní mimikry byly poprvé popsány u maligního melanomu, kde korelovaly s vysokou agresivitou a špatnou prognózou. Mohou vzniknout z pluripotentních embryonálních buněk anebo vznikají u vysoce agresivních tumorů primárních i metastazujících. Vaskulogenní mimikry fungují jako krevní cévy (Maniotis et al., 1999).

Mozaikové cévy jsou typické pro subpopulace nádorových buněk, které se inkorporovaly do cévní stěny, kde sdílejí prostor s endoteliálními buňkami, takže cévní stěna je tvořena částečně tumorem, částečně endotelem. Nádorové buňky vystavené cévnímu lumen se snadno uvolní do cirkulace, čímž je usnadněno metastazování angiogenní cestou (Chang et al., 2000).

Intususcepce je charakterizována inzercí sloupků pojivové tkáně do již existujícího cévního lumen. Postupným růstem těchto sloupků pak dochází k úplnému rozdělení lumen cévy (Kurz et al., 2003). Intususceptivní růst nasedá na angiogenezi pučením a zvyšuje tak složitost a hustotu mikrovaskulárního řečiště (Siveen et al., 2017).



Obrázek 3. Alternativní mechanismy angiogeneze schematicky.

2.4. ANGIOGENEZE U HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

V případě hematologických malignit zůstává role angiogeneze, a tedy i antiangiogenní terapie nejasná. Na rozdíl od solidních nádorů nebývá u hematologických chorob pozorována signifikantní angiogeneze pučením, přesto ale předpokládáme, že angiogenní faktory (VEGF apod.) mají vliv na proliferaci a antiapoptotické buněčné mechanismy cestou autokrinní a parakrinní stimulace (Dias et al., 2001).

U některých nádorů, včetně akutní lymfoblastové leukemie (ALL) a lymfomů, byla pozorována zvýšená exprese VEGFR1 a VEGFR2. Předpokládá se, že cestou autokrinních mechanismů tyto

tumory přežívají, proliferují a metastazují (Dias et al., 2001). Podobně zvýšeně je exprimován na povrchu lymfomových buněk i VEGFA, což bylo pozorováno především u agresivních non-Hodgkinských lymfomů (NHL), ale také u chronické lymfocytární leukemie (CLL). Tato měření podporují hypotézu o důležitosti autokrinní a parakrinní stimulace u hematologických malignit (Foss et al., 1997). Tyto nálezy potvrzují experimentální data s použitím NOD-SCID myších lymfomových xenotransplantátů, kde zablokování VEGFR1 a VEGFR2 způsobilo růstovou deprivaci tumorů (Wang et al., 2004).

V minulosti byl též zkoumán prognostický vliv hladin VEGFA. Ze sledování sérových hladin VEGFA u pacientů s NHL bylo zjištěno, že hladina VEGFA koreluje s agresivitou lymfomu (nízké hladiny u indolentních lymfomů, vysoké u agresivních) a tedy i s celkovým přežitím pacientů (vyšší hladiny korelovaly s kratším přežitím) (Salven et al., 2000; Stewart et al., 2002). Analogicky byl pozorován nárůst hladin VEGFA při transformaci indolentního B-NHL (většinou folikulární lymfom) do agresivního difúzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL) (Kuramoto et al., 2002).

2.4.1. ANGIOGENEZE U MCL

V roce 2014 Palomero et al. demonstroval, že nádorová angiogeneze u MCL může být pozitivně regulována pomocí transkripčního faktoru SOX11, skrze zvýšenou transkripci proangiogenního faktoru PDGFA. Inhibitor PDGFA imatinib inhiboval růst SOX11-pozitivních MCL xenotransplantátů pomocí blokády angiogeneze (Palomero et al., 2014). Korelace mezi mírou exprese SOX11 a mírou angiogeneze (vyjádřenou jako hustota mikrocév) byla následně prokázána na primárních vzorcích uzlin získaných od pacientů s nově diagnostikovaným MCL (Petrakis et al., 2019).

2.5. IMUNOHISTOCHEMICKÉ HODNOCENÍ VASKULARITY TUMORU

Imunohistochemická analýza je nedílnou součástí diagnostického procesu v hematologii. V posledních letech je do značné míry diskutován prognostický vliv nádorové vaskularizace (resp. mikrovaskularizace). Pro kvantifikaci mikrocév se v současnosti používají 2 parametry, a to hustota mikrocév (MVD; microvessel density) a mikrovaskulární oblast (MVA; microvessel area). MVD je definována jako počet CD31-pozitivních profilů mikrocév na oblast řezu (Petrakis et al., 2019; Vesela et al., 2014). MVA se pak rozumí součet plochy profilů mikrocév dělený celkovou plochou tkáně (Petrakis et al., 2019).

MVD ve své podstatě odráží angiogenezi, nicméně role MVD v predikci agresivity choroby je stále nejasná. Bylo pozorováno, že u nejagresivnějších lymfomů (např. Burkittův lymfom) je MVD výrazně vyšší než u indolentních (např. folikulární lymfom) (Ria et al., 2008). Retrospektivní studie analyzující MVD na souboru 177 pacientů s MCL prokázala pozitivní korelaci mezi úrovní MVD a biologickou agresivitou MCL (definovanou jako vyšší proliferativní aktivita dle Ki-67, resp. vyšším prognostickým indexem MIPI) (Vesela et al., 2014).

Analogická data jsou v poslední době publikována i u některých solidních nádorů (karcinom prostaty, karcinom prsu), což naznačuje, že by MVD mohla být využita jako prognostický marker nejen hematologických malignit (Bono et al., 2002; Cardesa-Salzman, T. M. et al., 2011; Kumar et al., 2004; Uzzan et al., 2004).

2.6. CD31/PECAM-1

Antigen CD31, známý též jako Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), je glykoprotein exprimovaný na povrchu destiček, leukocytů a endoteliálních buněk (v adhezivní části mezibuněčných prostor). Tato molekula je kódována na chromozomu 17 a

zprostředkovává buněčnou adhezi, migraci leukocytů, angiogenezi a aktivaci integrinů (Jackson, 2003). CD31 se skládá ze šesti extracelulárních imunoglobulinových domén, transmembránové a cytoplasmatické domény. CD31 je schopen jak homologní interakce (tj. interakce s jiným CD31), tak heterogenní vazby na $\alpha\beta3$ integrin a CD38. Homologní interakce i interakce s $\alpha\beta3$ integrinem je nezbytná pro regulaci cévní permeability a transendoteliální migraci leukocytů (Piali et al., 1995; Privratsky and Newman, 2014; Sun et al., 2000). CD31 může indukovat změnu tvaru buňky a její migraci tím, že se napojí na vlákna F-aktinu a způsobí jeho přestavbu (Matsumura et al., 1997; Poggi et al., 1996). Účast CD31 při nádorové angiogenezi a migraci buněk byla potvrzena experimentálně, jednak inhibicí nádorové angiogeneze v myších s použitím specifické anti-CD31 protilátky, jednak observací narušené angiogeneze v experimentech s PECAM-1-null myšmi (Cao et al., 2009; Cao et al., 2002; Zhou et al., 1999).

V poslední době přibývá stále více důkazů, že CD31 přenáší signály k prevenci apoptózy (programované buněčné smrti), a to konkrétně inhibicí mitochondriální cesty mediované Bax proteinem (Gao, C. et al., 2003; Gao, Cunji et al., 2003; Poggi et al., 2010). Některé studie též naznačují, že CD31 může zprostředkovat růst buněk nezávislý na ukotvení a anoikis rezistenci nádorových buněk (tj. umožní, aby buňka dříve závislá na ukotvení nepodlehla po oddělení apoptóze) (Zhang et al., 2010). Roku 2013 bylo experimentálně prokázáno na myším modelu, že přihojení MCL xenotransplantátu v imunodeficientních myších je spojeno se zvýšením exprese CD31 na MCL buňkách (Molinsky et al., 2013).

Zvýšená exprese antigenu CD31 byla popsána na povrchu maligních lymfocytů (Akers et al., 2010; Boyd et al., 2009), nicméně význam tohoto nálezu (např. prognostický vliv) nebyl dále zkoumán.

V současnosti je CD31 většinou používán jako endoteliální marker pro určování MVD. Evaluace MVD v tumorech by mohla v budoucnu sloužit jako nový prognostický marker u hematologických malignit (zatím ve všech případech je vysoká MVD asociována se špatnou prognózou) (Cardesa-Salzmann, Teresa M. et al., 2011; Taskinen et al., 2010; Vesela et al., 2014).

3. ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE

Antiangiogenní terapie je založena na premise, že nádorová neovaskularizace vyžaduje indukci proliferace endoteliálních buněk, ať už specificky nebo nespecificky. Indukující látky způsobují zvýšenou produkci endoteliálních mitogenů, vnitřních mitogenů, jejich endotelových receptorů a endotelových integrinů nebo aktivují přidružené signální dráhy a matrixové metaloproteinázy (Gasparini et al., 2005). Identifikace specifických angiogenních faktorů uvolňovaných nádorem (např. VEGF) umožnila rozvoj cílené antiangiogenní terapie. Inhibicí angiogeneze dochází k narušení nejen dodávky kyslíku a živin, ale také k narušení nezávislosti nádoru a jeho parakrinní stimulace.

Antiangiogenní terapie může být zaměřena na různé úrovně angiogenní stimulace. Rozlišujeme přímé inhibitory VEGF (např. bevacizumab, VEGF-Trap) (Sherman et al., 2019; Yamada et al., 2021), tyrosinkinázové inhibitory cílené na receptory pro VEGF (Sonpavde and Hutson, 2008) nebo na receptory jiných proangiogenních faktorů, a inhibitory proangiogenní signalizace downstream od VEGF receptoru - např. inhibitory mTOR. Antiangiogenní účinek vykazují ale i další protinádorové látky, včetně imunomodulačních látek (thalidomid, lenalidomid apod.) (Peach et al., 2020; Ribatti and Vacca, 2005; Stefoni et al., 2018), inhibitory histondeacetyláz, inhibitory proteazomu (bortezomib) a další látky (Berardi et al., 2012).

3.1. ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE V ONKOLOGII

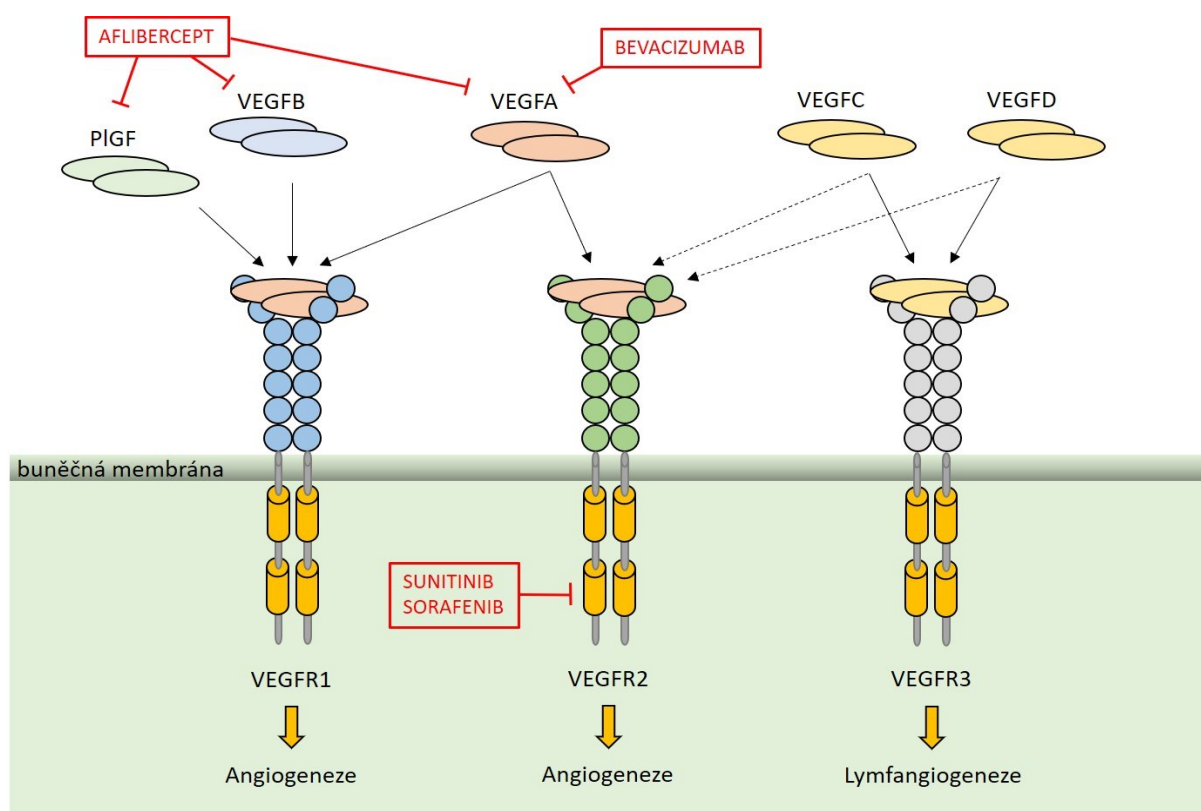
Prototypem antiangiogenní terapie je bevacizumab, rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka proti VEGFA. Cíleně blokuje VEGFA a tedy i jeho signální dráhu a tím narušuje autokrinní a parakrinní působení VEGFA (Ferrara et al., 2004) (Obrázek 4). Navzdory slibným preklinickým datům byl v raných klinických studiích zřídka pozorován významný protinádorový účinek bevacizumabu v monoterapii. K průlomů došlo až ve fázi II klinické studie, která prokázala statisticky významné prodloužení přežití u pacientů s kolorektálním karcinómem, kde byl bevacizumab zařazen do kombinované léčby spolu se standardní chemoterapií (Hurwitz et al., 2004). Na základě těchto dat se stal bevacizumab v roce 2004 prvním schváleným antiangiogenním lékem pro léčbu v onkologii, konkrétně u pacientů s kolorektálním karcinómem (Ferrara et al., 2004).

Následně byl bevacizumab testován v dalších kombinacích se standardní chemoterapií u nemalobuněčného karcinomu plic (kde došlo k prodloužení celkového přežití) a u nádoru prsu (kde došlo k významnému prodloužení doby do progresu) (Cohen et al., 2007; Jain et al., 2006). Jako monoterapie byl bevacizumab efektivní u metastatického karcinomu ledviny, kde významně prodloužil dobu do progresu, ale nikoli celkové přežití (Raymond et al., 2011; Yang et al., 2003).

Úspěch bevacizumabu odstartoval řadu klinických studií s dalšími antiangiogenními léky. Multikinázové inhibitory sunitinib (multireceptorový inhibitor cílený na VEGFR1, VEGFR2, PDGFR, FLT3 = FSM-like tyrosinkináza 3 a c-Kit) a sorafenib (multireceptorový inhibitor VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, RET, c-Kit a Raf kinázy) (Obrázek 4) prokázaly efektivitu v terapii karcinomu ledvin, stromálního gastrointestinálního tumoru, hepatocelulárního karcinomu a některých typů nádoru pankreatu (Jain et al., 2006; Poveda et al., 2017; Raymond et al., 2011). Nejnovějším multikinázovým inhibitorem je regorafenib, který cílí na receptory VEGFR1-3,

tyrosinkinázový receptor pro angiopoetin-1 a -2 (TIE2), PDGFR, FGFR, c-Kit, RET a Raf. Regorafenib se uplatňuje v terapii pokročilého hepatocelulárního karcinomu, metastatického kolorektálního karcinomu, metastatického stromálního gastrointestinálního nádoru a současně probíhá řada studií u karcinomu ledvin, nádorů měkkých tkání etc (Etrich and Seufferlein, 2018).

Aflibercept patří do skupiny tzv. VEGF pastí (VEGF-Trap). Jedná se o rekombinantní fúzní protein cílený na všechny izoformy VEGFA, dále VEGFB a PlGF (Giurdanella et al., 2015; Holash et al., 2002) (Obrázek 4). Aflibercept vykazoval vyšší afinitu k VEGF ve srovnání s VEGFR2 nebo bevacizumabem (Papadopoulos et al., 2012) a v kombinaci s chemoterapií byl v USA schválen roku 2012 pro léčbu druhé linie metastatického kolorektálního karcinomu (Van Cutsem et al., 2012). V ČR byl schválen pro léčbu vlhké formy makulární degenerace a v kombinované terapii metastazujícího kolorektálního karcinomu.



Obrázek 4. Antiangiogenní terapie v onkologii: přímé inhibitory angiogeneze a místa jejich účinku.

3.2. ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE V HEMATOONKOLOGII

Na rozdíl od solidních tumorů nemá antiangiogenní terapie v léčbě hematologických malignit pevné místo. Nicméně řada léků, které vykazují částečný antiangiogenní efekt, byla schválena k léčbě různých hematologických chorob.

3.2.1. BEVACIZUMAB

Po obrovském úspěchu v terapii solidních nádorů byl bevacizumab testován v rámci klinické studie fáze III (studie MAIN) v kombinaci se standardním imunochemoterapeutickým režimem R-CHOP (kombinace RA-CHOP) u pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL. Studie MAIN ale musela být předčasně ukončena z důvodu nepřiměřené toxicity (zejm. kardiotoxicita) kombinace bevacizumabu se standardní imunochemoterapií (Seymour et al., 2014). Zvýšený výskyt kardiotoxicity ovšem nebyl pozorován u pacientů se solidními tumory, byť byl použit též v kombinovaných režimech. Důvod zvýšeného výskytu srdečních obtíží v kohortě pacientů léčených bevacizumabem a imunochemoterapií R-CHOP zůstal neobjasněn a potenciální benefit bevacizumabu pro terapii pacientů s lymfomy v kombinaci jiné než s R-CHOP nebyl zkoumán.

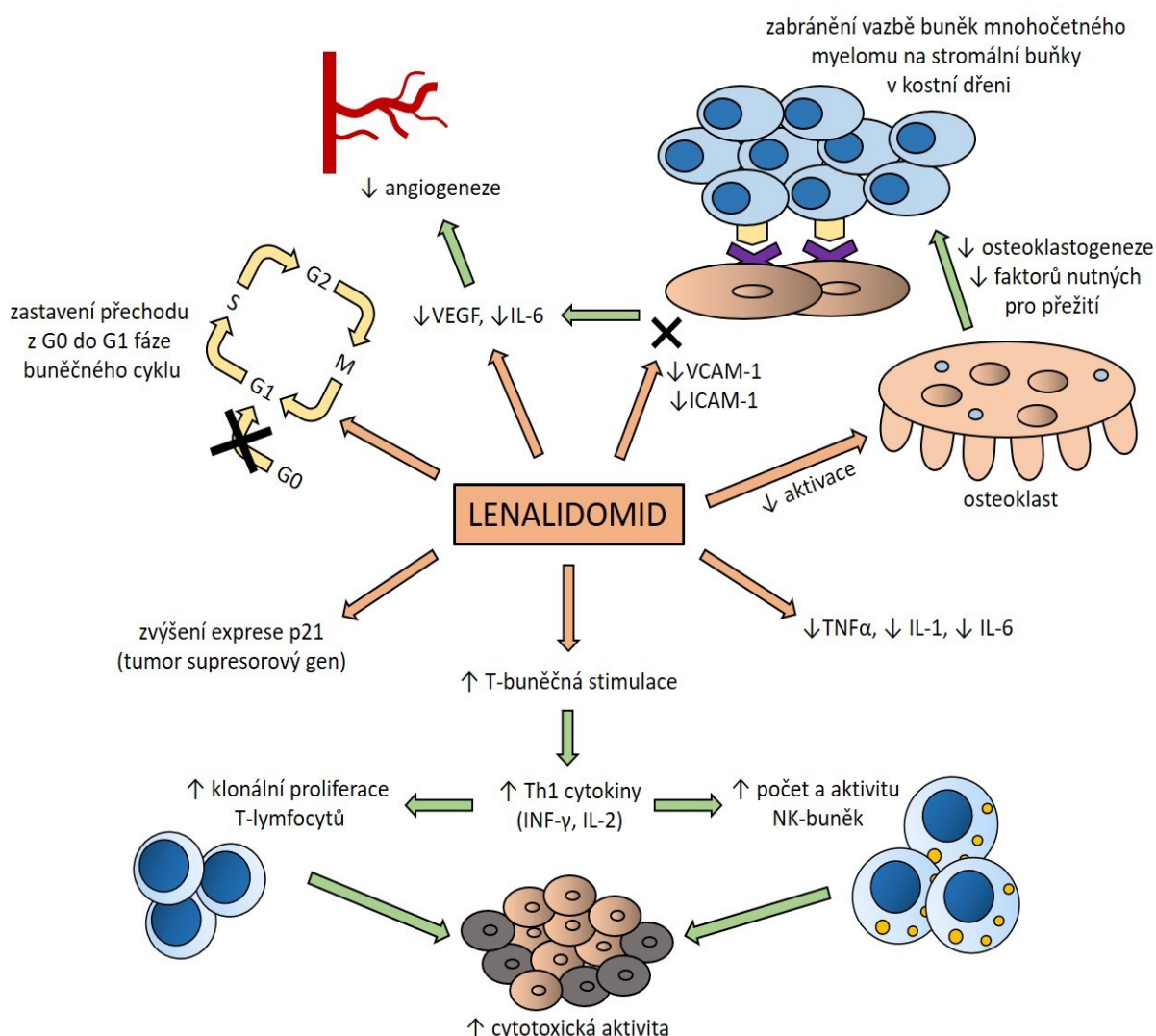
Naše vlastní preklinická data prokázala, že růst podkožních MCL xenotransplantátů v imunodeficientních myších je závislý na VEGFA, a že růst podkožních MCL tumorů může být efektivně potlačen bevacizumabem v monoterapii (Molinsky et al., 2013).

3.2.2. IMUNOMODULAČNÍ LÁTKY (THALIDOMID A LENALIDOMID)

Thalidomid (Myrin) je imunomodulační látka se silným antiangiogenním účinkem fungujícím na principu inhibice řady cytokinů, především TNF- α a VEGF (Ribatti and Vacca, 2005). Jedná

se o první inhibitor (mimo jiné) angiogeneze, který měl klinický efekt u hematologické malignity – v tomto případě mnohočetného myelomu (Barlogie et al., 2001; D'Amato et al., 1994). Později byl zjištěn významný terapeutický efekt thalidomidu i u jiných hematologických diagnóz, konkrétně u CLL (v kombinaci s fludarabinem) a MCL (v kombinaci s rituximabem) (Chanan-Khan et al., 2005; Kaufmann et al., 2004).

Lenalidomid (Revlimid) je imunomodulační látka druhé generace. Ve srovnání s thalidomidem má lenalidomid lepší imunomodulační a protinádorový efekt a zároveň méně nežádoucích účinků. Lenalidomid snižuje expresi VEGF a IL-6, čímž přímo ovlivňuje angiogenezi (Qu et al., 2016), zabraňuje přechodu buněk z G0 do G1 fáze a snižuje tak jejich proliferaci, zvyšuje expresi tumor-supresorového genu p21 (Hanashima et al., 2020), zvyšuje cytotoxickou aktivitu imunitního systému (prostřednictvím INF- γ a IL-2 stimuluje NK-buňky a klonální proliferaci T-lymfocytů) (Gribben et al., 2015), snižuje expresi vaskulární buněčné adhezivní molekuly 1 (VCAM-1) a intercelulární adhezivní molekuly 1 (ICAM-1), čímž zabraňuje vazbě myelomových buněk na stromální buňky kostní dřeně, snižuje též aktivitu osteoklastů v kostní dřeni a negativně tak ovlivňuje signalizaci mikroprostředí nutnou pro přežití myelomových buněk (Breitkreutz et al., 2008) (Obrázek 5). V Evropě a v USA je lenalidomid běžně používán v kombinační terapii u mnohočetného myelomu (Mohty et al., 2018; Richter et al., 2021). Mimo terapie mnohočetného myelomu prokázal lenalidomid signifikantní efekt ve studiích u indolentních i agresivních B-NHL (včetně MCL) a také u CLL, kde se používal buď v monoterapii, anebo v kombinaci s rituximabem (Witzig et al., 2015). V České republice je lenalidomid schválen pro léčbu mnohočetného myelomu, některých subtypů myelodysplastického syndromu, folikulárního lymfomu a k monoterapii R/R MCL u dospělých pacientů.



Obrázek 5. Mechanismy účinku lenalidomidu u hematologických malignit. Lenalidomid má v lidském těle řadu účinků, jimiž ovlivňuje nejen vlastní nádorové buňky, ale též imunitní odpověď i mikroprostředí tumoru.

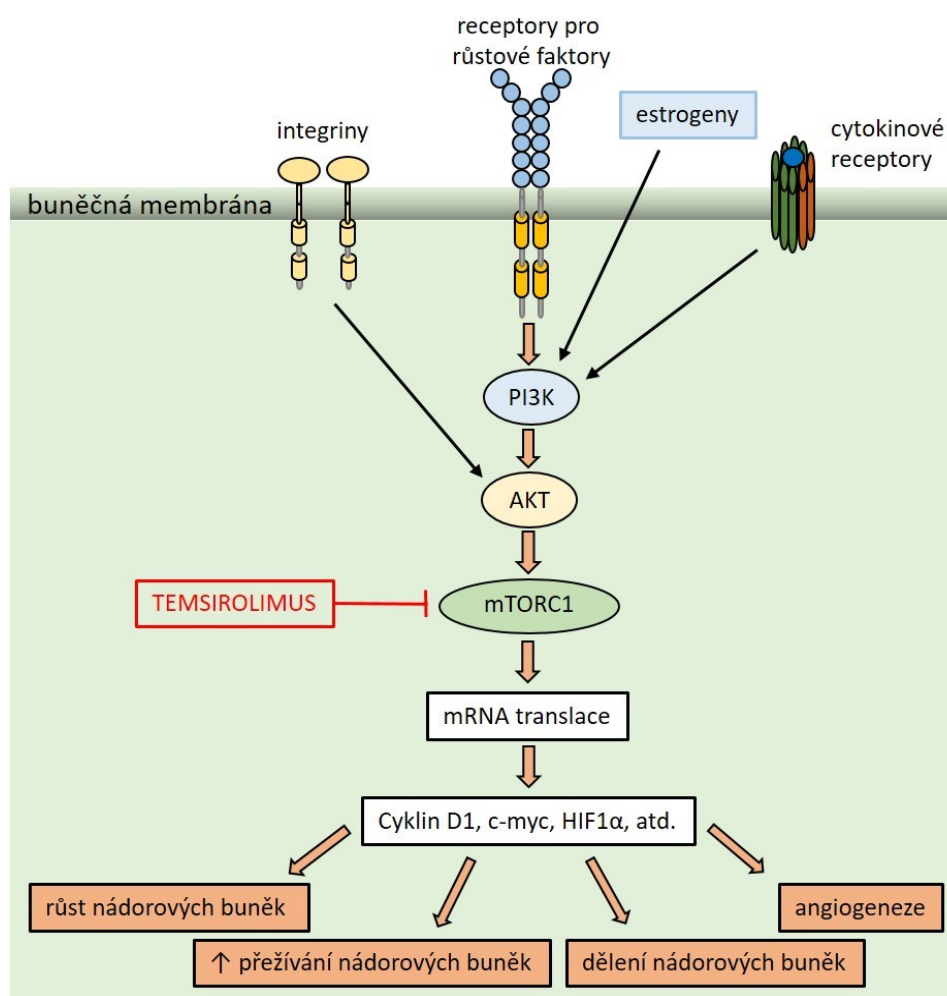
3.2.3. TEMSIROLIMUS

PI3K/AKT/mTOR dráha ovlivňuje řadu buněčných procesů, včetně metabolismu, proliferace, růstu buněk a jejich přežití a ovlivňuje zapojení alternativních drah angiogeneze (Vivanco and Sawyers, 2002). V preklinických studiích byla zkoušena řada látek blokuujících tuto dráhu, z nichž některé jsou již schváleny pro použití v onkologii.

V klinické praxi jsou využívány především mTOR inhibitory (např. temsirolimus). Mechanismus protinádorového účinku temsirolimu spočívá v inhibici TORC1 proteinového komplexu

s následným zastavením buněčného cyklu ve fázi G0/G1. Nejpravděpodobněji dochází k aktivaci glykogensyntházy-3, která vede ke zvýšenému odbourávání cyklinu D1 (Dal Col et al., 2008) (Obrázek 6).

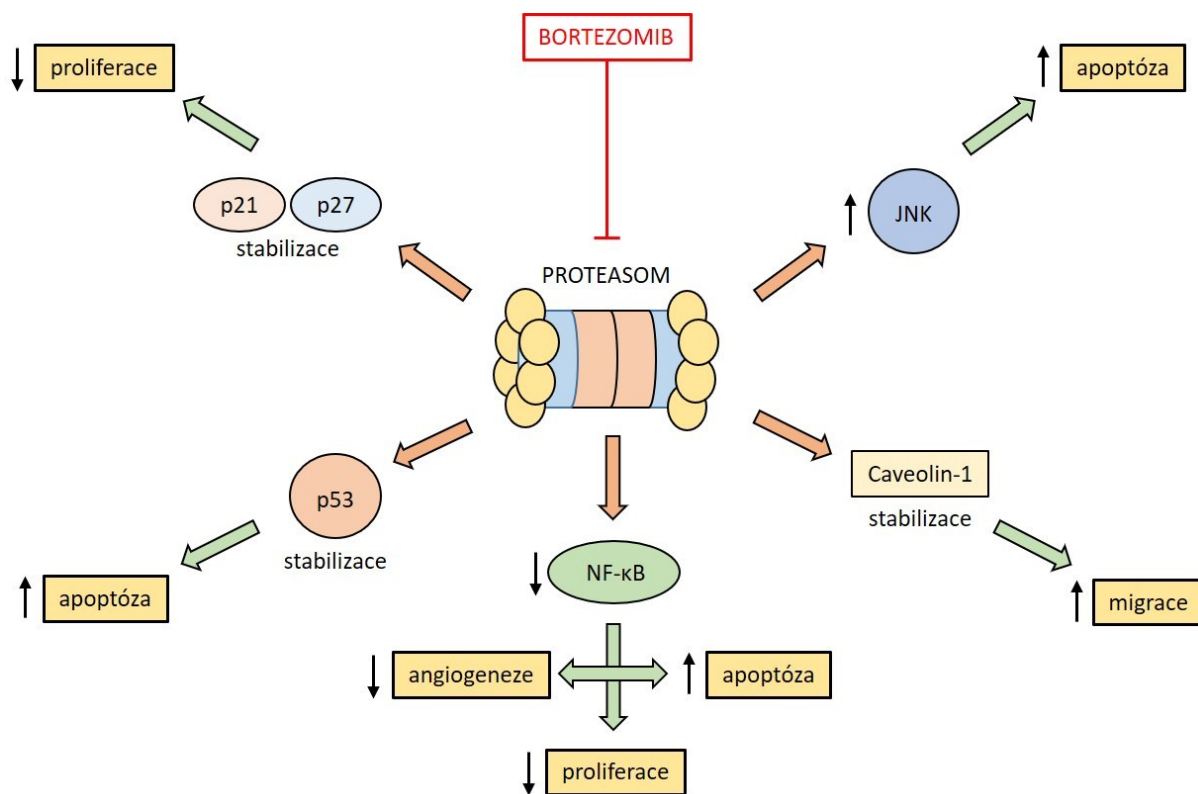
V klinické studii fáze 3 u pacientů s R/R MCL měl temsirolimus v monoterapii lepší efekt než tzv. terapie zvolená investigátorem, a následně byl temsirolimus schválen pro terapii R/R MCL (Hess et al., 2009). Podobně výsledky studie fáze 1/2 kombinující bendamustin a rituximab s temsirolimem u R/R MCL a FCL ukázaly velmi slibný účinek kombinované terapie (Hess et al., 2020). Temsirolimus je v současné době schválen pro terapii první linie vybraných typů karcinomu ledvin a pro terapii dospělých pacientů s R/R MCL.



Obrázek 6. Temsirolimus a mTOR signalizace. Buněčná stimulace různými podněty může aktivovat signální dráhu vedoucí k aktivaci mTOR, která hraje důležitou roli v růstu a proliferaci buněk, v jejich reakci na proapoptotické stimuly a regulaci angiogeneze.

3.2.4. BORTEZOMIB

Bortezomib (Velcade®) je dipeptidylboronová kyselina, která selektivně a reverzibilně inhibuje proteazom 26S: multipodjednotkový protein, který degraduje proteiny zapojené do více buněčných procesů, včetně regulace buněčného cyklu, aktivace transkripčních faktorů a apoptózy. Svůj protinádorový účinek uplatňuje hlavně prostřednictvím inhibice složek dráhy jaderného faktoru kappa B (NFκB) spojených s buněčnou proliferací, apoptózou a angiogenezí (Meusser et al., 2005; Voorhees and Orlowski, 2006) (Obrázek 7). Přestože byl původně vyvinut jako protizánětlivý a kachektizující prostředek, koncem 90. let bylo zjištěno, že má protinádorovou aktivitu (Sanchez-Serrano, 2006). Jednalo se o jeden z revolučních léků v terapii mnohočetného myelomu (MM, myelom plazmatických buněk) a v poslední době i lymfomu z plášťových buněk (MCL). Bortezomib vykazuje značnou anti-myelomovou aktivitu, ať už je používán v monoterapii nebo v kombinaci s jinými protinádorovými léky u pacientů s dříve neléčeným MM i u pacientů s refrakterním MM (Palumbo and Anderson, 2011; Richardson et al., 2005). V roce 2006 byl bortezomib schválen k léčbě refrakterního/relabujícího MCL a v roce 2014 pro pacienty s dříve neléčeným MCL (Raedler, 2015).



Obrázek 7. Důsledky inhibice proteasomu bortezomibem. Alterací některých proteinů usnadňuje bortezomib přechod do apoptózy, a naopak inhibuje angiogenezi, migraci a proliferaci buněk.

HYPOTÉZY A CÍLE STUDIE

Hypotéza 1:

Rozsah neovaskularizace a stupeň hypoxie lymfomu se bude lišit v závislosti na velikosti tumoru. Hloubka hypoxie (a míra hypoxií indukované nekrózy tumoru) bude pozitivně korelovat s velikostí tumoru.

Cíl 1: Dynamické hodnocení vybraných faktorů mikroprostředí (vaskularita, hypoxie) u podkožně rostoucích PDX (xenotransplantát odvozený od pacienta) nehodgkinských lymfomů v průběhu času

1.A. in vivo analýza rozsahu neovaskularizace a hypoxie v podkožních PDX MCL tumorech v reálném čase – hodnocení ultrazvukem v různých časových bodech od přihojení lymfomu

1.B. imunohistochemická analýza (IHC) PDX MCL tumorů zaměřená na hodnocení MVD a MVA

Hypotéza 2:

Míra exprese CD31/PECAM-1 na lymfomových buňkách bude pozitivně korelovat se schopností lymfomu šířit se (metastazovat) a to díky pozitivnímu vlivu CD31/PECAM-1 na neovaskularizaci a díky ovlivnění přežití lymfomových buněk.

Cíl 2: Význam CD31/PECAM-1 v přihojení, růstu a šíření MCL

2.1. význam CD31/PECAM-1 při přihojení, růstu a šíření MCL in vivo na myších modelech MCL

2.B. prognostický / prediktivní význam exprese CD31/PECAM-1 u pacientů s MCL

Hypotéza 3:

Expres VEGFA (indukovaná primárně hypoxií) ovlivňuje nejen rozsah neovaskularizace lymfomu, ale pozitivně koreluje s agresivitou MCL buněk díky komplexní remodelaci mikroprostředí.

Cíl 3: Role angiogeneze a potenciální cílení angiogenních cest v experimentální terapii MCL

3.A. Význam VEGFA-indukované angiogeneze na přežití, růst a šíření lymfomu, a efekt anti-VEGF terapie pomocí bevacizumabu v experimentální terapii MCL na myších modelech

3.B. Vliv hypoxií indukované exprese VEGF na biologickou agresivitu lymfomových buněk

METODY

Buněčné linie

Linie JEKO1 byla získána z tkáňové banky German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). HBL-2 buněčná linie byla získána darem od profesora Dreylinga (Univerzita v Mnichově, Německo). Linie MINO byla zakoupena od American Tissue Culture Collection (ATCC). Všechny linie prošly zkouškou autentizace Multiplex Cell Authentication v Multiplexion (Heidelberg, Německo). Čistota linií byla ověřena testem Multiplex cell Contamination opět v Multiplexion (Heidelberg, Německo). Nebyla detekována žádná kontaminace. V této studii byly použity pouze linie, které prošly autentizací a testem kontaminace.

Všechny buněčné linie byly kultivovány ve vlhké atmosféře termostatu při 37 °C s 5 % CO₂, jako medium bylo použito Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) s 15 % fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % penicilinu / streptomycinu. Žádné buněčné linie nebyly kultivovány déle než 3 měsíce.

Klony s manipulovanou expresí CD31

Pro vytvoření klonů se stabilní overexpresí CD31 byly použity linie JEKO1 a MINO. Obě linie byly transfekovány systémem pUNO1-hPECAM1 (InvivoGen). Úspěšně transfekované buňky byly selektovány kultivací s blasticidinem a následnou single-cell dilucí.

Klon se stabilní downregulací CD31 byl odvozen od buněčné linie JEKO1, a to infekcí lentivirovými částicemi CD31/PECAM-1 Human GIPZ Lentiviral shRNA Particles (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) při násobnosti infekce (MOI) 10. Úspěšně transdukované buňky byly selektovány dvoudenní kultivací v médiu s puromycinem (koncentrace 4 µg/ml) a následnou single-cell dilucí.

Míra exprese CD31 upregulovaných i downregulovaných klonů byla ověřena průtokovou cytometrií.

Klony se stabilní overexpresí VEGFA

Pro vytvoření klonů HBL-2 a JEKO1 se stabilní overexpresí VEGFA byl použit Sleeping beauty transposon system (PMID: 25650551). Nejprve byla VEGFA cDNA (OriGene CAT#: RG229662) amplifikována metodou PCR pomocí oligonukleotidů s restrikčními místy SfiI, což umožnilo inzerci produktu PCR do pSBbi-Pur plasmidu (Addgene plasmid #60523). 4 µg tohoto plasmidu byly následně koelektroporovány s 6 µg savčího expresního plasmidu kódujícími transposázu (pCMV(CAT)T7-SB100, Addgene plasmid #34879). Transposáza po své expresi v cílových buňkách zprostředkovala inzerci genu pro VEGFA a pro rezistenci na puromycin s obousměrným promotorem z plasmidu pSBbi-Pur-VEGF náhodně do genomu. Dva dny po elektroporaci byly buňky selektovány šestidenní kultivací v médiu s puromycinem (koncentrace 2 µg/ml). Pro vytvoření vhodných kontrol byl proces proveden analogicky s mCardinal fluorescenčním proteinem (Addgene plasmid #51311) a prázdným pSBbi-Pur plasmidem. Elektroporace byla provedena s použitím Neon Transfection System (ThermoFisher Scientific) za dodržení následujících podmínek pro konkrétní linie: HBL-2 (1600 V, 10 ms, 3 pulsy, R pufr), JEKO1 (1500 V, 20 ms, 1 puls, R pufr).

Modely xenotransplantátů odvozených od pacienta (PDX modely)

Všechny PDX modely použité pro náš výzkum byly odvozeny od primárních (pacientských) buněk v naší laboratoři na Ústavu patologické fyziologie, 1. LF UK v Praze. Detailní postup odvození PDX modelů byl již popsán v publikaci Klánová et al. (Klanova et al., 2014). Modely VFN-M1, VFN-M2 a VFN-M5R1 byly odvozeny od pacientů refrakterních na chemoterapii,

dosud neléčených ibrutinibem, modely VFN-M11 a VFN-M12 byly odvozeny od pacientů po selhání ibrutinibu.

In vivo experimenty

Všechny studie na myších byly schváleny ústavní Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pro pokusná zvířata. Jako pokusná zvířata byly použity imunodeficientní NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ myši, které byly zakoupeny z Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Všechny experimenty byly prováděny pouze na dospělých samicích minimálně 8 - 12 týdnů starých. Tyto byly chovány v individuálně ventilovaných klecích s vodou a krmivem ad libitum.

Pro experimenty s CD31 byly myši injikovány subkutánně (SC) do levého boku buňkami linií JEKO1 nebo HBL-2 nebo jejich příslušnými klony s down- nebo upregulací CD31/PECAM-1 v celkovém počtu 5 milionů buněk na myš. Stejně množství buněk bylo použito i pro intravenózní (IV) aplikaci cestou ocasní žíly. Pro studium efektu bevacizumabu byla provedena SC xenotransplantace buněk linií HBL-2 a JEKO1 (CDX; cell line derived xenograft) a PDX VFN-M1, VFN-M2, VFN-M11 a VFN-M12 v počtu 5-10 milionů na myš. Tyto myši byly následně randomizovány do kontrolní a léčené kohorty. Skupina určená k terapii byla od 5. dne po xenotransplantaci léčena bevacizumabem třikrát týdně jednotlivou dávkou 250 mg na myš intraperitoneálně (IP), kontrolní rameno bylo „léčeno“ analogicky aplikací PBS IP. K ověření efektu zvýšené exprese VEGFA byly myším SC injikovány klony VEGF-UP a jejich odpovídající kontroly („EMPTY“).

Podkožní tumory byly měřeny ve třech na sebe kolmých rozměrech pomocí posuvného měřítka. Objem tumorů byl pak dopočítán dle vzorce $\pi/6 \times \text{délka} \times \text{šířka} \times \text{výška}$. Na základě vypočtených objemů byly vytvořeny růstové křivky tumorů. Pokud některý z tumorů dosáhl

2 cm v některém rozměru, byl experiment ukončen, tumory odebrány, pasážovány přes 40 μm buněčný filtr (Falcon). Získané buňky následně prošly magnetickým sortováním dle antigenu CD45 na LS koloně (MACS, Miltenyi Biotec) dle pokynů výrobce a takto odsortované CD45+ buňky byly následně využity pro další *in vitro* experimenty. Intravenózně injikované myši byly utraceny ihned po objevení se příznaků pokročilého lymfomu (projevy strádání, terminální paralýza), následně pečlivě prohlédnuty s cílem najít případné extranodální / extramedulární (E/E) postižení.

Před ultrazvukovým vyšetřením byla myším provedena anestezie IP aplikací ketamin / xylazinu v dávce 80/10 mg/kg (Bioveta a.s., Ivanovice na Hané, Česká republika) a byly lokálně oholeny (Strep, Miláno, Itálie). K udržení stabilní teploty 37,7 °C byla zvířata přesunuta na vyhřevný stůl (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Kanada) a připojena ke čtyřem elektrodám vysoce vodivým ultrazvukovým gelem.

Vysokofrekvenční *in vivo* ultrasonografie a fotoakustické zobrazování

Ultrasonografické a fotoakustické zobrazování bylo provedeno ve spolupráci Ing. Peterem Kešou v Centru pokročilého preklinického zobrazování (CAPI). Anatomické a molekulární zobrazování bylo provedeno za použití multimodálního zobrazovacího přístroje Vevo 3100/LAZR-X (ultrasonografie-fotoakustika; USG-PA) (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Kanada). K zobrazování byla použita lineární ultrazvuková sonda Mx400 (lineární pole 256 prvků, osové rozlišení 50 μm) (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Kanada) pracující na střední frekvenci 30 MHz v módech B a OxyHemo a 24 MHz pro barevné dopplerovské zobrazování. Sonda byla vybavená originálním pláštěm (držákem optického kabelu) pro vložení dvou úzkých (14 mm) optických kabelů (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Kanada) pro fotoakustické zobrazování nádorů v OxyHemo režimu. Jako základní nastavení ultrazvuku byl

v přístroji zvolen „Mouse Large Abdominal preset“. Pro stanovení saturace kyslíku v nádorech byl celkový fotoakustický zisk zvýšen na 40 dB u všech měření. Nastavení kompenzace časového zesílení (*angl.* Time Gain Compensation - TGC) bylo optimalizováno tak, aby bylo vidět hluboko do nádorových tkání zvýšením fotoakustického zisku pro každé patro ve zvolené oblasti zájmu (20-62-65-72-75 dB), počínaje horní vzdáleností od povrchu snímače (7 mm) směrem ke spodní vrstvě nádoru (zorné pole USG-PA 7 - 18 mm pro malé a střední nádory a 7 - 20 mm pro velké nádory). K dosažení maximální penetrace světla do tkání byla linie kůže nádoru umístěna 10 mm od povrchu sondy. Tyto parametry byly během růstu nádoru udržovány konstantní. Pro usnadnění přenosu ultrazvuku byl ve všech ultrazvukových skenech aplikován transparentní ultrazvukový gel (OXD, Barcelona, Španělsko). Měření v barevném doplerovském režimu bylo prováděno dle následujících nastavení: pulzní repetitivní frekvence: 3, vzorkovací objem: 2 a 3, zisk: 36 dB, uhel svazku: 0°, citlivost: 3 a 4, perzistence: off, filtrování nízkých frekvencí: medium, priorita (barva obrazu): 80%. Pro malé a velké nádory byla použita různá nastavení: malé nádory: citlivost: 3, zisk: 2, střední a velké nádory: citlivost: 4, zisk: 3. Během všech měření byla monitorována srdeční (EKG) a dechová frekvence zvířat. Přesnost polohy tumorů během měření byla dosažena funkcí eliminace vlivu dýchání. Tloušťka 2D řezů byla u všech 3D záznamů 80 μm . Anestetizované (ketamin/xylazin, 80/10 mg/kg, intraperitoneální aplikace) myši byly po měření zahřívány na plotnovém ohříváči s přednastavenou teplotou (37,7 °C), dokud se neprobudily.

Všechna získaná USG-PA data byla dále zpracována softwarem Vevo LAB V.3.2.5. (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Canada). Objemy tumorů v mm^3 byly určeny volumetrickou analýzou. Hodnoty saturace kyslíku v tkáních sO_2 Vital (%) (průměrná saturace kyslíku ve více viabilních částech tumorů byla stanovena jen pro barevné pixely, přičemž práh citlivosti byl nastaven na 20%) a procento vaskularizace tumoru (%) byly získány z objemové analýzy

nádoru ve čtyřech časových bodech. Hodnota celkové oxygenace tumoru (sO₂ Total) byla pro každý tumor stanovena ze všech pixelů v jednotlivých 2D řezech včetně černých pixelů (černé pixely mají hodnotu 0%). Parametr sO₂ Total vypovídá o přítomnosti méně viabilních nebo nekrotických oblastí v nádoru.

Měření proliferace *in vitro*

Vliv CD31 up- a downregulace na buněčnou proliferaci *in vitro* byl hodnocen pomocí Quick Cell Proliferation Assay Kit (BioVision, Milpitas, Kalifornie, USA), využívajícího WST8. Zkráceně, 10 tisíc buněk bylo inkubováno po přesně stanovenou dobu (0 - 96 hodin), proliferační souprava byla použita dle pokynů výrobce. Výsledná absorbance vzorků byla měřena po 3 hodinách inkubace na přístroji Sunrise (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švýcarsko).

ELISA

Hladina lidského VEGFA (hVEGFA) v lyzátech SC tumorů byla změřena pomocí kitu Quantikine® ELISA – Human VEGF Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) na přístroji Sunrise (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švýcarsko). Jako negativní kontrolu jsme použili vzorek s myším VEGFA (PeproTech, Londýn, Velká Británie).

Průtoková cytometrie (FCM)

Všechny experimenty využívající patientské tkáně byly schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (1816/15 S-IV). Po podepsání informovaného souhlasu byla od pacientů s diagnózou MCL získána periferní krev a kostní dřeň. Získané vzorky byly promyty PBS a následně barveny 15 minut ve tmě při pokojové teplotě. V následujícím kroku byl přidán FACS Lysing Solution (BD, San Jose, Kalifornie, USA) a po dalších 10 minutách inkubace byly

vzorky dvakrát promyty PBS. K rozlišení jednotlivých buněčných subpopulací byly použity následující fluorochrom-konjugované monoklonální protilátky: CD5 PerCP-Cy5.5 (klon L17F12, BD, San Jose, Kalifornie, USA), CD19 PE-Cy7 (klon J3-119, Beckman Coulter, Miami, Florida, USA), CD31 FITC (klon WM59, BD, San Jose, Kalifornie, USA), CD45 Krome Orange (klon J33, Beckman Coulter, Miami, Florida, USA). MCL buňky byly charakterizovány koexpresí CD19 a CD5 (CD19+CD5+) s jednou výjimkou CD5-negativního MCL s potvrzenou translokací t(11;14). Všechny vzorky byly hodnoceny na přístroji FACS Canto (BD, San Jose, Kalifornie, USA) nebo Navios (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA). K nastavení standardního provozního protokolu byl použit nástroj EuroFlow (Kalina et al., 2012). K monitorování výkonnosti nástroje bylo použito Spherotech 8-Peak Validation Beads (BD, San Jose, Kalifornie, USA). Výsledky měření byly vyhodnoceny v systému Kaluza software, verze 2.1 (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA). K odlišení pozitivních od negativních buněk byly použity isotypové negativní kontroly během všech experimentů. K celkovému hodnocení populací bylo použito procento pozitivních buněk a medián intenzity fluorescence (MFI; median fluorescence intensity).

Imunohistochemická analýza (IHC)

Imunohistochemická analýza byla provedena ve spolupráci s dr. Jakšou (Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha), prof. Tonarem a dr. Grajciarovou (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni). Z každého PDX bločku bylo zpracováno pět náhodně orientovaných řezů. Endotel byl vizualizován pomocí imunohistochemického králičího anti-myšního CD31 monoklonálního IgG, klon SP38 (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA). Při zvětšení mikroskopu 40× bylo z každého sklíčka vyfoceno 10 mikrofotografií (tj. 50 mikrofotografií na blok tkáně) pomocí systematického rovnoměrného náhodného odběru (Doplňkový obrázek

S1; podrobnosti viz Veselá et al. 2014; Tonar et al. 2008 (Tonar et al., 2008; Vesela et al., 2014)).

Ke kvantifikaci nádorových cév bylo použito dvou parametrů – hustota mikrocév (MVD) a mikrovaskulární oblast (MVA). MVD (Doplňkový obrázek S2A) byla kvantifikována jako počet CD31-pozitivních profilů mikrocév na plochu řezu. Pomocí metody popsané v předchozích publikacích (Petrakis et al., 2019; Vesela et al., 2014) byla počítatelná céva definována jako jakýkoli profil CD31-pozitivních endoteliálních buněk nebo shluků endotelových buněk, který byl oddělen od sousedních mikrocév. Existence lumina cévy, průměru cévy či přítomnost vytvořených krevních elementů nebyly zahrnuty do kritérií definujících mikrocévu. Byly započítány profily cév umístěné plně uvnitř počítacího rámce (Gundersen, 1977) anebo profily protínající akceptační linii, ale nikoli linii odmítnutí. MVA (Doplňkový obrázek S2B) byla určena jako součet plochy profilů CD31-pozitivních mikrocév děleno celkovou plochou tkáně (Petrakis et al., 2019). Histologická kvantifikace byla provedena pomocí modulů CountingFrame a PointGrid ve stereologickém softwaru Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovenská republika).

Statistická analýza

Veškerá numerická data získaná během ultrazvukového měření byla zpracována v programu OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) a byla prezentována jako průměr \pm standardní odchylka. Pro srovnání procenta vaskularizace (MVA), procent sO2 Vital a sO2 Total tří typů tumorů byl použit jednosměrný ANOVA test. Tumory byly srovnány ve stejný časový okamžik. Srovnání exprese CD31 (% i MFI) bylo provedeno v programu GraphPad Prism. Hodnoty byly prezentovány jako průměr \pm standardní odchylka alespoň tří nezávislých testů. Rozdíly v experimentálních ramenech byly určeny nepárovým t-testem.

U terapií bevacizumabem jsme k posouzení praktického významu léčby a porovnání účinnosti terapie v různých modelech vytvořili růstové křivky tumorů. Ke zhodnocení statistické významnosti účinnosti léčby jsme pro konkrétní (dostupné) časové body (tj. dny) vypočítali rozdíly mezi průměrnými velikostmi nádorů v kontrolních skupinách a ve skupinách léčených bevacizumabem. Korekce Bonferroni byla použita k vyhlazení hladiny významnosti pro více simultánních testů hypotéz.

Jako signifikantní difference byly brány ve všech případech výsledky s hodnotou $p < 0,05$.

Transkriptomová sekvenace Next Generation Sequencing

Abychom získali vhled do mechanismů ovlivnění MCL buněk mírou exprese VEGFA a zároveň vlivu mikroprostředí, provedli jsme transkriptomovou analýzu MCL buněk klonu JEKO1 VEGF-UP ve srovnání s CTRL (JEKO1 bez upregulace). Analýza byla provedena v duplikátech z buněk pěstovaných jak in vitro, tak in vivo. Celková RNA byla izolována kitem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Kvalita RNA byla potvrzena pomocí Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA). Vzorky RNA byly následně sekvenovány v Childhood Leukaemia Investigation Prague (CLIP) na sekvenačním přístroji NextSeq 500 (Illumina, San Diego, Kalifornie, USA) dle protokolu výrobce. Sekvenační knihovny byly vytvořeny za použití Illumina TruSeq Library Prep kitu. Kvalita výsledných FastQ souborů byla kontrolována pomocí FastQC programu. Vyhodnocení dat proběhlo ve spolupráci s Mgr. Dmitrym Kazantsevem, Ph.D. na Ústavu patologické fyziologie 1.LF UK. Rozdíly v expresi byly stanoveny na základě bioinformatického algoritmu, který využívá softwarové nástroje EdgeR, limma a fastgsea R (McCarthy et al., 2012; Ritchie et al., 2015). Rozdíl v expresi genů byl považován za signifikantní v případě detekce minimálně dvojnásobné změny v expresi a v případě $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

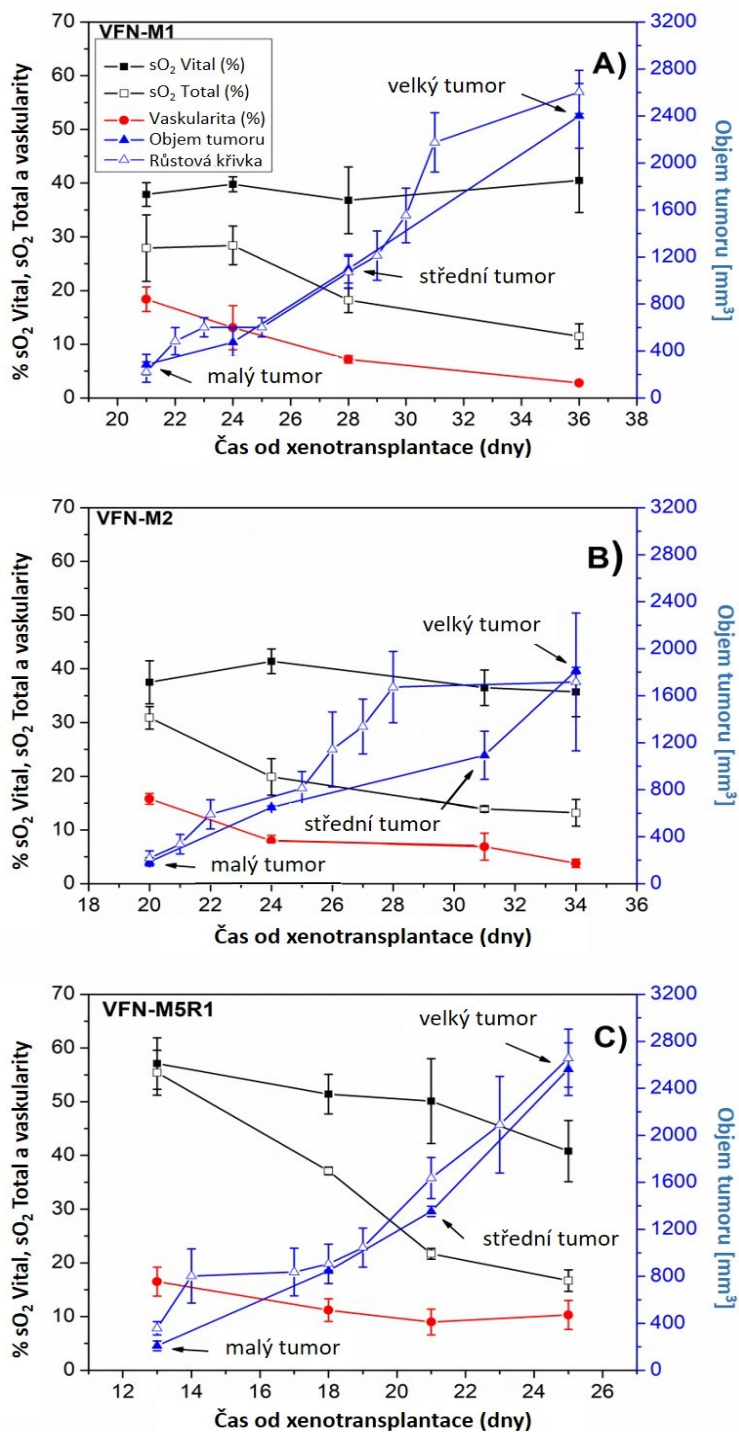
Anatomické a molekulární zobrazení MCL PDX: od hypoxie po nekrózu

Kombinovaný přístup fotoakustického monitorování saturace kyslíkem v tkáních a ultrazvukového dopplerovského zobrazování umožňuje neinvazivní prostorové stanovení okysličených a nekrotických oblastí a perfúzi tumoru v reálném čase. V této studii byly použity tři PDX modely MCL, konkrétně VFN-M1 (3 myši), VFN-M2 (3 myši) a VFN-M5R1 (3 myši).

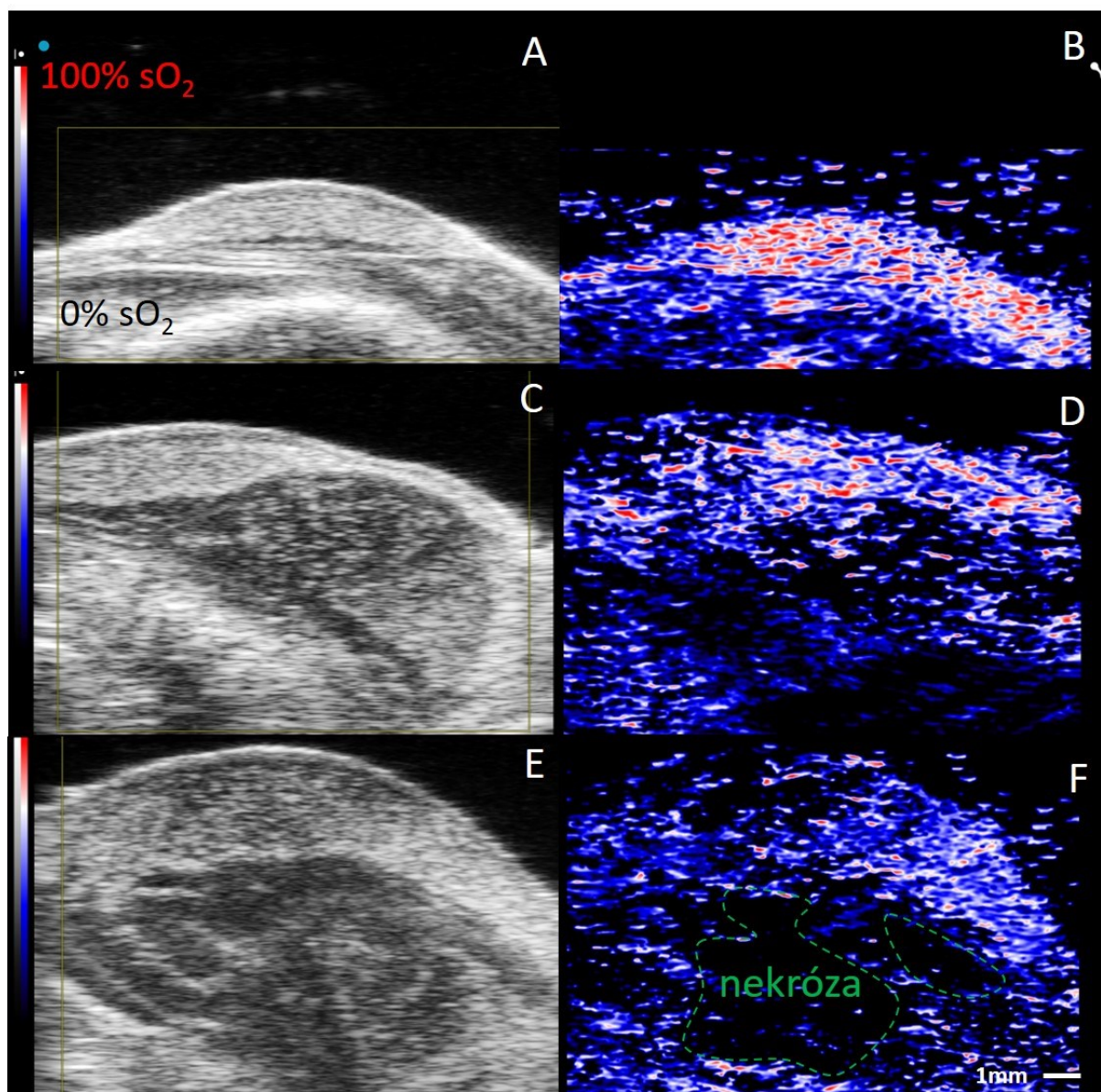
U všech tří PDX modelů došlo spolu s nárůstem objemu tumoru k významnému snížení celkové saturace tkáně kyslíkem (sO_2 Total; $p = 0,04134$) a mikrocévní oblasti (MVA; procento vaskularizace získané barevným dopplerovským zobrazováním). Průměrná hodnota sO_2 Vital byla u VFN-M1 a VFN-M2 podobná ($p = 0,80459$), na rozdíl od VFN-M5R1, kde byla výrazně vyšší. sO_2 Vital u malého tumoru VFN-M1 byla $37,9 \pm 2,2 \%$, u velkého tumoru pak $40,5 \pm 6,0 \%$ (Obrázek 8A). U malého tumoru VFN-M2 pak sO_2 Vital dosahovala hodnot $37,5 \pm 4,0 \%$ a u velkého $35,7 \pm 4,6 \%$ (Obrázek 8B). VFN-M5R1 měl sO_2 Vital vyšší, a to u malého tumoru $57,1 \pm 4,8 \%$ a u velkého $40,8 \pm 5,7 \%$ (Obrázek 8C). Buňky VFN-M5R1 se přihojily a dorostly velikosti tumoru cca 250 mm^3 signifikantně dříve (D+13) než VFN-M1 (D+21) a VFN-M2 (D+20).

Ve srovnání s VFN-M5R1 (Obrázek 9) byly nádory VFN-M1 i VFN-M2 výrazně méně okysličené a měly několik jasně rozeznatelných nekrotických oblastí již u malých nádorů (Obrázek 10). Vzhledem ke zvětšujícím se nekrotickým oblastem byly mezi malými a velkými nádory pozorovány rostoucí rozdíly mezi sO_2 Vital a sO_2 Total ve všech třech modelech (Tabulka 1).

Vaskularizace analyzovaných PDX nádorů je znázorněna jako 3D vizualizace na Obrázku 9. U VFN-M1 a VFN-M2 byl pozorován stálý pokles rozsahu vaskularizace u rostoucí velikosti tumoru (Obrázek 8; $P = 0,00329$). Naproti tomu vývoj vaskularizace u VFN-M5R1 byl složitější, s počátečním poklesem (ve stadiu středně velkých nádorů) následovaným terminálním zvýšením (ve stadiu velkých nádorů).

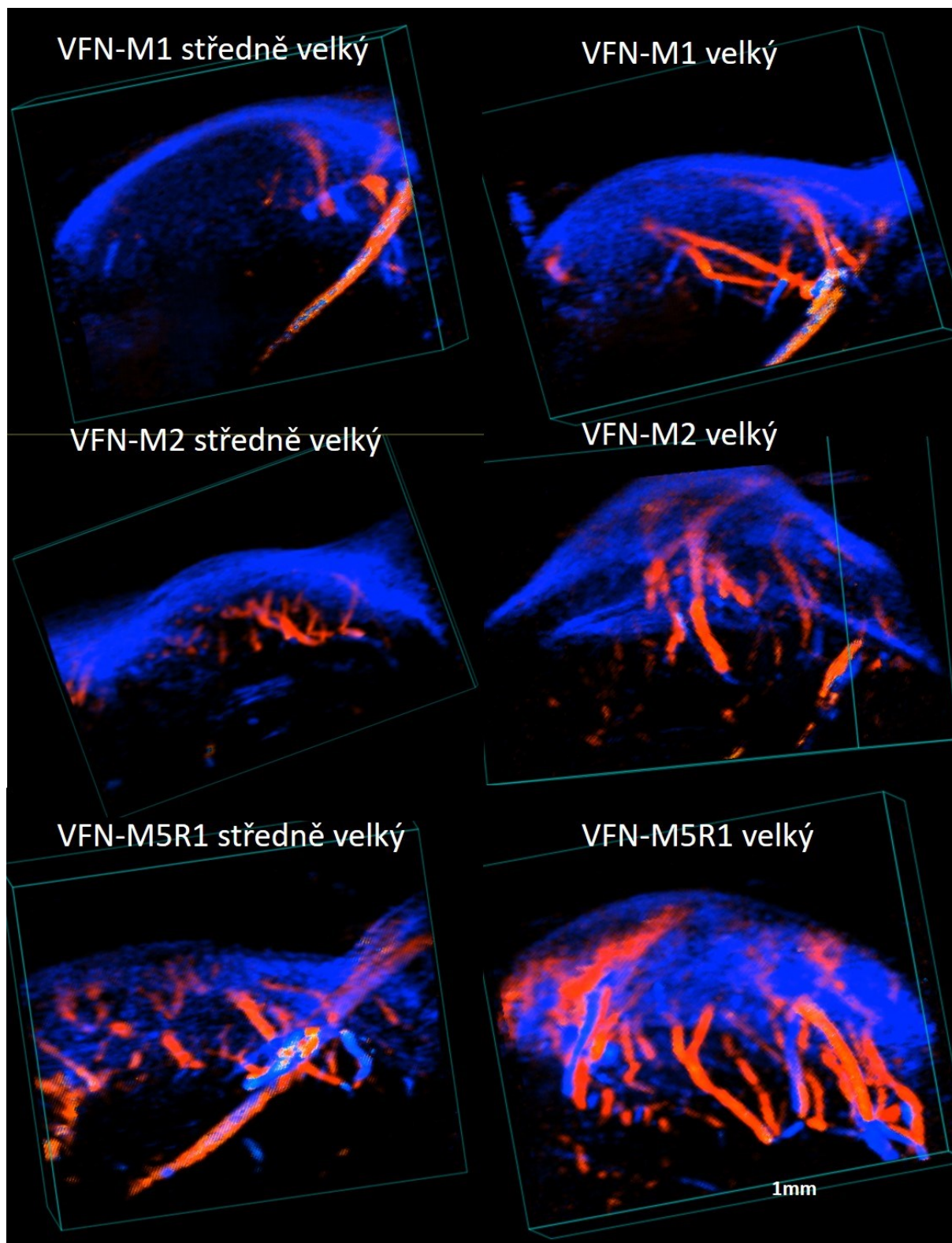


Obrázek 8. Grafická prezentace změn hypoxie, vaskularizace a objemu tumoru v čase u PDX modelů VFN-M1 (A), VFN-M2 (B) a VFN-M5R1 (C). Hypoxie tumoru byla stanovena jako saturace kyslíku sO₂ Vital (plné černé čtverce), celková oxygenace tumoru včetně nekrotických oblastí sO₂ Total (prázdné černé čtverce), a % mikrovaskulární oblasti tumoru získané barevným dopplerovským měřením (plné červené kroužky). Objemy tumorů byly získány ultrazvukovou volumetrickou analýzou (plné modré trojúhelníky) a růstové křivky tumorů byly počítány ze tří na sebe kolmých rozměrů změřených digitálním posuvným měřítkem (prázdné modré trojúhelníky). Saturace kyslíku sO₂ Vital, sO₂ Total a oblast mikrocév (procento vaskularizace) byly stanoveny pro celý objem tumoru.



Obrázek 9. Reprezentativní anatomické obrázky tumoru VFN-M5R1 získané nastavením režimu B a režimu OxyHemo.

Různá tkáňová struktura (světle versus tmavě šedé oblasti; A, C, E) jasně odpovídá fotoakustickým obrázkům (B, D, F) malých, středních a velkých tumorů; odpovídá krví dobře zásobené oblasti (jasnější pixely v režimu B a více okysličená místa ve fotoakustickém OxyHemo režimu zobrazené jako modré a červené pixely) a oblasti špatně zásobené (nekrotické) uvnitř tumoru. Z důvodu narůstajícího podílu nekrotické tkáně při růstu tumoru dochází ke zvyšování rozdílu mezi sO_2 Vital a sO_2 Total u středních ($50,1 \pm 7,9$ % a $21,7 \pm 1,0$ %) a velkých tumorů ($40,8 \pm 5,7$ a $16,7 \pm 2,0$ %).



Obrázek 10. 3D barevné dopplerovské zobrazení vaskularizace tumoru vizualizované v režimu vykreslování. Vizualizace vaskularizace středních (levý sloupec) a velkých (pravý sloupec) tumorů modelu VFN-M1 (nahore), VFN-M2 (uprostřed) a VFN-M5R1 (dole). Modré zbarvení reprezentuje tok krve od sondy a červené opačný tok krve, tj. k sondě.

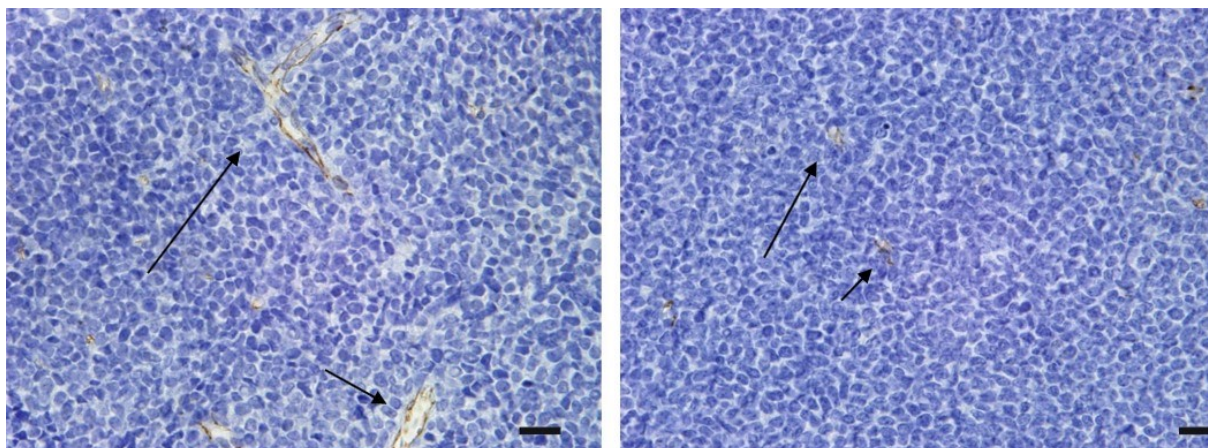
Tabulka 1. Průměrné hodnoty a standartní odchylky sO₂ Vital (%), sO₂ Total (%) and MVA (%) získané metodou UZ-PAI u modelů VFN-M1, VFN-M2 and VFN-M5R1 ve 3 časových bodech růstu tumorů. Spočítané hodnoty P: 0,80459 (sO₂ Vital); 0,04134 (sO₂ Total); 0,00329 (MVA)

PDX model	VFN-M1			VFN-M2			VFN-M5R1		
velikost tumoru	sO ₂ Vital (%)	sO ₂ Total (%)	MVA (%)	sO ₂ Vital (%)	sO ₂ Total (%)	MVA (%)	sO ₂ Vital (%)	sO ₂ Total (%)	MVA (%)
malý	37,9 ± 2,2	27,9 ± 6,2	18,4 ± 2,3	37,5 ± 4,0	30,9 ± 2,1	15,8 ± 1,0	57,1 ± 4,8	55,4 ± 4,2	16,5 ± 2,7
střední	39,8 ± 1,4	28,4 ± 3,6	13,1 ± 4,1	41,4 ± 2,3	19,9 ± 3,4	8,0 ± 1,0	51,4 ± 3,7	37,1 ± 0,7	11,2 ± 2,1
velký	40,5 ± 6,0	11,5 ± 2,3	2,8 ± 0,1	35,7 ± 4,6	13,2 ± 2,5	3,8 ± 0,8	40,8 ± 5,7	16,7 ± 2,0	10,3 ± 2,7

Porovnání vaskularizace mezi histologickými a ultrazvukovými nálezy

Pro srovnání dat získaných barevným dopplerovským ultrazvukovým zobrazením bylo provedeno paralelní hodnocení vaskularizace PDX tumorů pomocí imunohistochemie barvením CD31-pozitivních endoteliálních buněk.

Hodnoty kvantifikovaných CD31-pozitivních profilů mikrocév (tj. MVA) byly nižší u malých tumorů všech modelů, tj. VFN-M1, VFN-M2 a VFN-M5R1 ($6,8 \pm 0,2$ %, $8,0 \pm 0,7$ % a $6,9 \pm 0,5$ %), ve srovnání s daty získanými Dopplerem ($18,4 \pm 2,3$ %, $15,8 \pm 1,0$ % a $16,5 \pm 2,7$ %). Naproti tomu ve stádiu velkých tumorů byly MVA dle IHC významně vyšší než hodnoty měřené pomocí barevného Dopplera u VFN-M1 ($4,8 \pm 0,3$ % a $2,8 \pm 0,1$ %) a VFN-M2 ($8,6 \pm 0,6$ % a $3,8 \pm 0,8$ %) a srovnatelné u VFN-M5R1 ($10,7 \pm 0,8$ % a $10,3 \pm 2,7$ %). Profily průřezu oblasti mikrocév PDX modelu VFN-M1 jsou uvedeny na Obrázku 10. Výsledky IHC analýzy malých a velkých nádorů viz Tabulka 2.



Obrázek 11. Reprezentativní obrázek imunohistochemického zobrazení CD31 pozitivních cévních profilů v xenotransplantátu MCL modelu VFN-M1.

Na levém obrázku ukazují šípky na větší mikrocévy, vpravo pak na malé mikrocévy na různých řezech nádoru VFN-M1. Tyto příklady znázorňují nerovnoměrnost distribuce, tj. přítomnost oblastí bez malých (vlevo) nebo naopak větších (vpravo) mikrocév v tumoru. Heterogenita distribuce mikrovaskulárních hustot (MVD) a oblastí mikrocév (MVA) podtrhuje nezbytnost rozsáhlého histologického hodnocení vzorku. CD31 pozitivita je na snímcích zobrazena hnědým zbarvením. Měřítka označují 20 μm .

Tabulka 2. Imunohistochemická analýza vaskularity malých a velkých PDX tumorů zobrazením myši CD31 pozitivitu. Průměrné hodnoty a standardní odchylky byly počítány vždy z deseti vzorků.

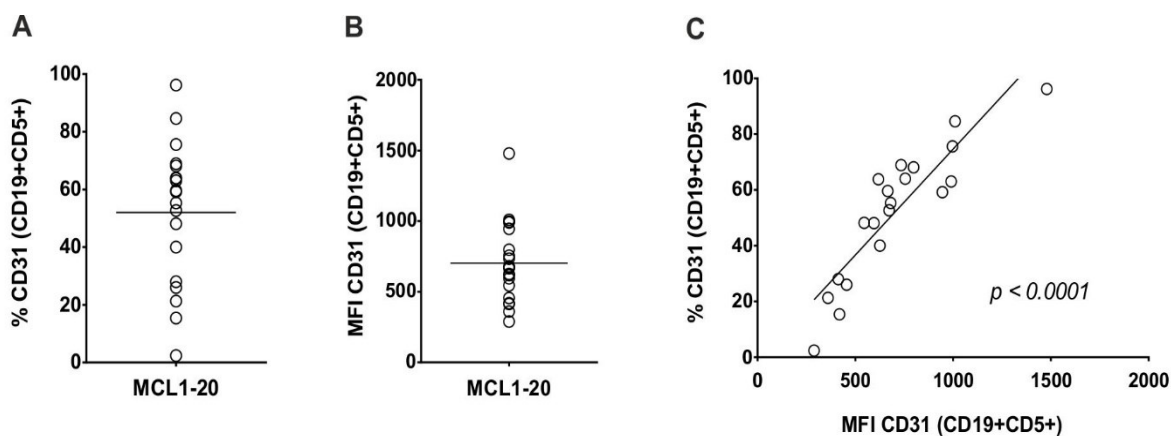
PDX model	Velikost tumoru	Hustota mikrocév (MVD) (cévní profily / mm^2)	Oblast mikrocév (MVA) (%)
VFN-M1	malý	$88 \pm 3,3$	$6,8 \pm 0,2$
VFN-M1	velký	$87 \pm 6,5$	$4,8 \pm 0,3$
VFN-M2	malý	$101,4 \pm 8,8$	$8,0 \pm 0,7$
VFN-M2	velký	$98,1 \pm 3,6$	$8,6 \pm 0,6$
VFN-M5R1	malý	$66,3 \pm 3,6$	$6,9 \pm 0,5$
VFN-M5R1	velký	$110,2 \pm 7,7$	$10,7 \pm 0,8$

Porovnání MVD a MVA mezi malými a velkými tumory v jednotlivých PDX modelech MCL

Podle histologie neexistovaly žádné významné rozdíly v MVD ani v MVA mezi malými a velkými tumory PDX modelů VFN-M1 a VFN-M2. Naproti tomu rozdíly mezi MVD a MVA byly pozorovány mezi malými a velkými nádory VFN-M5R1.

Expresa CD31 na povrchu CD19+CD5+ MCL buněk

Provedli jsme analýzu exprese CD31 na povrchu primárních CD19+CD5+ MCL buněk získaných z kostní dřeně (KD) pacientů s novou diagnózou MCL. Charakteristiky pacientů jsou popsány v Tabulce 3. Expresa CD31 na povrchu CD19+CD5+ MCL buněk byla detekovatelná u všech patientských vzorků kostní dřeně, nicméně procento positivity CD31 stejně jako MFI bylo vysoce variabilní. Procento CD31+ buněk (z CD19+CD5+ populace) se pohybovalo od 2,4 % do 96,2 % (medián 57,25 %) a CD31 MFI od 289 do 1497 (medián MFI byl 669,5; Obrázek 12A, B). Procento CD31+ buněk korelovalo s CD31 MFI ($r = 0,8959$, $p < 0,0001$; Obrázek 12C). Mezi expresí CD31 a mezinárodním prognostickým indexem pro MCL (MIPI, Tabulka 3) nebyla nalezena žádná signifikantní korelace. U 12 z 20 pacientů jsme detekovali expresi CD31 na povrchu CD19+CD5+ MCL buněk též v periferní krvi. Procento CD31 positivity i MFI v periferní krvi a v kostní dřeni byly srovnatelné.



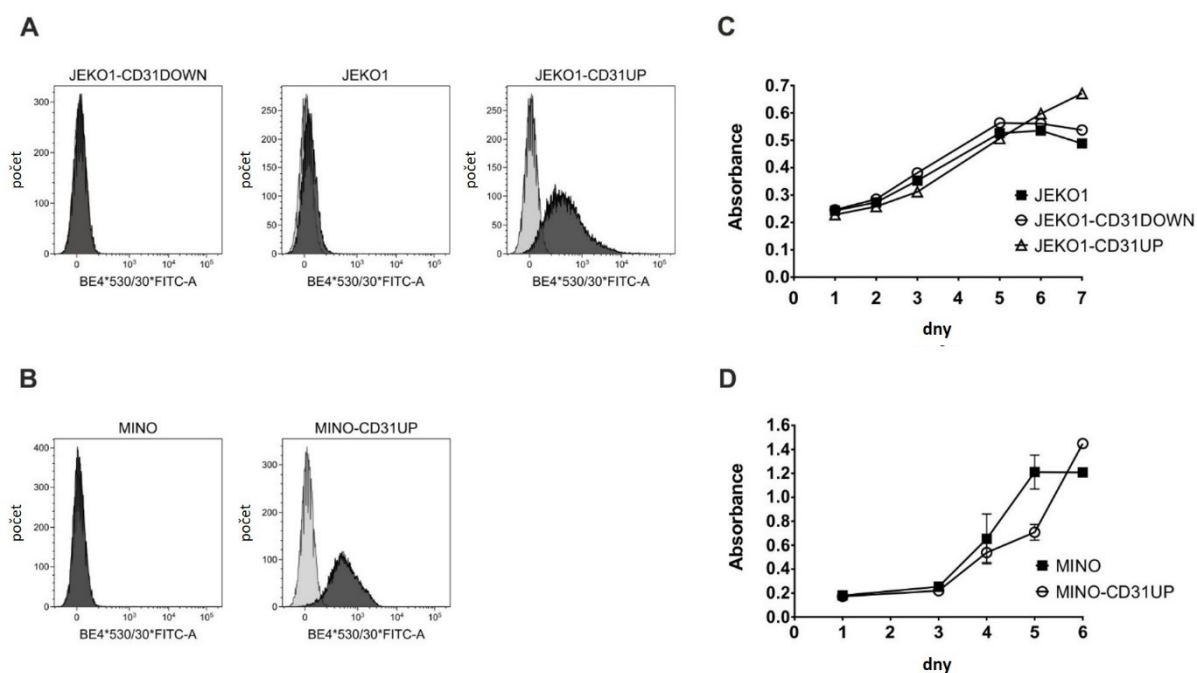
Obrázek 12. Expresa CD31 na povrchu CD19+CD5+ lymfocytů v KD získané od pacientů s novou diagnózou MCL; **(A)** % CD31+CD19+CD5+ buněk, medián % = 57,25; **(B)** MFI CD31+CD19+CD5+ buněk, medián MFI = 669,5; **(C)** MFI korelovalo s procentem pozitivních buněk ($r = 0,8959$, $p < 0,0001$)

Tabulka 3 Základní charakteristiky pacientů (ID = identifikace vzorku, Leu = počet leukocytů v periferní krvi, KD = infiltrace kostní dřeně, MIPI = Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index, % CD31 = procento CD31+CD19+CD5+ buněk z CD19+CD5+ populace, MFI CD31 = MFI CD31+CD19+CD5+ buněk, ND = nebylo určeno). Infiltrace KD a leukemizace byly zjišťovány pomocí FCM.

ID	Leu (10 ³ /μl)	Leukemizace (%)	KD (%)	Stádium (Ann Arbor)	MIPI	% CD31 v KD	MFI CD31 v KD	lokalizace E/E, pokud bylo
MCL1	6,35	3,3	5,0	4	5,4	2,4	289	
MCL2	5,79	5,6	22,0	4	5,71	55,3	681	
MCL3	5,77	4,0	5,0	4	5,93	48,2	545	střevo
MCL4	4,84	16,0	3,7	4	5,72	52,7	673	
MCL5	10,43	8,0	1,0	4	5,61	84,6	1010	střevo
MCL6	12,8	28,0	5,0	4	6,5	68,1	798	
MCL7	34,23	78,0	55,0	4	6,82	48,1	595	
MCL8	8,88	0,0	4,4	4	5,72	40,0	626	
MCL9	17,5	ND	63,0	4	6,5	63,8	618	
MCL10	4,33	9,0	19,0	4	6,57	63,0	990	hrtan
MCL11	5,31	11,0	12,0	4	5,52	59,2	945	žaludek
MCL12	8,3	50,0	50,0	4	6,24	28,0	413	
MCL13	4,5	9,0	8,0	4	6,12	96,2	1479	střevo, děloha, ovarium
MCL14	5,72	2,4	1,6	4	5,86	64,0	755	střevo
MCL15	21,66	ND	38,4	4	6,2	15,4	419	
MCL16	7,92	8,3	16,0	4	5,68	26,0	456	
MCL17	11,27	3,6	5,5	4	6,17	68,9	734	fluidothorax, játra, likvor
MCL18	6,41	1,7	3,0	4	6,2	75,6	997	střevo
MCL19	8,25	6,3	15,9	4	5,52	59,6	666	
MCL20	24,52	69,0	82,0	4	6,79	21,3	360	fluidothorax

Vytvoření klonů s manipulovanou expresí CD31

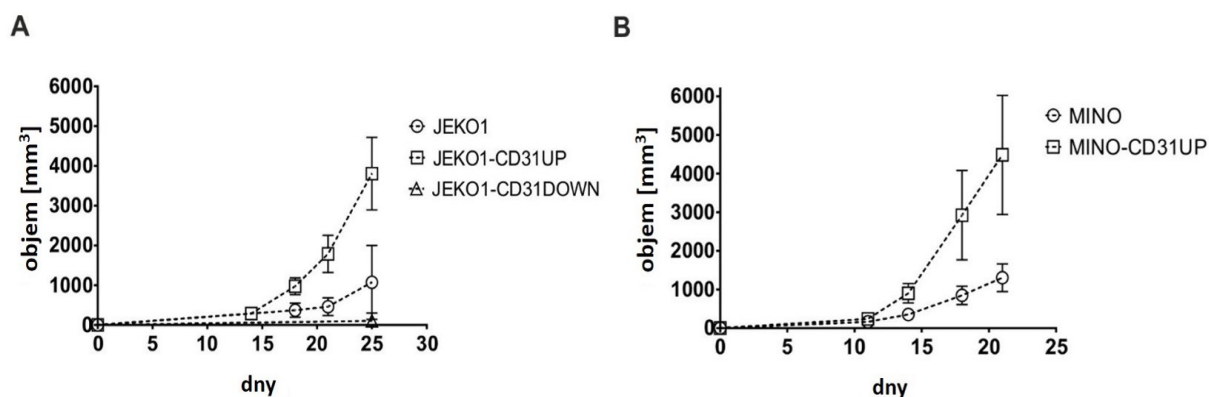
Nedávno jsme ukázali, že CD31 je upregulována *in vivo* při přihojování většiny testovaných MCL linií v imunodeficientních myších (Molinsky et al., 2013). K dalšímu zkoumání vlivu CD31 na přihojení, růst a šíření MCL *in vivo* jsme použili dvě buněčné linie (JEKO1 a MINO) s přirozeně nízkou expresí CD31 (FCM) a odvodili jsme jejich příslušné klony s transgenní overexpresí CD31 (JEKO1-CD31UP, MINO-CD31UP) (Obrázek 13A, B). Protože u JEKO1 dochází *in vivo* (po přihojení v imunodeficientních myších) přirozeně ke zvýšení exprese CD31, odvodili jsme klon se stabilní downregulací CD31 (JEKO1-CD31DOWN), abychom zjistili, jaký vliv bude mít jeho vypnutí na biologické chování JEKO1 linie (Obrázek 13A). *In vitro* overexprese ani downregulace CD31 neovlivňuje proliferaci buněk (Obrázek 13C, D).



Obrázek 13. Buněčné linie JEKO1 a MINO a jejich příslušné klony s transgenní expresí CD31: (A, B) povrchová exprese CD31 (FCM) reprezentována tmavě šedými histogramy, světle šedé histogramy zobrazují histogramy izotypových kontrol; (C, D) srovnání *in vitro* proliferací

CD31 ovlivňuje přihojení a růst MCL linií *in vivo*

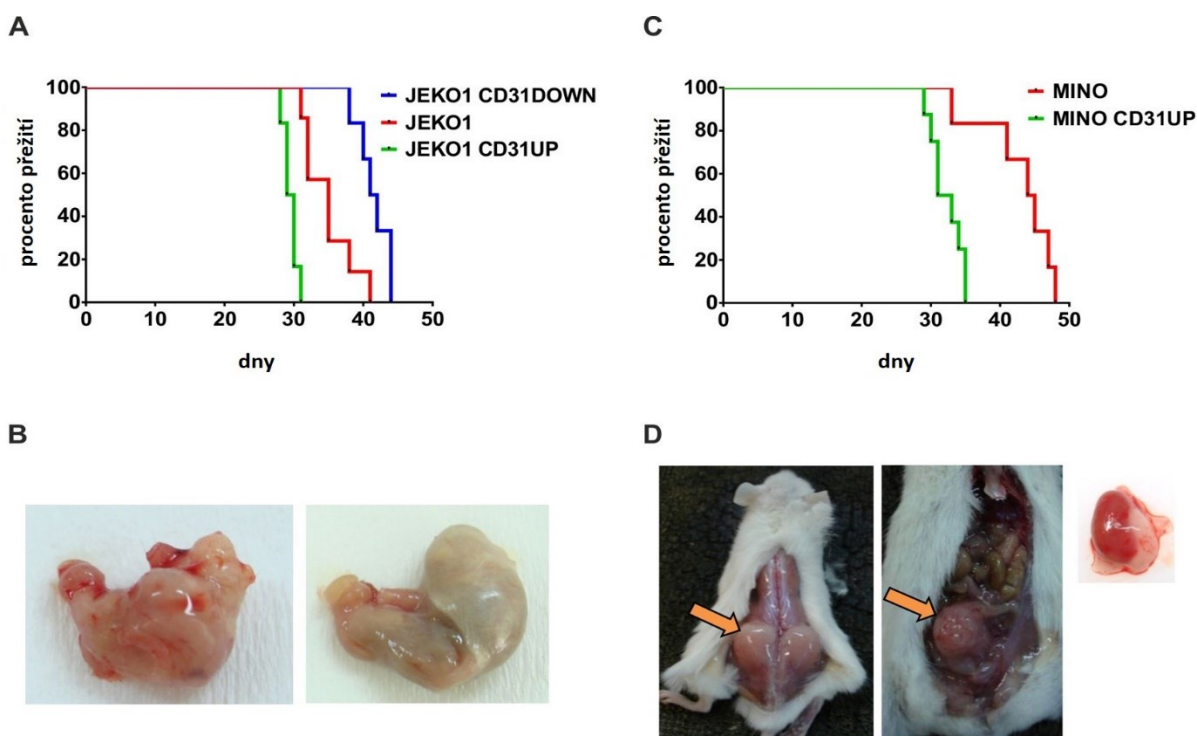
Zatímco *in vitro* nebyla rychlost proliferace významně odlišná mezi CD31 manipulovanými buněčnými liniemi ve srovnání s původními (Obrázek 13C, D), *in vivo* jsme pozorovali výrazné změny rychlosti přihojení a růstu SC tumorů. Xenotransplantace klonálních buněk JEKO1-CD31UP a MINO-CD31UP vedla k signifikantně zrychlenému růstu nádoru ve srovnání s kontrolami (Obrázek 14). Trvalé zachování overexprese CD31 na přihojených MCL buňkách byla potvrzena *ex vivo* průtokovou cytometrií (Doplňkový obrázek S3). Naopak narušení upregulace CD31 při přihojení trvalou CD31-downregulací v klonálních buňkách JEKO1-CD31DOWN bylo spojeno se zhoršeným přihojením a zpomaleným růstem odpovídajících xenotransplantátů MCL (Obrázek 14A). Přihojení štěpu bylo detekováno pouze u 2 z 8 myší injikovaných JEKO1-CD31DOWN, přičemž i tyto dva tumory rostly pomaleji ve srovnání s kontrolami.



Obrázek 14. Růstové křivky zobrazují akceleraci růstu SC tumorů CD31-upregulovaných klonů ve srovnání s původními liniemi, popř. s CD31DOWN v případě JEKO1. (A) JEKO1, (B) MINO

Expresa CD31 koreluje s přežitím systémově (IV) xenotransplantovaných myší

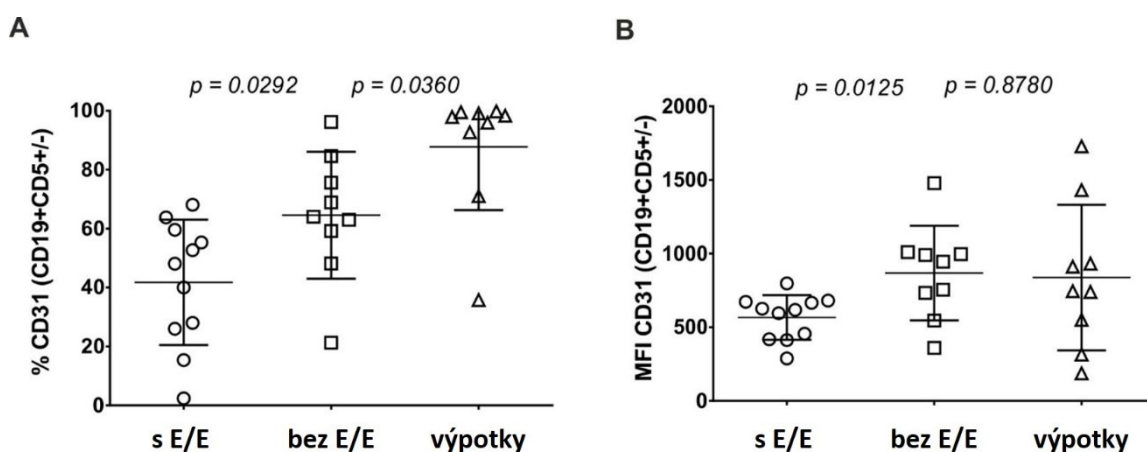
Přežití myší xenotransplantovaných MCL buňkami s transgenní overexpresí CD31 bylo významně kratší ve srovnání s myšmi injikovanými buňkami příslušných parentálních buněčných linií. Medián přežití myší JEKO1-CD31UP dosáhl 29,5 dne ve srovnání se 41,5 dny JEKO1-CD31DOWN ($p = 0,0006$, Obrázek 15A). Medián přežití MINO-CD31UP byl 32 dnů, u MINO WT dosáhl 44,5 dnů ($p = 0,003$, Obrázek 15C). Navíc u myší xenotransplantovaných transgenními buňkami došlo k signifikantnímu nárůstu frekvence výskytu E/E šíření (např. svalů, ledvin, žaludku, dělohy a měkkých tkání) ve srovnání s původními liniemi. Pět ze šesti myší (tj. 83,3 %) s IV JEKO1-CD31UP klonem vyvinuly E/E postižení, což se nestalo u žádné z šesti myší IV injikovaných JEKO1-CD31DOWN. Analogicky jsme pozorovali u pěti z osmi (tj. 62,5 %) myší s MINO-CD31UP IV rozvoj E/E postižení ve srovnání se dvěma z osmi (tj. 12,5 %) myší IV injikovaných MINO (Obrázek 15B, D). Infiltraci tkání potvrdila IHC analýza.



Obrázek 15. Křivky přežití myší po IV xenotransplantaci různých klonů s manipulovanou expresí (A, C) a příklady E/E postižení: (B) vlevo infiltrovaný žaludek JEKO1-CD31UP IV (vpravo pro srovnání normální žaludek JEKO1 IV), (D) MINO-CD31UP IV zleva doprava: měkké tkáně, vaječník, ledvina.

Expres CD31 je asociována s E/E postižením u pacientů s MCL

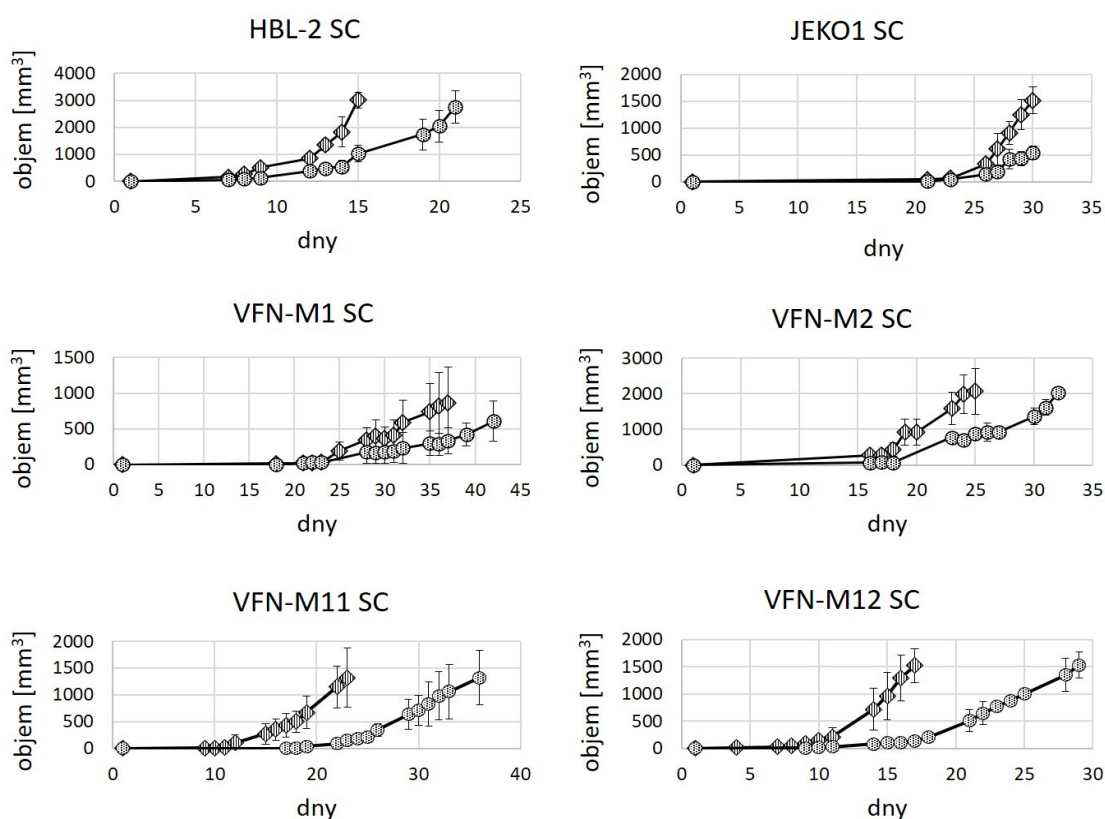
Na základě výsledků myších experimentů jsme analyzovali potenciální korelaci exprese antigenu CD31 na MCL buňkách získaných z kostní dřeně pacientů s novou diagnózou MCL, kteří vykazovali E/E postižení. Intenzita exprese i procento pozitivita CD31 na povrchu CD19+CD5+ MCL buněk byly signifikantně vyšší u pacientů s E/E postižením ve srovnání s pacienty bez E/E šíření detekovaným dle CT nebo PET-CT (průměrná MFI $868,3 \pm 107,0$ u E/E a $566,7 \pm 151,5$ bez E/E, ($p = 0,0125$), procento pozitivita 64,0 % při E/E versus 48,1 % bez E/E šíření ($p = 0,0292$)) (Tabulka 3, Obrázek 16). Mimo to jsme analyzovali expresi CD31 na buňkách MCL získaných od pacientů s maligními výpotky (tj. přímo na buňkách MCL z E/E kompartmentu) a potvrdili jsme, že procento a úroveň exprese CD31 jsou srovnatelné s buňkami získanými z kostní dřeně pacientů s detekovatelným E/E postižením (v pořadí: MFI $837,7 \pm 164,8$ versus $868,3 \pm 107,0$ s $p = 0,88$; procento 97,9 % versus 64,0 %, $p = 0,036$) (Obrázek 16).



Obrázek 16. Srovnání % CD31 pozitivita (A) a CD31 MFI (B) MCL buněk získaných z kostní dřeně pacientů bez E/E a s E/E postižením a MCL získaných z patientských pleurálních výpotků.

Nejvýraznější inhibice růstu xenotransplantátů MCL bevacizumabem byla pozorována u PDX modelů odvozených od pacientů s ibrutinib-refrakterním MCL

Dvě buněčné linie MCL (JEKO1 a HBL-2) a čtyři PDX modely odvozené od chemorefrakterních MCL pacientů (ibrutinib-naivní VFN-M1 a VFN-M2, ibrutinib-refrakterní VFN-M11 a VFN-M12) byly injikovány podkožně do imunodeficientních NSG myši a léčeny bevacizumabem. U všech šesti modelů došlo k signifikantnímu potlačení růstu SC štěpu bevacizumabem ve srovnání s neléčenými kontrolními skupinami. Nejvýznamnější antilymfomový efekt byl pozorován u PDX modelů odvozených od pacientů po selhání ibrutinibu (Obrázek 17).



	JEKO1	HBL-2	VFN-M1	VFN-M2	VFN-M11	VFN-M12
P-hodnota CTRL vs. Bevacizumab	0,0833	0,0121**	0,001***	0,0239	0,0002***	0,0005***

Obrázek 17. Růstové křivky porovnávají vývoj bevacizumabem léčených (kroužky) a neléčených (kosočtverce) tumorů. Nejlepšího efektu bylo dosaženo u modelů VFN-M11 a VFN-M12. P-hodnoty parciálních t-testů (statistická významnost: ** 5% a *** 1% simultánní úroveň významnosti). Všechny křivky (pro všechny denní skupiny rozdílů tumorů) lineární závislosti byly pozitivní, což ukazuje, že terapie bevacizumabem účinně potlačovala růst tumorů.

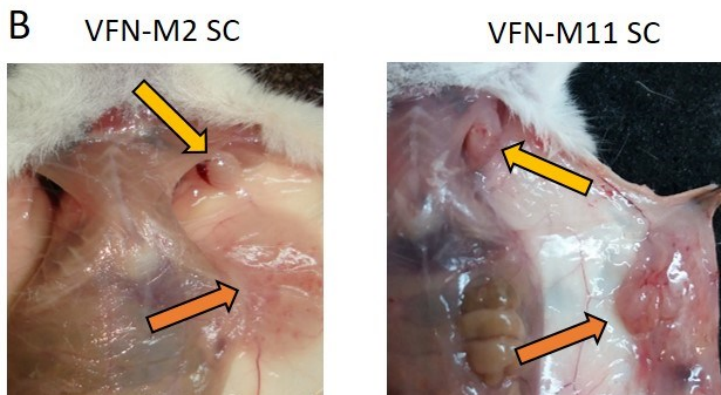
Bevacizumab nezabraňuje systémovému šíření podkožních MCL tumorů

Obecně se uznává, že angiogeneze podporuje šíření tumoru a metastazování (Cigrovski Berkovic et al., 2016; Ishigami et al., 1998; Khademi et al., 2014; Li et al., 2004). Navzdory pozorované inhibici VEGFA-závislého lokálního růstu podkožních MCL nádorů bylo u obou skupin (neléčených i bevacizumabem léčených) myší pozorováno šíření lymfomu formou vzdálených metastáz s tvorbou tumorů imitujících lymfatické uzliny nebo makroskopicky patrná infiltrace myších orgánů (především jater a sleziny) (Obrázek 18).

A

	neléčené	bevacizumab
VFN-M2	6 (66,67%)	8 (72%)
VFN-M11	1 (16,67%)	6 (100%)

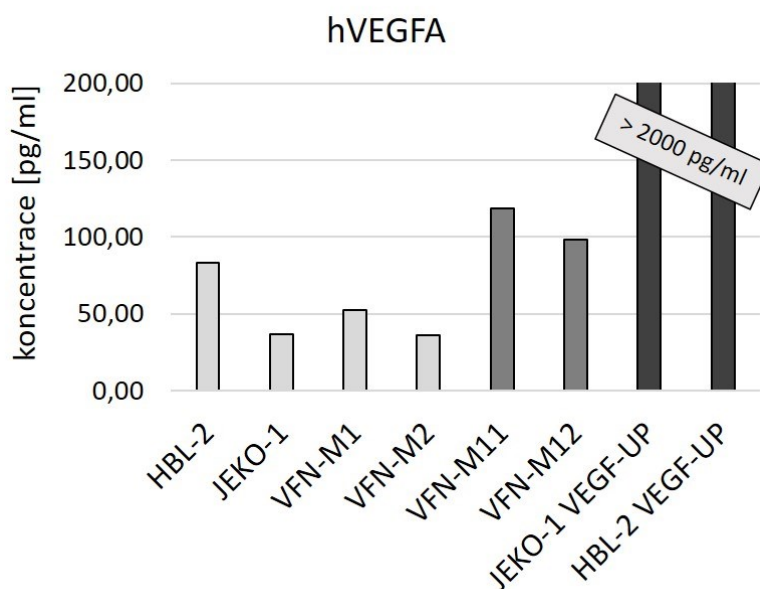
B



Obrázek 18. Systémové šíření MCL buněk u PDX modelu VFN-M2 a VFN-M11. A – Srovnání počtu sekundárních nádorových formací po SC xenotransplanataci VFN-M2 a VFN-M11; B – Fotografie sekundárního šíření (žluté šipky ukazují axilární tumory imitující lymfatické uzliny; oranžové šipky ukazují na primární podkožní tumor u myší VFN-M2 a VFN-M11 léčených bevacizumabem.

Hladiny lidského VEGFA detekované v lyzátech MCL tumorů pozitivně korelují s antilymfomovým účinkem bevacizumabu

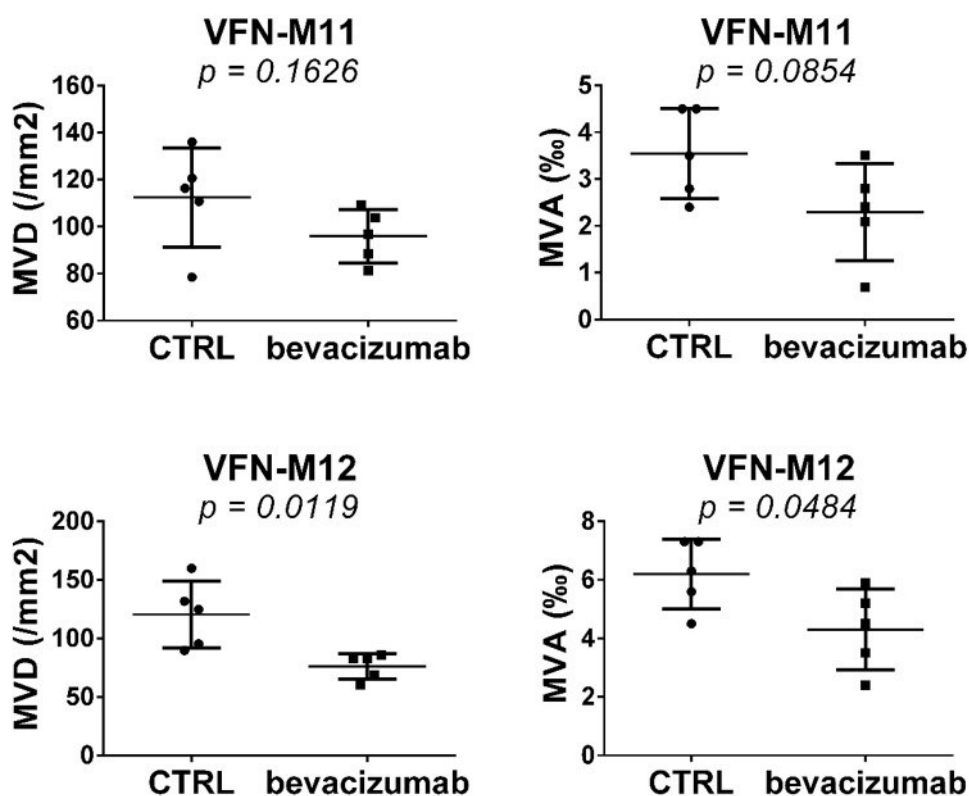
Předpokládali jsme, že rozdíly v antilymfomovém účinku bevacizumabu pozorované *in vivo* na myších modelech mohou korelovat s hladinou lidského VEGFA (hVEGFA) secernovaného v tumoru MCL buňkami. Hladiny hVEGFA byly zjišťovány metodou ELISA v lyzátech podkožních tumorů získaných od neléčených myší (50 milionů buněk / vzorek). Hladiny hVEGFA u JEKO1 VEGF-UP a HBL-2 VEGF-UP byly vyšší než 2000 pg/ml a sloužily jako pozitivní kontrola (a zároveň kontrola úspěšné transfekce). Z ostatních vzorků bylo nejvyšších hladin hVEGFA dosaženo u VFN-M11 a VFN-M12, tj. u dvou modelů odvozených od pacientů po selhání ibrutinibu (průměrná koncentrace: 108,23 ± 14,35 pg/ml), na rozdíl od ibrutinib-naivních tumorů, kde byly hladiny hVEGFA signifikantně nižší (52,01 ± 21,99 pg/ml; $p = 0,03$) (Obrázek 19). K vyloučení falešné positivity myšího VEGFA (mVEGFA) jsme ověřili absorpční křivkou mVEGFA na kitu pro měření hVEGFA. Zjistili jsme, že koncentrace 10 000 pg/ml mVEGFA je ekvivalentní 176 pg/ml hVEGFA, vzhledem k předpokládaným hladinám mVEGF je tedy případná chyba minimální.



Obrázek 19. Graf porovnávající hladiny hVEGFA v SC tumorech různých typů PDX modelů. Nejvyšší hladiny byly naměřeny u klonů s geneticky manipulovanou expresí hVEGFA (tj. JEKO1 VEGF-UP a HBL-2 VEGF-UP). Hladiny hVEGFA v tumorech VFN-M11 a VFN-M12 byly signifikantně vyšší než u ostatních měřených tumorů (JEKO1, HBL-2, VFN-M1 a VFN-M2).

Získaná rezistence na bevacizumab je asociována se sníženou MVD/MVA

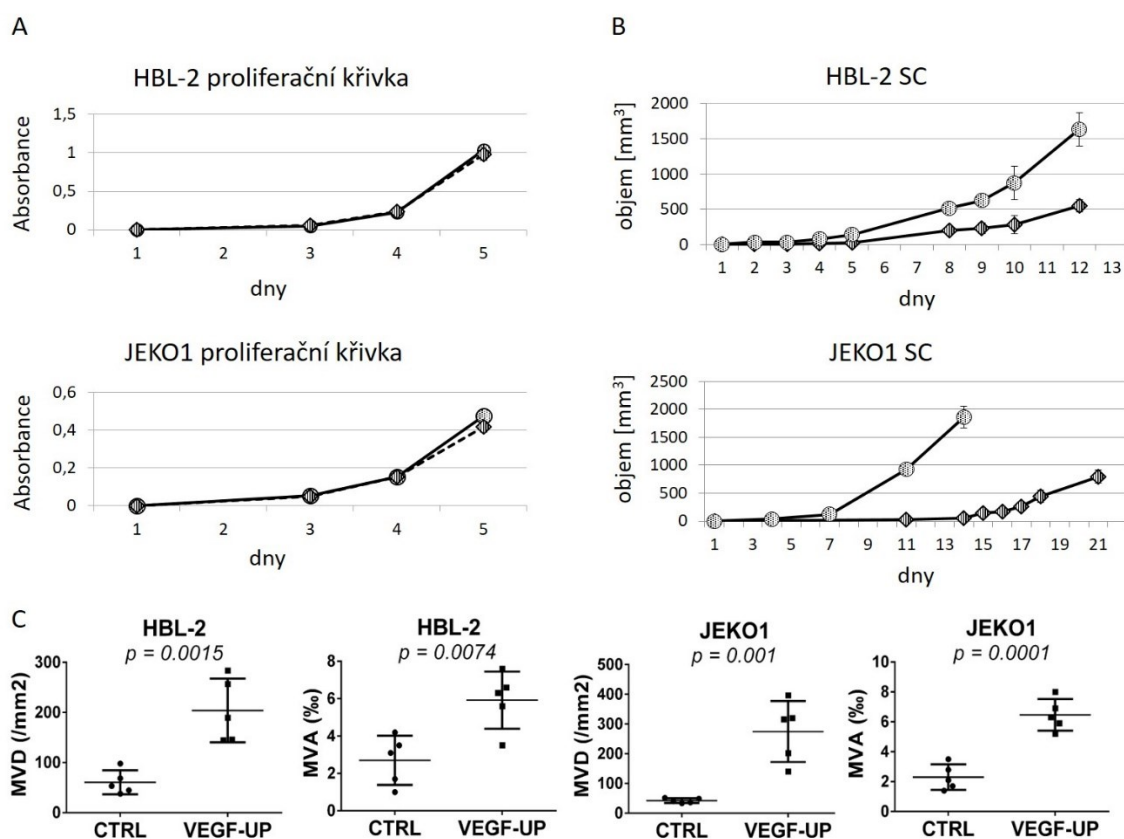
Imunohistochemická analýza tumorů získaných z myší léčených bevacizumabem a z neléčených myší odhalila významně nižší MVD a MVA v bevacizumab-rezistentních tumorech ve srovnání s kontrolními tumory (Obrázek 20). Průměrná MVD VFN-M11 byla $112,5 \pm 9,5$ /mm² u CTRL versus $95,9 \pm 5,1$ /mm² u tumorů léčených bevacizumabem ($p = 0,1626$), MVA byla u CTRL skupiny $3,5 \pm 0,4$ % versus $2,3 \pm 0,4$ % u léčené skupiny ($p = 0,0854$). V případě VFN-M12 byla hodnota MVD u CTRL $120,3 \pm 12,8$ /mm², u léčené kohorty pak $76,0 \pm 4,9$ /mm² ($p = 0,0119$); hodnoty MVA byly u CTRL skupiny $6,2 \pm 0,5$ %, versus $4,3 \pm 0,6$ % u skupiny tumorů bevacizumabem léčených ($p = 0,0484$).



Obrázek 20. Grafy zobrazující rozdíly v hustotě mikrocév (MVD) a oblasti mikrocév (MVA) u VFN-M11 a VFN-M12. Bevacizumab statisticky signifikantně snižuje MVD a MVA u modelu VFN-M12 ve srovnání s kontrolními tumory, u modelu VFN-M11 vykazují trend.

Upregulace VEGFA je spojena s výrazně zvýšenou biologickou agresivitou MCL *in vivo*

Abychom mohli blíže prozkoumat vliv VEGFA na přihojení, růst a šíření MCL buněk *in vivo*, odvodili jsme klony JEKO1 a HBL-2 se stabilní upregulací VEGFA. Zatímco jsme *in vitro* nepozorovali žádný vliv na proliferaci buněk, *in vivo* jsme zaznamenali výraznou akcentaci agresivních biologických projevů VEGFA-upregulovaných klonů ve srovnání s původními liniemi. Podkožně xenotransplantované klony se projevovaly promptním přihojením a rychlým invazivním růstem (Obrázek 21A, B). IHC analýza potvrdila vysokou MDV a MVA tumorů se stabilní upregulací VEGFA ve srovnání s příslušnými kontrolními tumory (Obrázek 21C). Naše data tedy ukazují na jasnou korelaci mezi hladinou VEGFA a rozsahem neovaskularizace u MCL.

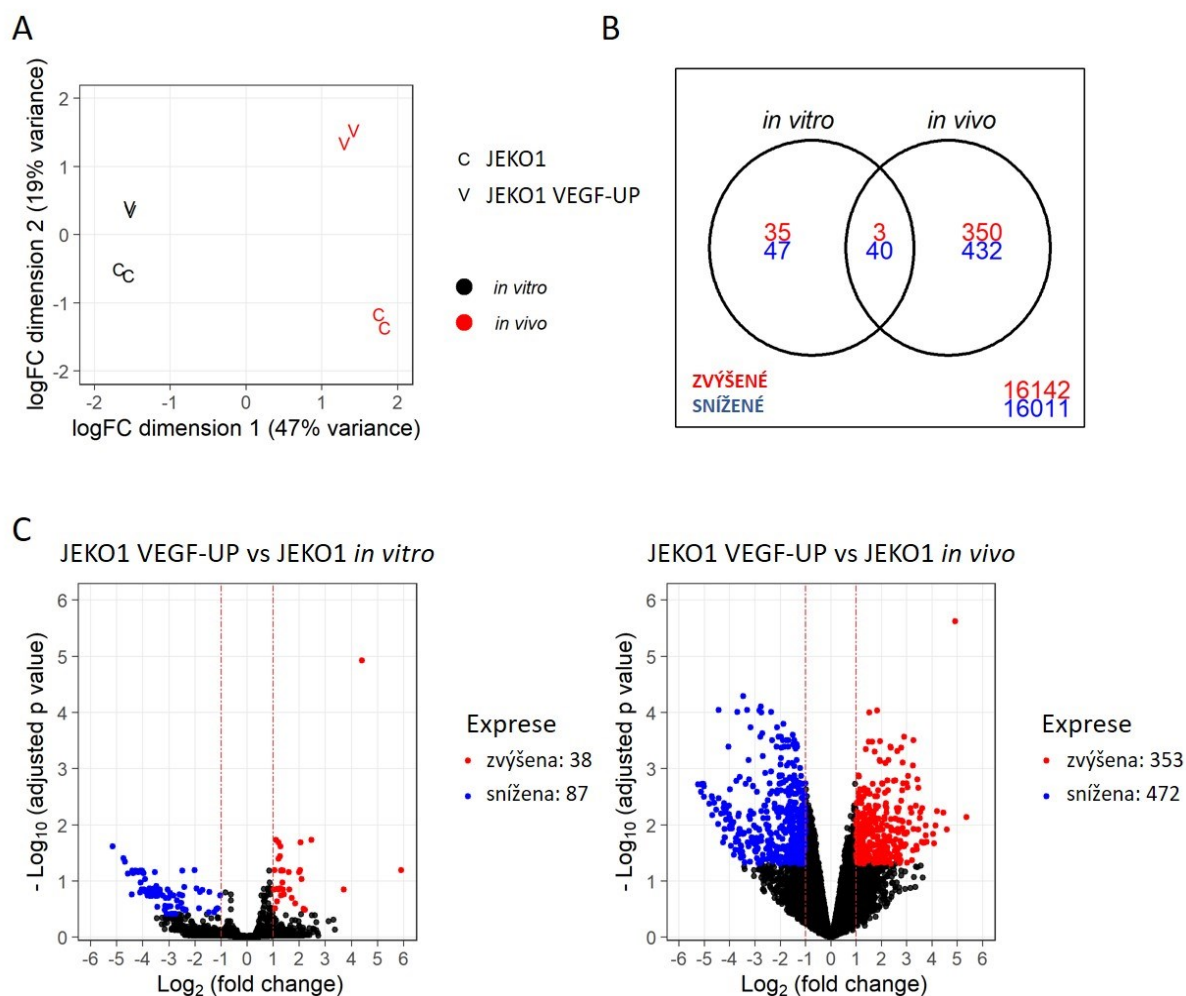


Obrázek 21. Proliferační křivky JEKO1 a HBL-2 (A): Zvýšení exprese VEGFA nemá prakticky žádný efekt na proliferaci MCL buněk *in vitro* (kontrolní buňky = kosočtverce, klony VEGF-UP = kroužky). **Růstové křivky tumorů JEKO1 a HBL-2 (B):** Významný efekt upregulace VEGFA se projeví *in vivo* urychlením přihojení a růstu tumorů SC injikovaných myši (VEGF-UP = kolečka, kontrolní tumory = kosočtverce). **Grafy porovnávající MVD a MVA (C):** Oba parametry jsou statisticky signifikantně vyšší u VEGF-upregulovaných klonů.

Změny transkriptomu MCL buněk vyvolané transgenní overexpresí VEGFA a prostředím (srovnání *in vitro* versus *in vivo*)

Na základě výrazných fenotypových změn spojených s nadměrnou expresí VEGFA *in vivo* a faktické absence změn fenotypu spojených s nadměrnou expresí VEGFA *in vitro* jsme provedli analýzu změn genové exprese u linie JEKO1 a od ní odvozeného klonu JEKO1 VEGF-UP (JEKO1 *in vitro*, JEKO1 VEGF-UP *in vitro*, JEKO1 *in vivo*, JEKO1 VEGF-UP *in vivo*). Zjistili jsme, že zvýšením exprese VEGFA dochází ke změnám transkripce již *in vitro*, nicméně po vystavení MCL buněk s upregulací VEGFA vlivu mikroprostředí (tj. v podmínkách *in vivo*) dochází k masivnímu nárůstu změn transkripce, a to cca 10x (Obrázek 22). Přesto bylo indentifikováno 43 genů, u nichž dochází ke stejné změně transkripce jak *in vivo*, tak *in vitro*, a lze tedy předpokládat, že tyto změny jsou vyvolány upregulací VEGFA bez ohledu na vliv prostředí (Tabulka 4). Mezi zachycenými zvýšeně exprimovanými geny jsou kromě VEGFA (pozitivní kontrola) například tumor-supresorový gen TENT5C/FAM46C a SLC2A3/GLUT3 (glukózový transportér 3). Naopak můžeme pozorovat sníženou transkripci řady genů včetně tumor-supresorových genů CTNNA2, CTNNA3, CSMD3, UNC13C, anebo genů, jejichž snížená exprese bývá asociována se zvýšenou agresivitou nádorových buněk (ARHGAP36, A2M) apod.

In vitro dochází ke zvýšení exprese genových setů podílejících se na regulaci hypoxie, glykolýzy, TNF α signalizace cestou NF- κ B, mTORC1 signalizace, angiogeneze, androgenní odpovědi a řady dalších. *In vitro* bylo též pozorováno snížení transkripce řady genových setů, např. metabolismu xenobiotik, INF- α a INF- γ odpovědi. *In vivo* dochází vlivem zvýšené exprese VEGFA mimo jiné též ke zvýšení exprese TNF α signalizace cestou NF- κ B a hypoxie, ale také metabolismu xenobiotik, jehož transkripce je *in vitro* snížena. *In vivo* naopak dochází ke snížení transkripce mTORC1 signalizace a odpovědi na androgeny, které jsou *in vitro* zvýšeny (Tabulka 5). Seznam všech transkripčních změn *in vitro* a *in vivo* jsou ukázány v Doplňkové tabulce S1 a S2.



Obrázek 22. Transkriptomová analýza MCL buněk JEKO1 se zvýšenou expresí VEGFA ve srovnání s JEKO1 buňkami bez upregulace VEGFA. A – Grafické vyjádření změn genové exprese JEKO1 a JEKO1 VEGF-UP *in vivo* versus *in vitro*. B – Znázornění počtu genů, jejichž exprese je změněna v závislosti na prostředí (*in vitro*, *in vivo*) a genů změněných nezávisle na prostředí (tj. změněné čistě upregulace VEGFA). Zvýšení transkripce je znázorněno červeně, snížení modře. C – Rozdílná exprese genů JEKO1 VEGF-UP v porovnání s JEKO1 separátně *in vitro* a *in vivo*. Geny zvýšeně exprimované jsou znázorněny červeně, sníženě exprimované pak modře.

Tabulka 4. Seznam transkriptů rozdílně exprimovaných jak v *in vitro*, tak v *in vivo* vzorcích s upregulací VEGFA ve srovnání se vzorky bez upregulace, kde $p < 0,05$ a alespoň dvojnásobná změna byly považovány za signifikantní.

ID	Označení genu	F-statistika	p (přízůsobeno)	Násobek změny	
				<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
ENSG00000112715	VEGFA	272,44	0,0000004	21,25	30,15
ENSG00000137959	IFI44L	251,82	0,0000005	0,25	0,36
ENSG00000137965	IFI44	120,68	0,0000036	0,19	0,48
ENSG00000134326	CMPK2	89,18	0,0000097	0,15	0,40
ENSG00000166349	RAG1	79,66	0,0000134	0,29	0,05
ENSG00000154975	CA10	37,28	0,0001745	0,03	0,03
ENSG00000140945	CDH13	34,02	0,0002366	0,04	0,03
ENSG00000105784	RUNDC3B	32,05	0,0002938	0,04	0,03
ENSG00000168542	COL3A1	29,57	0,0003921	0,05	0,03
ENSG00000138119	MYOF	29,04	0,0004175	0,12	0,18
ENSG00000183508	TENT5C	27,86	0,0004771	2,54	2,30
ENSG00000132122	SPATA6	26,37	0,0005841	0,08	0,03
ENSG00000183230	CTNNA3	25,36	0,0006841	0,18	0,21
ENSG00000147256	ARHGAP36	24,93	0,0007225	0,06	0,03
ENSG00000170044	ZPLD1	22,68	0,0009929	0,09	0,05
ENSG00000000005	TNMD	22,63	0,0010019	0,06	0,06
ENSG00000162598	C1orf87	22,58	0,0010100	0,07	0,03
ENSG00000149972	CNTN5	22,38	0,0010373	0,06	0,08
ENSG00000175899	A2M	22,06	0,0010867	0,06	0,06
ENSG00000059804	SLC2A3	21,67	0,0011522	2,45	2,05
ENSG00000065618	COL17A1	21,27	0,0012273	0,10	0,05
ENSG00000104327	CALB1	20,74	0,0013347	0,14	0,06
ENSG00000172380	GNG12	20,15	0,0014567	0,06	0,12
ENSG00000126856	PRDM7	18,69	0,0018479	0,10	0,08
ENSG00000089169	RPH3A	18,55	0,0018975	0,07	0,06
ENSG00000127324	TSPAN8	18,39	0,0019488	0,08	0,06
ENSG00000115593	SMYD1	18,34	0,0019637	0,09	0,04
ENSG00000125414	MYH2	16,87	0,0025854	0,06	0,05
ENSG00000066032	CTNNA2	16,87	0,0025854	0,13	0,05
ENSG00000185532	PRKG1	16,84	0,0026017	0,08	0,08
ENSG00000164796	CSMD3	16,58	0,0027370	0,04	0,09
ENSG00000183098	GPC6	16,58	0,0027370	0,08	0,07
ENSG00000137766	UNC13C	15,39	0,0034508	0,10	0,09
ENSG00000186472	PCLO	14,61	0,0040022	0,11	0,08
ENSG00000187398	LUZP2	14,37	0,0042148	0,06	0,05
ENSG00000115380	EFEMP1	13,79	0,0048106	0,15	0,11
ENSG00000120594	PLXDC2	13,69	0,0049274	0,07	0,07
ENSG00000196091	MYBPC1	13,47	0,0051987	0,07	0,08
ENSG00000136546	SCN7A	13,45	0,0052186	0,12	0,12
ENSG00000174145	NWD2	13,35	0,0053433	0,12	0,08
ENSG00000120498	TEX11	11,77	0,0078441	0,09	0,13
ENSG00000116117	PARD3B	9,35	0,0152724	0,14	0,15
ENSG00000196090	PTPRT	9,32	0,0154147	0,19	0,25

Tabulka 5. Analýza transkripce genových setů.

JEKO1 VEGF-UP vs JEKO1 <i>in vitro</i>		
Set genů	Normalizované skóre obohacení	Signifikance
HYPOXIA	2,91	p < 0,0001
GLYCOLYSIS	2,36	p < 0,0001
TNFA SIGNALING VIA NFKB	2,18	p < 0,0001
HEDGEHOG SIGNALING	2,08	p < 0,05
MTORC1 SIGNALING	1,80	p < 0,05
ANGIOGENESIS	1,74	p < 0,05
EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION	1,66	p < 0,05
IL2 STAT5 SIGNALING	1,62	p < 0,05
HEME METABOLISM	1,57	p < 0,05
ANDROGEN RESPONSE	1,49	p < 0,05
INFLAMMATORY RESPONSE	1,49	p < 0,05
ALLOGRAFT REJECTION	1,48	p < 0,05
XENOBIOTIC METABOLISM	-1,40	p < 0,05
APICAL JUNCTION	-1,51	p < 0,05
G2M CHECKPOINT	-1,64	p < 0,05
MYOGENESIS	-1,69	p < 0,05
SPERMATOGENESIS	-1,70	p < 0,05
INTERFERON GAMMA RESPONSE	-1,77	p < 0,05
DNA REPAIR	-1,96	p < 0,0001
MYC TARGETS V2	-2,08	p < 0,05
E2F TARGETS	-2,12	p < 0,0001
OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	-2,16	p < 0,0001
MYC TARGETS V1	-2,18	p < 0,0001
INTERFERON ALPHA RESPONSE	-2,29	p < 0,0001

JEKO1 VEGF-UP vs JEKO1 <i>in vivo</i>		
Set genů	Normalizované skóre obohacení	Signifikance
TNFA SIGNALING VIA NFKB	1,94	p < 0,0001
HYPOXIA	1,91	p < 0,0001
P53 PATHWAY	1,53	p < 0,05
OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	1,51	p < 0,05
XENOBIOTIC METABOLISM	1,42	p < 0,05
MTORC1 SIGNALING	-1,54	p < 0,05
BILE ACID METABOLISM	-1,63	p < 0,05
CHOLESTEROL HOMEOSTASIS	-1,68	p < 0,05
PROTEIN SECRETION	-1,68	p < 0,05
ANDROGEN RESPONSE	-1,72	p < 0,05
INTERFERON GAMMA RESPONSE	-2,35	p < 0,0001
INTERFERON ALPHA RESPONSE	-2,64	p < 0,0001

DISKUZE

ULTRAZVUK:

Modely PDX umožňují studium biologie agresivních lymfomů *in vivo*, včetně komplexního procesu neovaskularizace a jeho dopadu na přihojení, růst a šíření lymfomových buněk. V této studii jsme popsali vysoce relevantní, neinvazivní a reprodukovatelnou metodu, která poskytuje dynamické zobrazování saturace kyslíkem a oblasti mikrocév (MVA) během růstu lymfomu u imunodeficientních myší.

Naše výsledky prokázaly, že hladiny sO_2 Vital (měřeno z vitální oblasti nádorové tkáně) zůstaly u modelů VFN-M1 a VFN-M2 prakticky nezměněny od stádia malých (přibližně 250 mm^3) až po velké (přibližně 1500 mm^3) nádory. U VFN-M5R1 byl ve stádiu velkých nádorů pozorován mírný pokles hladin sO_2 Vital. V ostrém kontrastu jsou pak hodnoty sO_2 Total, který ovšem zahrnoval i nekrotické oblasti, a tudíž celkem logicky vykazoval významný pokles s rostoucí velikostí nádoru u všech analyzovaných PDX modelů. Pozorovaný rozdíl mezi hodnotami sO_2 Vital a sO_2 Total poměrně přesně koreloval s velikostí vitálních a nekrotických oblastí uvnitř nádorů (Rich and Seshadri, 2016). Oblasti uvnitř jádra nádoru s celkovou saturací kyslíkem nižší než 20 % lze hodnotit jako nekrotické tkáně (Gerling et al., 2014). Přítomnost raných nekrotických oblastí nalezených v nádorech VFN-M1 a VFN-M2 vedla ke snížení sO_2 Total přibližně o 10 %, zatímco nádory VFN-M5R1 vykazovaly minimální změnu mezi sO_2 Vital a sO_2 Total při malých velikostech nádorů v důsledku nepřítomnosti rozeznatelných nekrotických oblastí.

Analogicky vaskularizace zjištěná pomocí barevného Dopplera celého tumoru se zmenšovala s růstem velikosti tumoru u VFN-M1 a VFN-M2 PDX modelů. Logické vysvětlení je, že snížení míry vaskularizace celého tumoru je způsobeno právě zvýšením objemu nekrotických oblastí.

Vaskularizace ve viabilních oblastech tumoru ve VFN-M1 a VFN-M2 PDX modelech ověřená imunohistochemicky byla srovnatelná s ultrazvukovým měřením. PDX model VFN-M5R1 naopak vykazoval zvýšenou vaskularizaci i na úrovni velkých tumorů, což bylo potvrzeno i IHC zvýšenou MVD a MVA. Lze předpokládat, že zvýšená MVD a MVA ve stádiu velkých tumorů VFN-M5R1 může být způsobena alespoň částečně snížením sO_2 .

Nejkratší doba do přihojení (13 dnů u VFN-M5R1 versus 21 a 20 dnů u VFN-M1 a VFN-M2) stejně jako nejvyšší hodnoty MVD a MVA zjištěné jak imunohistochemicky, tak USG-PA naznačují, že VFN-M5R1 má nejvyšší biologickou agresivitu, pravděpodobně v důsledku výraznější proangiogenní aktivity. Střední VFN-M5R1 tumory (cca 500–1000 mm³) byly nutričně podpořeny řadou detekovatelných drobných cév, zejména v povrchové části nádoru, kde byly patrné i vyšší hladiny kyslíku (Obrázek 9D). Předpokládáme, že časná tvorba nádoru může být alespoň částečně podpořena těmito drobnými mikrocévami. Ve srovnání s VFN-M1 a VFN-M2 si SC xenotransplantáty VFN-M5R1 udržovaly bohatou, byť chaotickou vaskularizaci i ve stádiu velkých nádorů, což jim zjevně usnadnilo růst a přežití.

Hlavní výhody USG-PA a barevného Dopplera spočívají v tom, že nabízí možnost neinvazivního sledování saturace O_2 a míry vaskularizace *in vivo*, na rozdíl od obvykle používaných postupů, jako je histologická analýza. Možnou nevýhodou *in vivo* měření vaskularity pomocí ultrazvuku je hypotetický vliv anestezie na zobrazování cév *in vivo*. Greening et al. uvedli, že koncentrace isofuranu vyšší než 2 % může ovlivnit koncentraci tkáňového hemoglobinu (HbO_2) a tedy i měřenou saturaci (Greening et al., 2018), což vyžaduje použití kombinovaných roztoků ketamin/xylazin. Další metodou, kterou lze pro analýzu saturace O_2 využít místo PAI je spektroskopie s difúzní odrazivostí, tato ale neumožňuje anatomické zobrazení tkání (Awan et al., 2011; Dadgar et al., 2018). Difúzní optická tomografie může být též využita pro zjišťování okysličení tkání souběžně s anatomickým zobrazováním pomocí současné magnetické

rezonance anebo ultrazvuku jako společné anatomické spoluregistrující modality (Durduran et al., 2010; Merritt et al., 2003), ale proveditelnost a prostorové zobrazení je nesrovnatelné s levnou USG-PA (Bauer et al., 2011; Li et al., 2018), protože u USG-PA je možné získat jak anatomické, tak molekulární informace v reálném čase a v jednom kroku.

Pozorovaná diskrepance mezi MVA získanou pomocí imunohistochemie a barevného Dopplera může být způsobena řadou faktorů. Prvním z nich je zpracování vzorku při IHC analýze, kdy zalití do parafinu a rozřezání vzorku vede ke smrštění tkáně. V takovémto případě mají profily mikrocév tendenci ke kolapsu, což může mít za následek zmenšení oblasti mikrocév tumoru na sklíčkách (West, 2013). To může být hlavním důvodem pozorovaných nižších hodnot MVA získaných pomocí imunohistochemie ve srovnání s PAI u malých nádorů. Dále, zatímco byla IHC analýza hodnocena ze „životaschopných“ oblastí nádoru, vaskularita hodnocená pomocí PAI byla měřena z celého objemu nádoru, tedy i z nekrotických oblastí. V důsledku toho byla vaskularita zjištěná pomocí barevného Dopplera významně nižší než u IHC ve stádiu velkých nádorů, které vykazovaly největší zastoupení nekrotické tkáně v PDX modelech VFN-M1 a VFN-M2. Mimo to byla použita vyšší citlivost a gate barevného Dopplera k zajištění jednotných podmínek pro malé (méně než 500 mm³) a střední (přibližně 1000 mm³) nádory. Naproti tomu velké tumory VFN-M1 a VFN-M2 byly definovány vaskulárním profilem tvořeným širším individuálním žilním systémem bez významné přítomnosti malých cév. To může vysvětlovat, proč hodnoty získané pro VFN-M1 a VFN-M2 z měření *in vivo* barevným Dopplerem jsou nižší než při histologické analýze. Při použití těchto nastavení nebyl barevný Doppler dostatečně citlivý na to, aby detekoval nižší hladiny průtoku krve v kapilárách o průměru několika desítek μm. Analogicky MVA získaná IHC analýzou s barevným dopplerovským měřením pro VFN-M5R1 tumory souvisí s bohatou, chaoticky uspořádanou vaskularitou těchto tumorů a naznačuje, že nádorům VFN-M5R1 chybí

významná síť drobných cév. Předpokládáme, že vyšší agresivita a rychlejší růst VFN-M5R1 jsou důsledkem rozsáhlé nádorové perfúze a z ní plynoucí vyšší tenze O₂ ve vitálních oblastech tumoru.

Výsledky naší studie naznačují, že angiogeneze probíhá od časných stádií malých tumorů po pozdní stádía velkých tumorů s podobnou intenzitou, neboť hustota mikrocév vitálních oblastí tumorů se v průběhu růstu tumoru signifikantně nemění.

Výsledky naší studie dále ukazují, že barevný dopplerovský ultrazvuk není schopen detekovat kapiláry o průměru menším než přibližně 50 μm kvůli nízké úrovni průtoku krve v malých cévách. Dopplerův efekt se používá k měření rozdílů v pohybu a jeho citlivost je ovlivnitelná frekvencí sondy. Výraznou výhodou této metody je ovšem neinvazivita, tj. není nutné podání exogenní kontrastní látky. Ačkoli exogenní kontrastní látky nejsou tématem naší studie, existuje dynamická kontrastní ultrazvuková (DCEUS) zobrazovací technika, která využívá mikrobublin o velikosti mikrometru na bázi plynového jádra a lipidového obalu pro dynamickou detekci jemného průtoku krve v kapilárách s průměrem až 10 μm (Bar-Zion et al., 2016; Pysz et al., 2011; Toumia et al., 2016), čímž by mohlo dojít k dalšímu zpřesnění měření. Potenciální budoucí zpřesnění USG-PA jako nástroje pro přímé hodnocení okysličení a mikrovaskularizace tumoru zahrnuje možnost vývoje nanoplateform pro diagnostiku hypoxie, vaskularizace a nekrózy pomocí kyslíku (Tomaszewski et al., 2018).

CD31:

Jelikož jsme již dříve prokázali, že při přihojení MCL buněk v imunodeficientních myších dochází ke zvýšení exprese CD31 (Molinsky et al., 2013) a protože je CD31 zapojena v procesu angiogeneze, rozhodli jsme se blíže prostudovat roli tohoto antigenu v přihojení, růstu a šíření lymfomu z plášťových buněk.

Z našich měření vyplývá, že exprese CD31 na povrchu MCL buněk je silně variabilní a pozitivně koreluje s extranodálním a extramedulárním (E/E) šířením lymfomu z plášťových buněk. S použitím panelu myších modelů MCL jsme experimentálně potvrdili, že CD31 pozitivně reguluje přihojení, růst a šíření MCL buněk *in vivo*. MCL klony s transgenně zvýšenou expresí CD31 vykazovaly výrazně větší biologickou agresivitu *in vivo* než původní, kontrolní MCL linie, a to včetně většího počtu infiltrovaných E/E oblastí a kratšího celkového přežití systémově xenotransplantovaných jedinců. Toto pozorování podporuje i fakt, že nejvyšší úroveň exprese CD31 byla pozorována u MCL buněk získaných z maligních výpotků pacientů s MCL. Všechna tato data jsou v souladu s hypotézou, že vysoká exprese CD31 usnadňuje šíření, přihojení a přežití MCL buněk v E/E tkáních. Přesný molekulární mechanismus, kterým zvýšená exprese CD31 reguluje pozorovanou změnu biologického chování MCL buněk, však zůstává nejasný. Nicméně protože *in vitro* nemá upregulace CD31 prakticky žádný měřitelný efekt, předpokládáme, že se *in vivo* uplatňují faktory mikroprostředí, které jsou nezbytné pro spuštění fenotypových změn mediovaných zvýšenou expresí CD31. Takovéto faktory mikroprostředí mohou zahrnovat změny vyvolané hypoxií anebo mezibuněčným kontaktem, např. cestou stimulace CD38, jenž je známý ligandem CD31 a dalším klíčovým regulátorem biologických pochodů v lymfomu.

Bylo zjištěno, že nadbytek CD31 na buňkách akutní myeloidní leukemie (AML) je asociován s vyšším počtem leukocytů v periferní krvi, a to z důvodu zvýšené transendoteliální migrace AML buněk z kostní dřeně (Gallay et al., 2007). Podobně exprese CD31 usnadňovala migraci buněk akutní lymfoblastové leukemie (ALL) přes endoteliální buňky mikrocév mozku (Akers et al., 2010). V roce 2017 popsala Münch et al. souvislost mezi zvýšenou produkcí VEGFA a zvýšenou frekvencí CNS postižení u pacientů s ALL (Munch et al., 2017). Protože CD31 je kritickým regulátorem angiogeneze, lze předpokládat, že molekulární dráhy zodpovědné za

zvýšený výskyt E/E postižení (pozorované v naší studii) a za zvýšený výskyt frekvence postižení CNS (pozorované ve studii Münch et al.) mohou být alespoň částečně sdílené.

CD31 je důležitým regulátorem přihojení, růstu a šíření buněk MCL *in vivo*. Úroveň exprese CD31 pozitivně koreluje s počtem E/E míst infiltrovaných lymfomovými buňkami jak u myši s xenotransplantovaným lymfomem, tak u pacientů s MCL, což činí z CD31 možný prediktor agresivity MCL.

VEGFA:

Dosud publikované studie zaměřené na angiogenezi v MCL byly z velké části omezeny na studium hustoty mikrocév (MVD) pomocí tkáňových řezů fixovaných formalínem a zalitých v parafinu, získaných od pacientů při diagnóze, a korelace mezi SOX11 a rozsahem angiogeneze (Annese et al., 2020; Palomero et al., 2014; Petrakis et al., 2019). V rámci naší studie jsme na preklinické úrovni pomocí několika zavedených CDX a PDX MCL modelů (včetně modelů refrakterních na ibrutinib) prokázali, že bevacizumab účinně inhibuje růst podkožních MCL nádorů. Zajímavým zjištěním bylo, že největší míra inhibice byla pozorována na modelech odvozených od pacientů po selhání ibrutinibu. Naše data naznačují, že biologická agresivita pozorovaná u pacientů, kteří progredují na léčbě ibrutinibem, může být alespoň částečně důsledkem zvýšené proangiogenní signalizace.

Dalším zajímavým zjištěním bylo pozorování, že bevacizumab navzdory potlačení růstu podkožního MCL tumoru nezpomaloval šíření MCL buněk do ipsilaterálních a vzdálených lymfatických uzlin, což je ve shodě s nálezem preklinické studie z roku 2012, která sledovala šíření karcinomu pankreatu v souvislosti s antiangiogenní terapií (bevacizumab versus sunitinib). S použitím geneticky modifikovaného myšího modelu karcinomu pankreatu bylo

zjištěno, že bevacizumab nesnižuje pravděpodobnost šíření nádoru ve smyslu metastazování (na rozdíl od sunitinibu) (Singh et al., 2012).

Pokud je nám známo, korelace mezi rozsahem angiogeneze a úrovní metastazování dosud nebyla studována, a to nejen u hematologických malignit, ale ani u solidních nádorů. Pomocí modelů CDX s transgenní overexpresí VEGFA jsme potvrdili silnou pozitivní korelaci mezi expresí VEGFA a biologickou agresivitou podkožních nádorů MCL, která se projevila okamžitým přihojením a růstem po podkožní aplikaci a tkáňově invazivním růstem doprovázeným výrazně zvýšenou MVD. Imunohistochemická analýza MCL nádorů získaných z myší léčených bevacizumabem odhalila sníženou mikrovaskulární denzitu ve srovnání s tumory získanými z kontrolních zvířat. Analogická data byla získána např. v experimentální terapii myších xenograftů světlobuněčného karcinomu ovaria bevacizumabem (Ishikura et al., 2019).

Jak funkční, tak transkriptomová analýza buněk MCL s transgenní overexpresí VEGFA potvrdila, že agresivní fenotyp indukovaný zvýšenou produkcí VEGFA je plně vyjádřen pouze v podmínkách *in vivo*, což ukazuje na kritickou roli faktorů mikroprostředí. Jednak může docházet k ovlivnění genové exprese spouštěné VEGF díky ko-modulaci genových promotorů vlivem hypoxie, acidózy a kontaktu lymfomových buněk s mikroprostředím (matrix, nenádorové buňky). Kromě toho může zvýšená exprese VEGFA a jeho sekrece do okolí lymfomu vést ke komplexní remodelaci mikroprostředí nejen díky autokrinní stimulaci růstu a akcentaci angiogeneze, ale vysoce pravděpodobně také díky ovlivnění nenádorových složek mikroprostředí (fibroblasty, makrofágy atd.). Tyto v odpovědi na stimulaci VEGFA mohou produkovat sekundární působky a zpětně ovlivňovat biologii lymfomových buněk ve smyslu vyšší agresivity. Jednoznačně to ukazují data transkriptomových analýz, která u klonů s upregulací VEGFA odhalila rozsáhlé změny v transkripci pouze v podmínkách *in vivo*, zatímco v podmínkách *in vitro* byly změny vyvolané transgenní expresí VEGF relativně malé. A potvrzují

to též výrazné změny fenotypu lymfomových buněk pozorovatelné pouze v podmínkách *in vivo* (výrazně vyšší agresivita chování MCL tumorů s upregulací VEGF proti kontrolním tumorům).

Analýza klonů MCL linií se zvýšenou expresí VEGFA v podmínkách *in vivo* tak dle našeho názoru jednoznačně potvrdila pozitivní korelaci mezi hypoxií (resp. hypoxií indukovanou proangiogenní signalizací) a biologickou agresivitou lymfomu. Z translačního hlediska by pacienti s MCL mohli profitovat z terapeutické inhibice angiogeneze, ideálně v rámci polychemoterapeutických léčebných režimů nebo v kombinaci s jinými cílenými či biologickými léčivy. Vzhledem k tomu, že největší míra inhibice růstu podkožně rostoucích lymfomů byla pozorována na PDX modelech odvozených od pacientů po selhání ibrutinibu, mohla by z implementace antiangiogenních látek do záchranných léčebných režimů profitovat i tato skupina MCL pacientů s dosud extrémně špatnou prognózou.

ZÁVĚRY STUDIE

Prezentovaná studie přináší důkazy o možnosti využití ultrazvuku v hodnocení *in vivo* vaskularity a oxygenace tumoru na zvířecích modelech, o vlivu CD31 a VEGFA na biologické chování lymfomu z plášťových buněk a potenciální využití antiangiogenní terapie, a to zejména u velmi agresivních, předléčených forem. Zjistili jsme, že:

- Míra angiogeneze a stupeň hypoxie jsou závislé na velikosti tumoru.
- ultrazvuková metoda (USG-PA) hodnocení vaskularity a oxygenace je vhodným nástrojem pro orientační měření MVA, zatímco imunohistochemická analýza přináší přesnější představu o mikrovaskulární síti, což je dáno rozlišovacím limitem přístroje USG-PA.
- Míra exprese CD31 na povrchu maligních buněk pacientů s MCL pozitivně koreluje s extranodálním šířením lymfomu, což potvrdily i experimenty s transgenně změněnou expresí CD31 na myších modelech.
- Míra exprese CD31 by mohla sloužit jako prediktivní marker agresivity MCL.
- Hladina VEGFA významně ovlivňuje nejen míru angiogeneze, ale též biologické chování MCL buněk, nejspíše prostřednictvím remodelace nádorového mikroprostředí (tedy vlivu VEGF jak na lymfomové buňky, tak na nenádorové komponenty mikroprostředí)
- Růst podkožních xenotransplantátů MCL je efektivně inhibován anti-VEGFA protilátkou bevacizumabem, ale nezabraňuje šíření lymfomu („metastazování“).
- Pacienti s R/R MCL (včetně pacientů po selhání inhibitorů BTK) by mohli profitovat ze začlenění anti-angiogenních molekul do léčebných kombinací.

SHRNUTÍ

Lymfom z pláštových buněk (MCL) je podtypem B-non-Hodgkinských lymfomů charakterizovaný častými relapsy. I přes začlenění ibrutinibu, inhibitoru Brutonovy tyrosinkinázy, do záchranné terapie dochází u těchto pacientů dříve či později k návratu biologicky vysoce agresivní choroby s extrémně špatnou prognózou. Jedním z popisovaných mechanismů rezistence na ibrutinib je zvýšená aktivace alternativních metabolických drah, z nichž některé (např. PI3K-AKT-mTOR) vykazují též signifikantní proangiogenní aktivitu.

V předložené studii jsme zavedli a standardizovali ultrasonografické a fotoakustické zobrazování neovaskularizace a tkáňové oxygenace podkožních MCL tumorů na myších modelech v reálném čase. Zjistili jsme, že ultrasonografické a fotoakustické zobrazování je rychlou, neinvazivní metodou k posouzení angiogeneze v podkožních tumorech s velkým preklinickým potenciálem. Na myších modelech MCL jsme prokázali význam míry exprese CD31/PECAM1 pro přihojení, růst a šíření buněk MCL *in vivo*. Na patientských vzorcích jsme ověřili, že míra exprese CD31/PECAM1 pozitivně koreluje s mírou extranodálního postižení. CD31 usnadňuje přežití a reguluje extranodální šíření lymfomu z pláštových buněk. Zjistili jsme, že zvýšení exprese VEGF vede nejen ke zvýšení mikrovaskulární denzity díky pozitivnímu ovlivnění sprouting angiogeneze, ale komplexním způsobem mění vlastnosti lymfomových buněk ve smyslu zvýšení jejich biologické agresivity.

Na preklinické úrovni jsme potvrdili silnou pozitivní korelaci mezi rozsahem angiogeneze a biologickou agresivitou MCL. Z výsledků je zřejmé, že pacienti s MCL (včetně refrakterních na ibrutinib) by mohli profitovat z implementace antiangiogenních léků do režimů záchranné terapie.

SUMMARY

Mantle cell lymphoma (MCL) is a subtype of B-non-Hodgkin's lymphoma, characterized by often relapses. Despite an Ibrutinib (a Bruton's kinase inhibitor) implementation into salvage therapy, these patients often relapse with biologically highly aggressive disease and very poor prognosis. An increased activation of alternative metabolic pathways was described as one of Ibrutinib-resistance mechanisms. Some of these pathways have also significant proangiogenic activity (e.g. PI3K-AKT-mTOR).

In presented study, we established and standardized a real-time ultrasound and photoacoustic imaging of neovascularization and tissue oxygenation of subcutaneous MCL tumors in mice. Ultrasound and photoacoustic imaging is a fast, non-invasive method for angiogenesis evaluation in subcutaneous tumors with huge preclinical potential. Using MCL mice models, we also demonstrated the importance of CD31/PECAM-1 expression for engraftment, growth and spread of MCL cells *in vivo*. The level of CD31 expression in primary MCL cell (obtained directly from MCL patients) positively correlates with extent of extranodal involvement. CD31 facilitates survival and regulates extranodal spread of mantle cell lymphoma. We found that increased VEGFA expression causes not only increased microvessel density due to higher sprouting angiogenesis stimulation, but also leads to complex changes in biological behavior of MCL cells, which become more aggressive.

On preclinical level, we confirmed a strong positive correlation of angiogenesis extent and biological aggressiveness of MCL. The results confirm, that patients with MCL (including those refractory to Ibrutinib) could profit from the implementation of antiangiogenic drugs into salvage therapy regimens.

REFERENCE

- Akers, S.M., O'Leary, H.A., Minnear, F.L., Craig, M.D., Vos, J.A., Coad, J.E., Gibson, L.F., 2010. VE-cadherin and PECAM-1 enhance ALL migration across brain microvascular endothelial cell monolayers. *Experimental Hematology* 38(9), 733-743.
- Alitalo, K., Tammela, T., Petrova, T.V., 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438(7070), 946-953.
- Anderson, M.K., Torosyan, A., Halford, Z., 2021. Brexucabtagene Autoleucel: A Novel Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for the Treatment of Mantle Cell Lymphoma. *Ann Pharmacother*, 10600280211026338.
- Annese, T., Ingravallo, G., Tamma, R., De Giorgis, M., Maiorano, E., Perrone, T., Albano, F., Specchia, G., Ribatti, D., 2020. Inflammatory Infiltrate and Angiogenesis in Mantle Cell Lymphoma. *Transl Oncol* 13(3), 100744.
- Awan, Z.A., Haggblad, E., Wester, T., Kvernebo, M.S., Halvorsen, P.S., Kvernebo, K., 2011. Diffuse reflectance spectroscopy: Systemic and microvascular oxygen saturation is linearly correlated and hypoxia leads to increased spatial heterogeneity of microvascular saturation. *Microvasc Res* 81(3), 245-251.
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L., Vogt, P.K., 2005. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature reviews. Cancer* 5(12), 921-929.
- Bar-Zion, A., Yin, M., Adam, D., Foster, F.S., 2016. Functional Flow Patterns and Static Blood Pooling in Tumors Revealed by Combined Contrast-Enhanced Ultrasound and Photoacoustic Imaging. *Cancer research* 76(15), 4320-4331.
- Barlogie, B., Desikan, R., Eddlemon, P., Spencer, T., Zeldis, J., Munshi, N., Badros, A., Zangari, M., Anaissie, E., Epstein, J., Shaughnessy, J., Ayers, D., Spoon, D., Tricot, G., 2001. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent

- thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood* 98(2), 492-494.
- Bauer, A.Q., Nothdurft, R.E., Erpelding, T.N., Wang, L.V., Culver, J.P., 2011. Quantitative photoacoustic imaging: correcting for heterogeneous light fluence distributions using diffuse optical tomography. *J Biomed Opt* 16(9), 096016.
- Berardi, S., Caivano, A., Ria, R., Nico, B., Savino, R., Terracciano, R., De Tullio, G., Ferrucci, A., De Luisi, A., Moschetta, M., Mangialardi, G., Catacchio, I., Basile, A., Guarini, A., Zito, A., Ditonno, P., Musto, P., Dammacco, F., Ribatti, D., Vacca, A., 2012. Four proteins governing overangiogenic endothelial cell phenotype in patients with multiple myeloma are plausible therapeutic targets. *Oncogene* 31(18), 2258-2269.
- Bergers, G., Song, S., 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 7(4), 452-464.
- Bertoni, F., Ponzoni, M., 2007. The cellular origin of mantle cell lymphoma. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(10), 1747-1753.
- Bodrug, S.E., Warner, B.J., Bath, M.L., Lindeman, G.J., Harris, A.W., Adams, J.M., 1994. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J* 13(9), 2124-2130.
- Bono, A.V., Celato, N., Cova, V., Salvatore, M., Chinetti, S., Novario, R., 2002. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate cancer and prostatic diseases* 5(2), 123-127.
- Bosch, F., Jares, P., Campo, E., Lopez-Guillermo, A., Piris, M.A., Villamor, N., Tassies, D., Jaffe, E.S., Montserrat, E., Rozman, C., et al., 1994. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 84(8), 2726-2732.

- Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Walewska, R., Brown, D., Dyer, M.J.S., Cain, K., 2009. Protein Profiling of Plasma Membranes Defines Aberrant Signaling Pathways in Mantle Cell Lymphoma. *Molecular & Cellular Proteomics* 8(7), 1501-1515.
- Breitkreutz, I., Raab, M.S., Vallet, S., Hideshima, T., Raje, N., Mitsiades, C., Chauhan, D., Okawa, Y., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Anderson, K.C., 2008. Lenalidomide inhibits osteoclastogenesis, survival factors and bone-remodeling markers in multiple myeloma. *Leukemia* 22(10), 1925-1932.
- Cao, G., Fehrenbach, M.L., Williams, J.T., Finklestein, J.M., Zhu, J.X., Delisser, H.M., 2009. Angiogenesis in platelet endothelial cell adhesion molecule-1-null mice. *The American journal of pathology* 175(2), 903-915.
- Cao, G., O'Brien, C.D., Zhou, Z., Sanders, S.M., Greenbaum, J.N., Makrigiannakis, A., DeLisser, H.M., 2002. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(5), C1181-1190.
- Cardesa-Salzmann, T.M., Colomo, L., Gutierrez, G., Chan, W.C., Weisenburger, D., Climent, F., Gonzalez-Barca, E., Mercadal, S., Arenillas, L., Serrano, S., Tubbs, R., Delabie, J., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Mate, J.L., Rimsza, L., Braziel, R., Rosenwald, A., Lenz, G., Wright, G., Jaffe, E.S., Staudt, L., Jares, P., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., 2011. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica* 96(7), 996-1001.
- Cardesa-Salzmann, T.M., Colomo, L., Gutierrez, G., Chan, W.C., Weisenburger, D., Climent, F., González-Barca, E., Mercadal, S., Arenillas, L., Serrano, S., Tubbs, R., Delabie, J., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Mate, J.L., Rimsza, L., Braziel, R., Rosenwald, A., Lenz, G., Wright, G., Jaffe, E.S., Staudt, L., Jares, P., López-Guillermo, A., Campo, E., 2011.

- High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica* 96(7), 996-1001.
- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438(7070), 932-936.
- Cigrovski Berkovic, M., Cacev, T., Catela Ivkovic, T., Marout, J., Ulamec, M., Zjacic-Rotkvic, V., Kapitanovic, S., 2016. High VEGF serum values are associated with locoregional spread of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). *Mol Cell Endocrinol* 425, 61-68.
- Cohen, M.H., Gootenberg, J., Keegan, P., Pazdur, R., 2007. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *The oncologist* 12(6), 713-718.
- D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., Folkman, J., 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(9), 4082-4085.
- Dadgar, S., Troncoso, J.R., Rajaram, N., 2018. Optical spectroscopic sensing of tumor hypoxia. *J Biomed Opt* 23(6), 1-6.
- Dal Col, J., Zancai, P., Terrin, L., Guidoboni, M., Ponzoni, M., Pavan, A., Spina, M., Bergamin, S., Rizzo, S., Tirelli, U., De Rossi, A., Doglioni, C., Dolcetti, R., 2008. Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood* 111(10), 5142-5151.
- De Falco, S., Gigante, B., Persico, M.G., 2002. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 12(6), 241-246.

- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., Nunez, G., 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278(5338), 687-689.
- Delarue, R., Haioun, C., Ribrag, V., Brice, P., Delmer, A., Tilly, H., Salles, G., Van Hoof, A., Casasnovas, O., Brousse, N., Lefrere, F., Hermine, O., Groupe d'Etude des Lymphomes de, I.A., 2013. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 121(1), 48-53.
- Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Zhu, Z., Wu, Y., Witte, L., Hicklin, D.J., Tatenos, M., Bohlen, P., Moore, M.A., 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.
- Dome, B., Hendrix, M.J., Paku, S., Tovari, J., Timar, J., 2007. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *The American journal of pathology* 170(1), 1-15.
- Dome, B., Paku, S., Somlai, B., Timar, J., 2002. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *The Journal of pathology* 197(3), 355-362.
- Dong, J., Grunstein, J., Tejada, M., Peale, F., Frantz, G., Liang, W.C., Bai, W., Yu, L., Kowalski, J., Liang, X., Fuh, G., Gerber, H.P., Ferrara, N., 2004. VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J* 23(14), 2800-2810.

- Dreyling, M., European Mantle Cell Lymphoma, N., 2014. Mantle cell lymphoma: biology, clinical presentation, and therapeutic approaches. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 191-198.
- Dreyling, M., Geisler, C., Hermine, O., Kluin-Nelemans, H.C., Le Gouill, S., Rule, S., Shpilberg, O., Walewski, J., Ladetto, M., Group, E.G.W., 2014. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 25 Suppl 3, iii83-92.
- Dreyling, M., Jurczak, W., Jerkeman, M., Silva, R.S., Rusconi, C., Trneny, M., Offner, F., Caballero, D., Joao, C., Witzens-Harig, M., Hess, G., Bence-Bruckler, I., Cho, S.G., Bothos, J., Goldberg, J.D., Enny, C., Traina, S., Balasubramanian, S., Bandyopadhyay, N., Sun, S., Vermeulen, J., Rizo, A., Rule, S., 2016. Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study. Lancet 387(10020), 770-778.
- Dreyling, M., Kluin-Nelemans, H.C., Bea, S., Klapper, W., Vogt, N., Delfau-Larue, M.H., Hutter, G., Cheah, C., Chiappella, A., Cortelazzo, S., Pott, C., Hess, G., Visco, C., Vitolo, U., Klener, P., Aurer, I., Unterhalt, M., Ribrag, V., Hoster, E., Hermine, O., European, M.C.L.N., 2013. Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. Leukemia & lymphoma 54(4), 699-707.
- Dreyling, M., Lenz, G., Hoster, E., Van Hoof, A., Gisselbrecht, C., Schmits, R., Metzner, B., Truemper, L., Reiser, M., Steinhauer, H., Boiron, J.M., Boogaerts, M.A., Aldaoud, A., Silingardi, V., Kluin-Nelemans, H.C., Hasford, J., Parwaresch, R., Unterhalt, M., Hiddemann, W., 2005. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly

- prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 105(7), 2677-2684.
- Durduran, T., Choe, R., Baker, W.B., Yodh, A.G., 2010. Diffuse Optics for Tissue Monitoring and Tomography. *Rep Prog Phys* 73(7).
- Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., Dvorak, A.M., 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology* 146(5), 1029-1039.
- Epperla, N., Hamadani, M., Cashen, A.F., Ahn, K.W., Oak, E., Kanate, A.S., Calzada, O., Cohen, J.B., Farmer, L., Ghosh, N., Tallarico, M., Nabhan, C., Costa, L.J., Kenkre, V.P., Hari, P.N., Fenske, T.S., 2017. Predictive factors and outcomes for ibrutinib therapy in relapsed/refractory mantle cell lymphoma-a "real world" study. *Hematol Oncol* 35(4), 528-535.
- Ettrich, T.J., Seufferlein, T., 2018. Regorafenib. *Recent Results Cancer Res* 211, 45-56.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P., Novotny, W., 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 3(5), 391-400.
- Ferrara, N., Kerbel, R.S., 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438(7070), 967-974.
- Ferrer, A., Salaverria, I., Bosch, F., Villamor, N., Rozman, M., Bea, S., Gine, E., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., Montserrat, E., 2007. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer* 109(12), 2473-2480.
- Foss, H.D., Araujo, I., Demel, G., Klotzbach, H., Hummel, M., Stein, H., 1997. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *The Journal of pathology* 183(1), 44-50.

- Fujisawa, T., Watanabe, J., Kamata, Y., Hamano, M., Hata, H., Kuramoto, H., 2003. Effect of p53 gene transfection on vascular endothelial growth factor expression in endometrial cancer cells. *Exp Mol Pathol* 74(3), 276-281.
- Fukumura, D., Jain, R.K., 2007. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *Journal of cellular biochemistry* 101(4), 937-949.
- Gallay, N., Anani, L., Lopez, A., Colombat, P., Binet, C., Domenech, J., Weksler, B.B., Malavasi, F., Herault, O., 2007. The Role of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) and CD38 Antigens in Marrow Microenvironmental Retention of Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Cancer Research* 67(18), 8624-8632.
- Gao, C., Sun, W., Christofidou-Solomidou, M., Sawada, M., Newman, D.K., Bergom, C., Albelda, S.M., Matsuyama, S., Newman, P.J., 2003. PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis. *Blood* 102(1), 169-179.
- Gao, C., Sun, W., Christofidou-Solomidou, M., Sawada, M., Newman, D.K., Bergom, C., Albelda, S.M., Matsuyama, S., Newman, P.J., 2003. PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis. *Blood* 102(1), 169-179.
- Gasparini, G., Longo, R., Fanelli, M., Teicher, B.A., 2005. Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(6), 1295-1311.
- Gerling, M., Zhao, Y., Nania, S., Norberg, K.J., Verbeke, C.S., Englert, B., Kuiper, R.V., Bergstrom, A., Hassan, M., Neesse, A., Lohr, J.M., Heuchel, R.L., 2014. Real-time assessment of tissue hypoxia in vivo with combined photoacoustics and high-frequency ultrasound. *Theranostics* 4(6), 604-613.

- Germain, S., Monnot, C., Muller, L., Eichmann, A., 2010. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Current opinion in hematology* 17(3), 245-251.
- Gianni, A.M., Magni, M., Martelli, M., Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Pilotti, S., Rambaldi, A., Cortelazzo, S., Patti, C., Parvis, G., Benedetti, F., Capria, S., Corradini, P., Tarella, C., Barbui, T., 2003. Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen). *Blood* 102(2), 749-755.
- Giurdanella, G., Anfuso, C.D., Olivieri, M., Lupo, G., Caporarello, N., Eandi, C.M., Drago, F., Bucolo, C., Salomone, S., 2015. Aflibercept, bevacizumab and ranibizumab prevent glucose-induced damage in human retinal pericytes in vitro, through a PLA2/COX-2/VEGF-A pathway. *Biochem Pharmacol* 96(3), 278-287.
- Greening, G.J., Miller, K.P., Spainhour, C.R., Cato, M.D., Muldoon, T.J., 2018. Effects of isoflurane anesthesia on physiological parameters in murine subcutaneous tumor allografts measured via diffuse reflectance spectroscopy. *Biomed Opt Express* 9(6), 2871-2886.
- Gribben, J.G., Fowler, N., Morschhauser, F., 2015. Mechanisms of Action of Lenalidomide in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(25), 2803-2811.
- Gundersen, H.J., 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.*, 111, 219–223.
- Gustavsson, E., Sernbo, S., Andersson, E., Brennan, D.J., Dictor, M., Jerkeman, M., Borrebaeck, C.A., Ek, S., 2010. SOX11 expression correlates to promoter methylation and regulates tumor growth in hematopoietic malignancies. *Molecular cancer* 9, 187.

- Hanashima, Y., Sano, E., Sumi, K., Ozawa, Y., Yagi, C., Tatsuoka, J., Yoshimura, S., Yamamuro, S., Ueda, T., Nakayama, T., Hara, H., Yoshino, A., 2020. Antitumor effect of lenalidomide in malignant glioma cell lines. *Oncol Rep* 43(5), 1580-1590.
- Hanel, W., Epperla, N., 2020. Emerging therapies in mantle cell lymphoma. *Journal of hematology & oncology* 13(1), 79.
- Harris, A.L., 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer* 2(1), 38-47.
- Hay, N., 2005. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 8(3), 179-183.
- Hershkovitz-Rokah, O., Pulver, D., Lenz, G., Shpilberg, O., 2018. Ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma: clinical, molecular and treatment aspects. *British journal of haematology* 181(3), 306-319.
- Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L., Coiffier, B., 2009. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(23), 3822-3829.
- Hess, G., Wagner, K., Keller, U., La Rosee, P., Atta, J., Hubel, K., Lerchenmueller, C., Schoendube, D., Witzens-Harig, M., Ruckes, C., Medler, C., van Oordt, C., Klapper, W., Theobald, M., Dreyling, M., 2020. Final Results of a Phase I/II Trial of the Combination Bendamustine and Rituximab With Temsirolimus (BeRT) in Relapsed Mantle Cell Lymphoma and Follicular Lymphoma. *Hemasphere* 4(3), e398.
- Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S.D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J.P., Daly,

- T., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D., Rudge, J.S., 2002. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(17), 11393-11398.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284(5422), 1994-1998.
- Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H.C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wormann, B., Ludwig, W.D., Duhrsen, U., Eimermacher, H., Wandt, H., Hasford, J., Hiddemann, W., Unterhalt, M., German Low Grade Lymphoma Study, G., European Mantle Cell Lymphoma, N., 2008. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111(2), 558-565.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F., 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 350(23), 2335-2342.
- Chanan-Khan, A., Miller, K.C., Takeshita, K., Koryzna, A., Donohue, K., Bernstein, Z.P., Mohr, A., Klippenstein, D., Wallace, P., Zeldis, J.B., Berger, C., Czuczman, M.S., 2005. Results of a phase 1 clinical trial of thalidomide in combination with fludarabine as initial therapy for patients with treatment-requiring chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 106(10), 3348-3352.
- Chang, Y.S., di Tomaso, E., McDonald, D.M., Jones, R., Jain, R.K., Munn, L.L., 2000. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
97(26), 14608-14613.

Cheah, C.Y., George, A., Gine, E., Chiappella, A., Kluin-Nelemans, H.C., Jurczak, W., Krawczyk, K., Mocikova, H., Klener, P., Salek, D., Walewski, J., Szymczyk, M., Smolej, L., Auer, R.L., Ritchie, D.S., Arcaini, L., Williams, M.E., Dreyling, M., Seymour, J.F., European Mantle Cell Lymphoma, N., 2013. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma: clinical features, prognostic factors and outcomes from the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Ann Oncol* 24(8), 2119-2123.

Cheah, C.Y., Chihara, D., Romaguera, J.E., Fowler, N.H., Seymour, J.F., Hagemester, F.B., Champlin, R.E., Wang, M.L., 2015. Patients with mantle cell lymphoma failing ibrutinib are unlikely to respond to salvage chemotherapy and have poor outcomes. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26(6), 1175-1179.

Ishigami, S.I., Aii, S., Furutani, M., Niwano, M., Harada, T., Mizumoto, M., Mori, A., Onodera, H., Imamura, M., 1998. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *British journal of cancer* 78(10), 1379-1384.

Ishikura, N., Yorozu, K., Kurasawa, M., Yanagisawa, M., Sugimoto, M., Yamamoto, K., 2019. Sustained effect of continuous treatment with bevacizumab following bevacizumab in combination with chemotherapy in a human ovarian clear cell carcinoma xenograft model. *Oncol Rep* 42(3), 1057-1065.

Jackson, D.E., 2003. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Letters* 540(1-3), 7-14.

Jain, P., Kanagal-Shamanna, R., Zhang, S., Ahmed, M., Ghorab, A., Zhang, L., Ok, C.Y., Li, S., Hagemester, F., Zeng, D., Gong, T., Chen, W., Badillo, M., Nomie, K., Fayad, L.,

- Medeiros, L.J., Neelapu, S., Fowler, N., Romaguera, J., Champlin, R., Wang, L., Wang, M.L., 2018. Long-term outcomes and mutation profiling of patients with mantle cell lymphoma (MCL) who discontinued ibrutinib. *British journal of haematology* 183(4), 578-587.
- Jain, P., Wang, M., 2019. Mantle cell lymphoma: 2019 update on the diagnosis, pathogenesis, prognostication, and management. *American journal of hematology* 94(6), 710-725.
- Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W., Loeffler, J.S., 2006. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature clinical practice. Oncology* 3(1), 24-40.
- Jakobsson, L., Franco, C.A., Bentley, K., Collins, R.T., Ponsioen, B., Aspalter, I.M., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., Schulte-Merker, S., Gerhardt, H., 2010. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* 12(10), 943-953.
- Jost, P.J., Ruland, J., 2007. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 109(7), 2700-2707.
- Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V.H., Martin-Ayuso, M., Bottcher, S., Ritgen, M., Almeida, J., Lhermitte, L., Asnafi, V., Mendonca, A., de Tute, R., Cullen, M., Sedek, L., Vidriales, M.B., Perez, J.J., te Marvelde, J.G., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Szczepanski, T., van Dongen, J.J., Orfao, A., EuroFlow, C., 2012. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 26(9), 1986-2010.
- Kaufmann, H., Raderer, M., Wohrer, S., Puspok, A., Bankier, A., Zielinski, C., Chott, A., Drach, J., 2004. Antitumor activity of rituximab plus thalidomide in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Blood* 104(8), 2269-2271.

- Khademi, B., Soleimanpour, M., Ghaderi, A., Mohammadianpanah, M., 2014. Prognostic and predictive value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Maxillofac Surg* 18(2), 187-196.
- Klanova, M., Soukup, T., Jaksá, 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. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 94(7), 806-817.
- Kluin-Nelemans, J.C., Doorduijn, J.K., 2018. What is the optimal initial management of the older MCL patient? *Best Pract Res Clin Haematol* 31(1), 99-104.
- Kodet, R., Mrhalova, M., Krskova, L., Soukup, J., Campr, V., Neskudla, T., Szepe, P., Plank, L., 2003. Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 442(6), 538-547.
- Konishi, T., Huang, C.L., Adachi, M., Taki, T., Inufusa, H., Kodama, K., Kohno, N., Miyake, M., 2000. The K-ras gene regulates vascular endothelial growth factor gene expression in non-small cell lung cancers. *Int J Oncol* 16(3), 501-511.
- Kopp, H.G., Ramos, C.A., Rafii, S., 2006. Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Current opinion in hematology* 13(3), 175-181.
- Kumar, S., Gertz, M.A., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Wellik, L.A., Fonseca, R., Lust, J.A., Witzig, T.E., Kyle, R.A., Greipp, P.R., Rajkumar, S.V., 2004. Prognostic value of bone marrow

- angiogenesis in patients with multiple myeloma undergoing high-dose therapy. *Bone marrow transplantation* 34(3), 235-239.
- 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. *British journal of haematology* 116(1), 158-161.
- Kurz, H., Burri, P.H., Djonov, V.G., 2003. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 18, 65-70.
- Ladetto, M., Tavarozzi, R., Pott, C., 2020. Minimal Residual Disease in Mantle Cell Lymphoma: Methods and Clinical Significance. *Hematol Oncol Clin North Am* 34(5), 887-901.
- Lee, S., Chen, T.T., Barber, C.L., Jordan, M.C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K.P., Iruela-Arispe, M.L., 2007. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 130(4), 691-703.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., Goldberg, M.A., 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 270(22), 13333-13340.
- Li, L., Wang, L., Zhang, W., Tang, B., Zhang, J., Song, H., Yao, D., Tang, Y., Chen, X., Yang, Z., Wang, G., Li, X., Zhao, J., Ding, H., Reed, E., Li, Q.Q., 2004. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. *Anticancer Res* 24(3b), 1973-1979.
- Li, M., Tang, Y., Yao, J., 2018. Photoacoustic tomography of blood oxygenation: A mini review. *Photoacoustics* 10, 65-73.
- Liu, Y., Zhang, X., Zhong, J.F., 2015. Current approaches and advance in mantle cell lymphoma treatment. *Stem Cell Investig* 2, 18.

- Liu, Z., Fan, F., Wang, A., Zheng, S., Lu, Y., 2014. Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 140(4), 525-536.
- Luo, J., Manning, B.D., Cantley, L.C., 2003. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4(4), 257-262.
- Ma, J., Lu, P., Guo, A., Cheng, S., Zong, H., Martin, P., Coleman, M., Wang, Y.L., 2014. Characterization of ibrutinib-sensitive and -resistant mantle lymphoma cells. *British journal of haematology* 166(6), 849-861.
- Malarikova, D., Berkova, A., Obr, A., Blahovcova, P., Svaton, M., Forsterova, K., Kriegova, E., Prihodova, E., Pavlistova, L., Petrackova, A., Zemanova, Z., Trneny, M., Klener, P., 2020. Concurrent TP53 and CDKN2A Gene Aberrations in Newly Diagnosed Mantle Cell Lymphoma Correlate with Chemoresistance and Call for Innovative Upfront Therapy. *Cancers (Basel)* 12(8).
- Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., Hendrix, M.J., 1999. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology* 155(3), 739-752.
- Martin, P., Maddocks, K., Leonard, J.P., Ruan, J., Goy, A., Wagner-Johnston, N., Rule, S., Advani, R., Ibbri, D., Phillips, T., Spurgeon, S., Kozin, E., Noto, K., Chen, Z., Jurczak, W., Auer, R., Chmielowska, E., Stilgenbauer, S., Bloehdorn, J., Portell, C., Williams, M.E., Dreyling, M., Barr, P.M., Chen-Kiang, S., DiLiberto, M., Furman, R.R., Blum, K.A., 2016. Postibrutinib outcomes in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* 127(12), 1559-1563.

- Matsumura, T., Wolff, K., Petzelbauer, P., 1997. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol* 158(7), 3408-3416.
- McCarthy, D.J., Chen, Y., Smyth, G.K., 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic acids research* 40(10), 4288-4297.
- Merritt, S., Bevilacqua, F., Durkin, A.J., Cuccia, D.J., Lanning, R., Tromberg, B.J., Gulsen, G., Yu, H., Wang, J., Nalcioglu, O., 2003. Coregistration of diffuse optical spectroscopy and magnetic resonance imaging in a rat tumor model. *Appl Opt* 42(16), 2951-2959.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7(8), 766-772.
- Mian, A., Hill, B.T., 2021. Brexucabtagene autoleucel for the treatment of relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Expert Opin Biol Ther* 21(4), 435-441.
- Miao, Y., Lin, P., Saksena, A., Xu, J., Wang, M., Romaguera, J., Yin, C.C., Medeiros, L.J., Li, S., 2019. CD5-negative Mantle Cell Lymphoma: Clinicopathologic Correlations and Outcome in 58 Patients. *Am J Surg Pathol* 43(8), 1052-1060.
- Mohty, M., Terpos, E., Mateos, M.V., Cavo, M., Lejniece, S., Beksac, M., Bekadja, M.A., Legiec, W., Dimopoulos, M., Stankovic, S., Duran, M.S., De Stefano, V., Corso, A., Kochkareva, Y., Laane, E., Berthou, C., Salwender, H., Masliak, Z., Peceliunas, V., Willenbacher, W., Silva, J., Louw, V., Nemet, D., Borbenyi, Z., Abadi, U., Pedersen, R.S., Cernelc, P., Potamianou, A., Couturier, C., Feys, C., Thoret-Bauchet, F., Boccadoro, M., Investigators, E., 2018. Multiple Myeloma Treatment in Real-world Clinical Practice: Results of a Prospective, Multinational, Noninterventional Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 18(10), e401-e419.

- Molinsky, J., Klanova, M., Maswabi, B., Soukup, T., Trneny, M., Necas, E., Zivny, J., Klener, P., 2013. In vivo growth of mantle cell lymphoma xenografts in immunodeficient mice is positively regulated by VEGF and associated with significant up-regulation of CD31/PECAM1. *Folia biologica* 59(1), 26-31.
- Muller, Y.A., Li, B., Christinger, H.W., Wells, J.A., Cunningham, B.C., de Vos, A.M., 1997. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(14), 7192-7197.
- Munch, V., Trentin, L., Herzig, J., Demir, S., Seyfried, F., Kraus, J.M., Kestler, H.A., Kohler, R., Barth, T.F.E., Te Kronnie, G., Debatin, K.M., Meyer, L.H., 2017. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia is mediated by vascular endothelial growth factor. *Blood* 130(5), 643-654.
- Nagy, B., Lundan, T., Larramendy, M.L., Aalto, Y., Zhu, Y., Niini, T., Edgren, H., Ferrer, A., Vilpo, J., Elonen, E., Vettenranta, K., Franssila, K., Knuutila, S., 2003. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *British journal of haematology* 120(3), 434-441.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R., Lefkowitz, J.B., 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 55, 69-102.
- Nordstrom, L., Sernbo, S., Eden, P., Gronbaek, K., Kolstad, A., Raty, R., Karjalainen, M.L., Geisler, C., Ralfkiaer, E., Sundstrom, C., Laurell, A., Delabie, J., Ehinger, M., Jerkeman, M., Ek, S., 2014. SOX11 and TP53 add prognostic information to MIPI in a homogenously treated cohort of mantle cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study. *British journal of haematology* 166(1), 98-108.

- Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., Kaipainen, A., Pertovaara, L., Alitalo, R., Alitalo, K., 1992. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer research* 52(20), 5738-5743.
- Palomero, J., Vegliante, M.C., Rodriguez, M.L., Eguileor, A., Castellano, G., Planas-Rigol, E., Jares, P., Ribera-Cortada, I., Cid, M.C., Campo, E., Amador, V., 2014. SOX11 promotes tumor angiogenesis through transcriptional regulation of PDGFA in mantle cell lymphoma. *Blood* 124(14), 2235-2247.
- Palumbo, A., Anderson, K., 2011. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 364(11), 1046-1060.
- Panayiotidis, P., Kotsi, P., 1999. Genetics of small lymphocyte disorders. *Semin Hematol* 36(2), 171-177.
- Papadopoulos, N., Martin, J., Ruan, Q., Rafique, A., Rosconi, M.P., Shi, E., Pyles, E.A., Yancopoulos, G.D., Stahl, N., Wiegand, S.J., 2012. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* 15(2), 171-185.
- Peach, M.L., Beedie, S.L., Chau, C.H., Collins, M.K., Markolovic, S., Luo, W., Tweedie, D., Steinebach, C., Greig, N.H., Gutschow, M., Vargesson, N., Nicklaus, M.C., Figg, W.D., 2020. Antiangiogenic Activity and in Silico Cereblon Binding Analysis of Novel Thalidomide Analogs. *Molecules* 25(23).
- Petrakis, G., Veloza, L., Clot, G., Gine, E., Gonzalez-Farre, B., Navarro, A., Bea, S., Martinez, A., Lopez-Guillermo, A., Amador, V., Ribera-Cortada, I., Campo, E., 2019. Increased tumour angiogenesis in SOX11-positive mantle cell lymphoma. *Histopathology*.

- Piali, L., Hammel, P., Uherek, C., Bachmann, F., Gisler, R.H., Dunon, D., Imhof, B.A., 1995. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol* 130(2), 451-460.
- Poggi, A., Panzeri, M.C., Moretta, L., Zocchi, M.R., 1996. CD31-triggered rearrangement of the actin cytoskeleton in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 26(4), 817-824.
- Poggi, A., Prevosto, C., Catellani, S., Rocco, I., Garuti, A., Zocchi, M.R., 2010. Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology* 151(3), 252-264.
- Pott, C., Hoster, E., Delfau-Larue, M.H., Beldjord, K., Bottcher, S., Asnafi, V., Plonquet, A., Siebert, R., Callet-Bauchu, E., Andersen, N., van Dongen, J.J., Klapper, W., Berger, F., Ribrag, V., van Hoof, A.L., Trneny, M., Walewski, J., Dreger, P., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Kneba, M., Kluijn-Nelemans, H.C., Hermine, O., Macintyre, E., Dreyling, M., 2010. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood* 115(16), 3215-3223.
- Poveda, A., Garcia Del Muro, X., Lopez-Guerrero, J.A., Cubedo, R., Martinez, V., Romero, I., Serrano, C., Valverde, C., Martin-Broto, J., Geis, 2017. GEIS guidelines for gastrointestinal sarcomas (GIST). *Cancer Treat Rev* 55, 107-119.
- Privratsky, J.R., Newman, P.J., 2014. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res* 355(3), 607-619.
- Pysz, M.A., Foygel, K., Panje, C.M., Needles, A., Tian, L., Willmann, J.K., 2011. Assessment and monitoring tumor vascularity with contrast-enhanced ultrasound maximum intensity persistence imaging. *Invest Radiol* 46(3), 187-195.

- Qu, Z., Jiang, C., Wu, J., Ding, Y., 2016. Lenalidomide induces apoptosis and inhibits angiogenesis via caspase3 and VEGF in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep* 14(5), 4781-4786.
- Raedler, L., 2015. Velcade (Bortezomib) Receives 2 New FDA Indications: For Retreatment of Patients with Multiple Myeloma and for First-Line Treatment of Patients with Mantle-Cell Lymphoma. *Am Health Drug Benefits* 8(Spec Feature), 135-140.
- Randi, A.M., Sperone, A., Dryden, N.H., Birdsey, G.M., 2009. Regulation of angiogenesis by ETS transcription factors. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 6), 1248-1253.
- Raymond, E., Dahan, L., Raoul, J.L., Bang, Y.J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C., Valle, J., Metrakos, P., Smith, D., Vinik, A., Chen, J.S., Horsch, D., Hammel, P., Wiedenmann, B., Van Cutsem, E., Patyna, S., Lu, D.R., Blanckmeister, C., Chao, R., Ruzzniewski, P., 2011. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *The New England journal of medicine* 364(6), 501-513.
- Reinmuth, N., Fan, F., Liu, W., Parikh, A.A., Stoeltzing, O., Jung, Y.D., Bucana, C.D., Radinsky, R., Gallick, G.E., Ellis, L.M., 2002. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82(10), 1377-1389.
- Ria, R., Cirulli, T., Giannini, T., Bambace, S., Serio, G., Portaluri, M., Ribatti, D., Vacca, A., Dammacco, F., 2008. Serum levels of angiogenic cytokines decrease after radiotherapy in non-Hodgkin lymphomas. *Clinical and experimental medicine* 8(3), 141-145.
- Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A.M., Vacca, A., 2007. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia* 21(1), 44-52.

- Ribatti, D., Vacca, A., 2005. Therapeutic renaissance of thalidomide in the treatment of haematological malignancies. *Leukemia* 19(9), 1525-1531.
- Rich, L.J., Seshadri, M., 2016. Photoacoustic monitoring of tumor and normal tissue response to radiation. *Scientific reports* 6, 21237.
- Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J.F., Blade, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Dalton, W.S., Boral, A.L., Esseltine, D.L., Porter, J.B., Schenkein, D., Anderson, K.C., Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions, I., 2005. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 352(24), 2487-2498.
- Richter, J., Anupindi, V.R., Yeaw, J., Kudaravalli, S., Zavisic, S., Shah, D., 2021. Real-world treatment patterns in relapsed/refractory multiple myeloma: Clinical and economic outcomes in patients treated with pomalidomide or daratumumab. *J Oncol Pharm Pract*, 1078155221995532.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K., 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research* 43(7), e47.
- Robinson, S., Dreger, P., Caballero, D., Corradini, P., Geisler, C., Ghielmini, M., Le Gouill, S., Kimby, E., Rule, S., Vitolo, U., Dreyling, M., Hermine, O., European, M.C.L.N., the Lymphoma Working Party of the European Society for, B., Marrow, T., 2015. The EBMT/EMCL consensus project on the role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 29(2), 464-473.

- Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T.H., Fend, F., Jaffe, E.S., Quintanilla-Martinez, L., Raffeld, M., 2006. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 108(5), 1668-1676.
- Rule, S., Dreyling, M., Goy, A., Hess, G., Auer, R., Kahl, B., Hernandez-Rivas, J.A., Qi, K., Deshpande, S., Parisi, L., Wang, M., 2019. Ibrutinib for the treatment of relapsed/refractory mantle cell lymphoma: extended 3.5-year follow up from a pooled analysis. *Haematologica* 104(5), e211-e214.
- Rule, S., Jurczak, W., Jerkeman, M., Rusconi, C., Trneny, M., Offner, F., Caballero, D., Joao, C., Witzens-Harig, M., Hess, G., Bence-Bruckler, I., Cho, S.G., Thieblemont, C., Zhou, W., Henninger, T., Goldberg, J., Vermeulen, J., Dreyling, M., 2018. Ibrutinib versus temsirolimus: 3-year follow-up of patients with previously treated mantle cell lymphoma from the phase 3, international, randomized, open-label RAY study. *Leukemia* 32(8), 1799-1803.
- Sabattini, E., Bacci, F., Sagrmoso, C., Pileri, S.A., 2010. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica* 102(3), 83-87.
- Salaverria, I., Royo, C., Carvajal-Cuenca, A., Clot, G., Navarro, A., Valera, A., Song, J.Y., Woroniecka, R., Rymkiewicz, G., Klapper, W., Hartmann, E.M., Sujobert, P., Wlodarska, I., Ferry, J.A., Gaulard, P., Ott, G., Rosenwald, A., Lopez-Guillermo, A., Quintanilla-Martinez, L., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Siebert, R., Campo, E., Bea, S., 2013. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 121(8), 1394-1402.
- 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.
- Samaha, H., Dumontet, C., Ketterer, N., Moullet, I., Thieblemont, C., Bouafia, F., Callet-Bauchu, E., Felman, P., Berger, F., Salles, G., Coiffier, B., 1998. Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia* 12(8), 1281-1287.
- Sandoval-Sus, J.D., Faramand, R., Chavez, J., Puri, S., Parra, P., Sokol, L., Kharfan-Dabaja, M.A., Shah, B., Ayala, E., 2019. Allogeneic hematopoietic cell transplantation is potentially curative in mantle cell lymphoma: results from a single institution study. *Leukemia & lymphoma* 60(2), 309-316.
- Sanchez-Serrano, I., 2006. Success in translational research: lessons from the development of bortezomib. *Nature reviews. Drug discovery* 5(2), 107-114.
- Serini, G., Valdembri, D., Bussolino, F., 2006. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Experimental cell research* 312(5), 651-658.
- Seymour, J.F., Pfreundschuh, M., Trneny, M., Sehn, L.H., Catalano, J., Csiny, E., Moore, N., Coiffier, B., Investigators, M.S., 2014. R-CHOP with or without bevacizumab in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma: final MAIN study outcomes. *Haematologica* 99(8), 1343-1349.
- Sherman, E.J., Dunn, L.A., Schoder, H., Ho, A.L., Baxi, S.S., Ghossein, R.A., Haque, S.S., Sima, C., Tuttle, R.M., Pfister, D.G., 2019. Phase 2 study of vascular endothelial growth factor trap for the treatment of metastatic thyroid cancer. *Cancer* 125(17), 2984-2990.
- Singh, M., Couto, S.S., Forrest, W.F., Lima, A., Cheng, J.H., Molina, R., Long, J.E., Hamilton, P., McNutt, A., Kasman, I., Nannini, M.A., Reslan, H.B., Cao, T.C., Ho, C.C., Barck, K.H., Carano, R.A., Foreman, O., Eastham-Anderson, J., Jubb, A.M., Ferrara, N., Johnson, L.,

2012. Anti-VEGF antibody therapy does not promote metastasis in genetically engineered mouse tumour models. *The Journal of pathology* 227(4), 417-430.
- Siveen, K.S., Prabhu, K., Krishnankutty, R., Kuttikrishnan, S., Tsakou, M., Alali, F.Q., Dermime, S., Mohammad, R.M., Uddin, S., 2017. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges. *Curr Vasc Pharmacol* 15(4), 339-351.
- Sonpavde, G., Hutson, T.E., 2008. Novel antiangiogenic agents in the treatment of refractory renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 6 Suppl 1, S29-36.
- Stefoni, V., Pellegrini, C., Broccoli, A., Baldini, L., Tani, M., Cencini, E., Figuera, A., Ansuinelli, M., Bernocco, E., Cantonetti, M., Cox, M.C., Ballerini, F., Rusconi, C., Visco, C., Arcaini, L., Fama, A., Marasca, R., Volpetti, S., Castellino, A., Califano, C., Cavaliere, M., Gini, G., Liberati, A.M., Musuraca, G., Lucania, A., Ricciuti, G., Argnani, L., Zinzani, P.L., 2018. Lenalidomide in Pretreated Mantle Cell Lymphoma Patients: An Italian Observational Multicenter Retrospective Study in Daily Clinical Practice (the Lenamant Study). *The oncologist* 23(9), 1033-1038.
- 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.
- Sun, J., Paddock, C., Shubert, J., Zhang, H.B., Amin, K., Newman, P.J., Albelda, S.M., 2000. Contributions of the extracellular and cytoplasmic domains of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) in regulating cell-cell localization. *J Cell Sci* 113 (Pt 8), 1459-1469.
- Taskinen, M., Jantunen, E., Kosma, V.-M., Bono, P., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Leppä, S., 2010. Prognostic impact of CD31-positive microvessel density in follicular lymphoma

- patients treated with immunochemotherapy. *European Journal of Cancer* 46(13), 2506-2512.
- Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D., Bohlen, P., 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and biophysical research communications* 187(3), 1579-1586.
- Tiemann, M., Schrader, C., Klapper, W., Dreyling, M.H., Campo, E., Norton, A., Berger, F., Kluin, P., Ott, G., Pileri, S., Pedrinis, E., Feller, A.C., Merz, H., Janssen, D., Hansmann, M.L., Krieken, H., Moller, P., Stein, H., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Parwaresch, R., European, M.C.L.N., 2005. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *British journal of haematology* 131(1), 29-38.
- Toker, A., Cantley, L.C., 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387(6634), 673-676.
- Tomaszewski, M.R., Gehrung, M., Joseph, J., Quiros-Gonzalez, I., Disselhorst, J.A., Bohndiek, S.E., 2018. Oxygen-Enhanced and Dynamic Contrast-Enhanced Photoacoustic Tomography Provide Surrogate Biomarkers of Tumor Vascular Function, Hypoxia, and Necrosis. *Cancer research* 78(20), 5980-5991.
- Tonar, Z., Egger, G.F., Witter, K., Wolfesberger, B., 2008. Quantification of microvessels in canine lymph nodes. *Microsc Res Tech* 71(10), 760-772.
- Toumia, Y., Domenici, F., Orlanducci, S., Mura, F., Grishenkov, D., Trochet, P., Lacerenza, S., Bordi, F., Paradossi, G., 2016. Graphene Meets Microbubbles: A Superior Contrast Agent for Photoacoustic Imaging. *ACS Appl Mater Interfaces* 8(25), 16465-16475.

- Uddin, S., Hussain, A.R., Siraj, A.K., Manogaran, P.S., Al-Jomah, N.A., Moorji, A., Atizado, V., Al-Dayel, F., Belgaumi, A., El-Solh, H., Ezzat, A., Bavi, P., Al-Kuraya, K.S., 2006. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 108(13), 4178-4186.
- Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M., Perret, G.Y., 2004. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer research* 64(9), 2941-2955.
- Van Belle, E., Witzensbichler, B., Chen, D., Silver, M., Chang, L., Schwall, R., Isner, J.M., 1998. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 97(4), 381-390.
- Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausova, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D., McKendrick, J., Polikoff, J., Tellier, A., Castan, R., Allegra, C., 2012. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30(28), 3499-3506.
- Vegliante, M.C., Palomero, J., Perez-Galan, P., Roue, G., Castellano, G., Navarro, A., Clot, G., Moros, A., Suarez-Cisneros, H., Bea, S., Hernandez, L., Enjuanes, A., Jares, P., Villamor, N., Colomer, D., Martin-Subero, J.I., Campo, E., Amador, V., 2013. SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. *Blood* 121(12), 2175-2185.

- Vermeulen, P.B., Colpaert, C., Salgado, R., Royers, R., Hellemans, H., Van Den Heuvel, E., Goovaerts, G., Dirix, L.Y., Van Marck, E., 2001. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *The Journal of pathology* 195(3), 336-342.
- 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 : an international journal of pathology* 465(5), 587-597.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer* 2(7), 489-501.
- Voorhees, P.M., Orlowski, R.Z., 2006. The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 189-213.
- Vose, J.M., 2017. Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *American journal of hematology* 92(8), 806-813.
- Wang, E.S., Teruya-Feldstein, J., Wu, Y., Zhu, Z., Hicklin, D.J., Moore, M.A., 2004. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood* 104(9), 2893-2902.
- Wang, M.L., Rule, S., Martin, P., Goy, A., Auer, R., Kahl, B.S., Jurczak, W., Advani, R.H., Romaguera, J.E., Williams, M.E., Barrientos, J.C., Chmielowska, E., Radford, J., Stilgenbauer, S., Dreyling, M., Jodrzajczak, W.W., Johnson, P., Spurgeon, S.E., Li, L., Zhang, L., Newberry, K., Ou, Z., Cheng, N., Fang, B., McGreivy, J., Clow, F., Buggy, J.J., Chang, B.Y., Beaupre, D.M., Kunkel, L.A., Blum, K.A., 2013. Targeting BTK with

- ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* 369(6), 507-516.
- West, M.J., 2013. Tissue shrinkage and stereological studies. *Cold Spring Harb Protoc* 2013(3).
- Williams, M.E., Densmore, J.J., 2005. Biology and therapy of mantle cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 17(5), 425-431.
- Witzig, T.E., Nowakowski, G.S., Habermann, T.M., Goy, A., Hernandez-Ilizaliturri, F.J., Chiappella, A., Vitolo, U., Fowler, N., Czuczman, M.S., 2015. A comprehensive review of lenalidomide therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 26(8), 1667-1677.
- Xue, L., Huang, J., Zhang, T., Wang, X., Fu, J., Geng, Z., Zhao, Y., Chen, H., 2018. PTEN inhibition enhances angiogenesis in an in vitro model of ischemic injury by promoting Akt phosphorylation and subsequent hypoxia inducible factor-1alpha upregulation. *Metab Brain Dis* 33(5), 1679-1688.
- Yamada, Y., Matsushashi, N., Fujii, H., Makiyama, A., Iihara, H., Takahashi, T., Watanabe, D., Kiyama, S., Kobayashi, R., Suzuki, A., Yoshida, K., 2021. Impact of Anti-angiogenic Agents on Chemotherapy Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Second-line FOLFIRI Plus Bevacizumab or Aflibercept. *Anticancer Res* 41(1), 533-541.
- Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X., Rosenberg, S.A., 2003. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *The New England journal of medicine* 349(5), 427-434.
- Young, R.M., Staudt, L.M., 2013. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature reviews. Drug discovery* 12(3), 229-243.

- Zhang, X., Xu, L.-h., Yu, Q., 2010. Cell aggregation induces phosphorylation of PECAM-1 and Pyk2 and promotes tumor cell anchorage-independent growth. *Molecular Cancer* 9(1), 7.
- Zhao, X., Lwin, T., Silva, A., Shah, B., Tao, J., Fang, B., Zhang, L., Fu, K., Bi, C., Li, J., Jiang, H., Meads, M.B., Jacobson, T., Silva, M., Distler, A., Darville, L., Zhang, L., Han, Y., Rebatchouk, D., Di Liberto, M., Moscinski, L.C., Koomen, J.M., Dalton, W.S., Shain, K.H., Wang, M., Sotomayor, E., Tao, J., 2017. Unification of de novo and acquired ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Nature communications* 8, 14920.
- Zhou, Y., Chen, H., Tao, Y., Zhong, Q., Shi, Y., 2021. Minimal Residual Disease and Survival Outcomes in Patients with Mantle Cell Lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer* 12(2), 553-561.
- Zhou, Z., Christofidou-Solomidou, M., Garlanda, C., DeLisser, H.M., 1999. Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis* 3(2), 181-188.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D., Giaccia, A.J., 2000. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 14(4), 391-396.

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace vztahující se k tématu disertace:

1. **Vockova P**, Molinsky J, Klanova M, Karban J, Spacek M, Havranek O, Kupcova K, Kazantsev D, Trneny M, Klener P. ***CD31/PECAM-1 impacts engraftment, growth and spread of mantle cell lymphoma cells and positively correlates with extramedullary involvement.*** Leuk Lymphoma. 2021 Apr;62(4):861-867. doi: 10.1080/10428194.2020.1849678. Epub 2020 Nov 25. PMID: 33238780. (IF = 3,3)
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 Jan 14:S0301-5629(20)30566-4. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.12.010 (IF = 3,0)

Ostatní:

1. Schmitt A, Xu W, Bucher P, Grimm M, Konantz M, Horn H, Zapukhlyak M, Berning P, Brändle M, Jarboui MA, Schönfeld C, Boldt K, Rosenwald A, Ott G, Grau M, Klener P, **Vockova P**, Lengerke C, Lenz G, Schulze-Osthoff K, Hailfinger S. ***Dimethyl fumarate induces ferroptosis and impairs NF- κ B/STAT3 signaling in DLBCL.*** Blood. 2021 Apr 19:blood.2020009404. doi: 10.1182/blood.2020009404. (IF = 22,1)

2. Pola R, Pokorná E, **Vočková P**, Böhmová E, Pechar M, Karolová J, Pankrác J, Šefc L, Helman K, Trněný M, Etrych T, Klener P. ***Cytarabine nanotherapeutics with increased stability and enhanced lymphoma uptake for tailored highly effective therapy of mantle cell lymphoma.*** Acta Biomater. 2021 Jan 1;119:349-359. doi: 10.1016/j.actbio.2020.11.014. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33186784. (IF = 8,9)
3. Lidický O, Klener P, Machová D, **Vočková P**, Pokorná E, Helman K, Mavis C, Janoušková O, Etrych T. ***Overcoming resistance to rituximab in relapsed non-Hodgkin lymphomas by antibody-polymer drug conjugates actively targeted by anti-CD38 daratumumab.*** Control Release. 2020 Dec 10;328:160-170. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.08.042. Epub 2020 Aug 27. PMID: 32860930. (IF = 9,8)
4. **Vockova P**, Svaton M, Karolova J, Pokorna E, Vokurka M, Klener P. ***Anti-CD38 Therapy With Daratumumab for Relapsed/Refractory CD20-Negative Diffuse Large B-Cell Lymphoma.*** Folia Biol (Praha). 2020;66(1):17-23. (IF = 0,9)
5. Prukova D, Andera L, Nahacka Z, Karolova J, Svaton M, Klanova M, Havranek O, Soukup J, Svobodova K, Zemanova Z, Tuskova D, Pokorna E, Helman K, Forsterova K, Pacheco-Blanco M, **Vockova P**, Berkova A, Fronkova E, Trneny M, Klener P. ***Cotargeting of BCL2 with Venetoclax and MCL1 with S63845 Is Synthetically Lethal In Vivo in Relapsed Mantle Cell Lymphoma.*** Clin Cancer Res. 2019 Apr 19. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3275. (IF = 12,5)

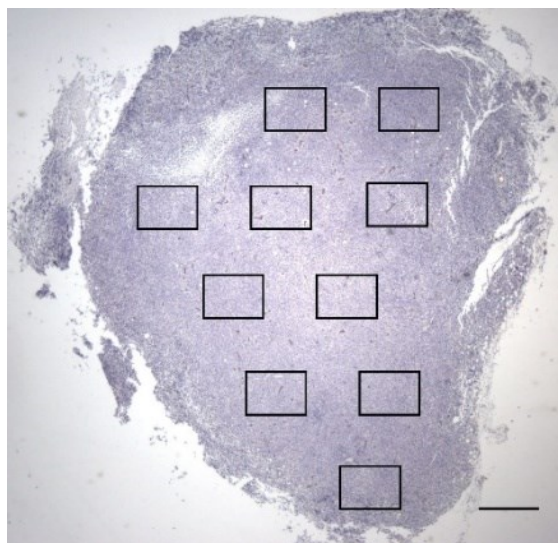
6. Erdmann T, Klener P, Lynch JT, Grau M, **Vočková P**, Molinsky J, Tuskova D, Hudson K, Polanska UM, Grondine M, Mayo M, Dai B, Pfeifer M, Erdmann K, Schwammbach D, Zapukhlyak M, Staiger AM, Ott G, Berdel WE, Davies BR, Cruzalegui F, Trneny M, Lenz P, Barry ST, Lenz G. ***Sensitivity to PI3K and AKT inhibitors is mediated by divergent molecular mechanisms in subtypes of DLBCL.*** Blood. 2017 Feb 15. pii: blood-2016-12-758599. doi: 10.1182/blood-2016-12-758599. (IF = 15.1)
7. Maswabi BC, Molinsky J, Savvulidi F, Zikmund T, Prukova D, Tuskova D, Klanova M, **Vockova P**, Lateckova L, Sefc L, Zivny J, Trneny M, Klener P. ***Hematopoiesis in patients with mature B-cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement.*** Haematologica. 2017 Apr;102(4):e152-e155. doi: 10.3324/haematol.2016.151571. Epub 2017 Jan 5. (IF = 9.1)
8. Klanova M, Soukup T, Molinsky J, Lateckova L, **Vockova P**, Alam M, Zivny J, Trneny M, Klener P. ***Single-agent cytarabine is insufficient for the treatment of human mantle cell lymphoma in mouse xenograft model.*** Neoplasma. 2016 Jul 29;63(5). doi: 10.4149/neo_2016_515. (IF = 1.9)
9. Molinsky J, Maswabi B, Prukova D, Klanova M, **Vockova P**, Zikmund T, Savvulidi F, Alam M, Sefc L, Vokurka M, Obrtlikova P, Trneny M, Klener P Jr. ***Significantly higher numbers of proB cells in healthy Caucasians compared to Asians: Is there association with incidence of CLL?*** Blood Cells Mol Dis. 2016 Mar;57:118-9. doi: 10.1016/j.bcmd.2015.12.001. Epub 2015 Dec 2. (IF = 1.9)

10. Czuczman NM, Barth MJ, Gu J, Neppalli V, Mavis C, Frys SE, Hu Q, Liu S, Klener P, Vockova P, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri FJ. ***Pevedistat, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, is active in mantle cell lymphoma and enhances rituximab activity in vivo.*** Blood. 2016 Mar 3;127(9):1128-37. doi: 10.1182/blood-2015-04-640920. Epub 2015 Dec 16. (IF = 13.2)
11. Klanova M, Andera L, Soukup J, Svadlenka J, Benesova S, Brazina J, Prukova D, Vejmelkova D, Jaksá R, Helman K, Vockova P, Lateckova L, Molinsky J, Maswabi B, Alam M, Kodet R, Pytlík R, Trneny M, Klener P Jr. ***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. 2015 Oct 14. (IF = 9.6)
12. Lorkova L, Scigelova M, Arrey TN, Vit O, Pospisilova J, Doktorova E, Klanova M, Alam M, Vockova P, Maswabi B, Klener P Jr, Petrak J. ***Detailed Functional and Proteomic Characterization of Fludarabine Resistance in Mantle Cell Lymphoma Cells.*** PLoS One. 2015 Aug 18. (IF = 4.4)
13. Vocka M, Langer D, Petrtyl J, Vockova P, Hanus T, Kalousova M, Zima T, Petruzelka L. ***Trefoil factor family (TFF) proteins as potential serum biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer.*** Neoplasma. 2015 Apr 13. (IF = 2.0)
14. Otáhal P, Průková D, Král V, Fabry M, Vočková P, Latečková L, Trněný M, Klener P. ***Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells.*** Oncoimmunology. 2015 Dec 3. (IF = 3.5)

15. Klanova M, Lorkova L, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, **Vockova P**, Mavis C, Lateckova L, Kulvait V, Vejmekova D, Jaksá 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. (IF = 4.2)
16. Klanova M, Soukup T, Jaksá R, Molinsky J, Lateckova L, Maswabi BCL, 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. (IF = 3.4)

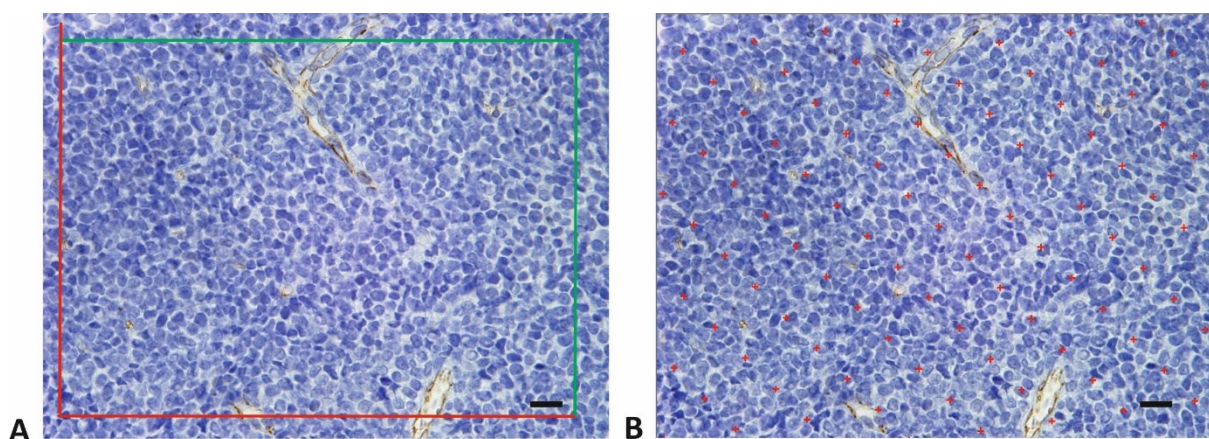
PŘÍLOHY

Doplňkový obrázek S1



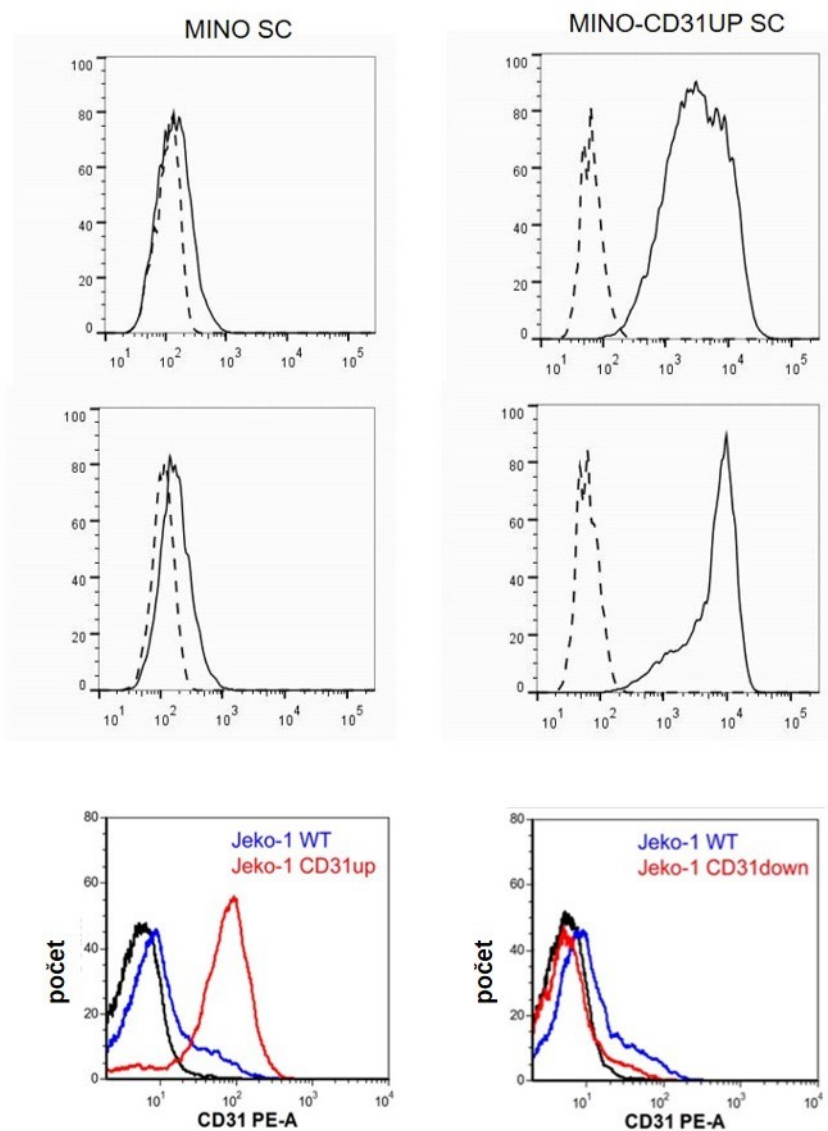
Vzorkování mikrosnímků. Obdélníky demonstrují deset mikrofotografií odebraných z referenčního prostoru tumoru na každém sklíčku. Vzdálenosti mezi mikrofotografiemi byly udržovány konstantní v konkrétním řezu, aby byl poskytnut reprezentativní vzorek celé plochy průřezu. Měřítka 500 μm .

Doplňkový obrázek S2



Kvantifikace nádorové hustoty mikrocév, MVD (A) a mikrocévní oblasti, MVA (B) v tumoru pomocí CD31 pozitivních mikrovaskulárních profilů (hnědé zbarvení) na PDX modelu lymfomu z plášťových buněk. Pro MVD (A) byly použity neobjektivní čtecí rámce. Pro odhady MVA (B) byla použita stereotaktická bodová síť. Měřítka 20 μm .

Doplňkový obrázek S3



Expresí CD31 měřená průtokovou cytometrií na MCL buňkách získaných z podkožních tumorů. U linie MINO je izotypová kontrola zobrazena histogramem s přerušovanou čarou a CD31 exprese pak nepřerušovaně. U JEKO1 reprezentuje modrý histogram JEKO1 (bez manipulace exprese CD31), červené histogramy reprezentují klony se změněnou expresí CD31 a černé histogramy pak izotypové kontroly.

Doplňková tabulka S1. Seznam transkriptů rozdílně exprimovaných v *in vitro* vzorcích s upregulací VEGFA ve srovnání se vzorky bez upregulace, kde $p < 0,05$ a alespoň dvojnásobná změna byly považovány za signifikantní.

ID	Označení genu	t-statistika	p (přízůsobeno)	násobek změny
ENSG00000112715	VEGFA	18,70	0,00001	21,25
ENSG00000159399	HK2	8,25	0,01868	2,16
ENSG00000115548	KDM3A	8,22	0,01868	2,16
ENSG00000162433	AK4	8,15	0,01868	5,48
ENSG00000137507	LRRC32	7,78	0,02029	4,13
ENSG00000168209	DDIT4	7,75	0,02029	2,29
ENSG00000154975	CA10	-7,47	0,02418	0,03
ENSG00000122884	P4HA1	7,39	0,02418	2,43
ENSG00000196968	FUT11	6,99	0,03600	2,40
ENSG00000140945	CDH13	-6,86	0,03906	0,04
ENSG00000152256	PDK1	6,77	0,03993	2,30
ENSG00000105784	RUNDC3B	-6,61	0,04551	0,04
ENSG00000135925	WNT10A	6,20	0,06329	4,06
ENSG00000237550		6,16	0,06329	60,04
ENSG00000137959	IFI44L	-6,15	0,06329	0,25
ENSG00000183508	TENT5C	6,15	0,06329	2,54
ENSG00000129521	EGLN3	6,13	0,06329	2,06
ENSG00000117289		5,93	0,06547	1,81
ENSG00000183230	CTNNA3	-5,93	0,06547	0,18
ENSG00000168542	COL3A1	-5,92	0,06547	0,05
ENSG00000059804	SLC2A3	5,92	0,06547	2,45
ENSG00000145416	MARCHF1	5,88	0,06547	2,58
ENSG00000186352	ANKRD37	5,87	0,06547	2,55
ENSG00000114268	PFKFB4	5,84	0,06547	2,56
ENSG00000205057	CLUU1-AS1	-5,81	0,06547	0,06
ENSG00000019505	SYT13	-5,80	0,06547	0,05
ENSG00000000005	TNMD	-5,80	0,06547	0,06
ENSG00000134216	CHIA	-5,75	0,06742	0,05
ENSG00000133816	MICAL2	-5,70	0,06920	0,06
ENSG00000247095	MIR210HG	5,67	0,06920	3,03
ENSG00000166897	ELFN2	5,65	0,06920	3,97
ENSG00000165092	ALDH1A1	-5,63	0,06920	0,09
ENSG00000172380	GNG12	-5,62	0,06920	0,06
ENSG00000149972	CNTN5	-5,61	0,06920	0,06
ENSG00000175899	A2M	-5,55	0,07176	0,06
ENSG00000152268		-5,55	0,07176	0,05
ENSG00000164796	CSMD3	-5,52	0,07295	0,04
ENSG00000144642	RBMS3	-5,35	0,09241	0,07
ENSG00000113739	STC2	5,33	0,09241	4,25
ENSG00000147256	ARHGAP36	-5,22	0,10658	0,06
ENSG00000272870	SAP30-DT	5,20	0,10658	2,55
ENSG00000169136	ATF5	5,19	0,10658	1,83
ENSG00000154864	PIEZO2	-5,09	0,12265	0,09

Doplňková tabulka S1 (pokračování)

ID	Označení genu	t-statistika	p (přizpůsobeno)	násobek změny
ENSG00000137965	IFI44	-5,06	0,12623	0,19
ENSG00000132122	SPATA6	-4,98	0,13498	0,08
ENSG00000003249	DBNDD1	-4,97	0,13498	0,26
ENSG00000089169	RPH3A	-4,96	0,13498	0,07
ENSG00000134460	IL2RA	4,95	0,13498	2,44
ENSG00000247556	OIP5-AS1	4,92	0,13498	1,74
ENSG00000164849	GPR146	4,91	0,13498	2,39
ENSG00000118785	SPP1	4,91	0,13498	1,85
ENSG00000185532	PRKG1	-4,90	0,13498	0,08
ENSG00000138395	CDK15	-4,90	0,13498	0,08
ENSG00000127324	TSPAN8	-4,86	0,13940	0,08
ENSG00000231890	DARS1-AS1	4,86	0,13940	2,22
ENSG00000091490	SEL1L3	4,84	0,13940	1,56
ENSG00000124942	AHNAK	4,84	0,13940	1,82
ENSG00000197358	BNIP3P1	4,81	0,14011	2,57
ENSG00000065618	COL17A1	-4,80	0,14011	0,10
ENSG00000138119	MYOF	-4,78	0,14011	0,12
ENSG00000119950	MXI1	4,78	0,14011	1,73
ENSG00000170959	DCDC1	-4,76	0,14011	0,06
ENSG00000006459	KDM7A	4,76	0,14011	2,01
ENSG00000085831	TTC39A	-4,75	0,14011	0,06
ENSG00000248098	BCKDHA	4,75	0,14011	12,97
ENSG00000237686	SCIRT	4,72	0,14011	3,06
ENSG00000170044	ZPLD1	-4,72	0,14011	0,09
ENSG00000141526	SLC16A3	4,72	0,14011	2,07
ENSG00000260231	KDM7A-DT	4,71	0,14011	2,34
ENSG00000125414	MYH2	-4,71	0,14011	0,06
ENSG00000078098	FAP	-4,69	0,14306	0,08
ENSG00000121769	FABP3	-4,67	0,14341	0,31
ENSG00000183098	GPC6	-4,66	0,14341	0,08
ENSG00000137766	UNC13C	-4,66	0,14341	0,10
ENSG00000018236	CNTN1	-4,61	0,15148	0,10
ENSG00000196091	MYBPC1	-4,61	0,15148	0,07
ENSG00000185774	KCNIP4	-4,60	0,15148	0,09
ENSG00000126856	PRDM7	-4,60	0,15148	0,10
ENSG00000162598	C1orf87	-4,57	0,15546	0,07
ENSG00000172296	SPTLC3	-4,56	0,15576	0,36
ENSG00000166349	RAG1	-4,55	0,15763	0,29
ENSG00000157601	MX1	-4,53	0,16013	0,56
ENSG00000187398	LUZP2	-4,52	0,16018	0,06
ENSG00000078114	NEBL	-4,51	0,16097	0,13
ENSG00000150893	FREM2	-4,49	0,16490	0,09
ENSG00000176171	BNIP3	4,47	0,16888	1,73

Doplňková tabulka S1 (pokračování)

ID	Označení genu	t-statistika	p (přizpůsobeno)	násobek změny
ENSG00000186480	INSIG1	4,37	0,17945	1,56
ENSG00000152377	SPOCK1	-4,37	0,17945	0,09
ENSG00000104327	CALB1	-4,37	0,17945	0,14
ENSG00000168959	GRM5	-4,36	0,17945	0,08
ENSG00000134333	LDHA	4,35	0,18063	1,45
ENSG00000235568	NFAM1	-4,35	0,18063	0,18
ENSG00000134243	SORT1	-4,34	0,18063	0,49
ENSG00000087258	GNAO1	-4,33	0,18067	0,07
ENSG00000186472	PCLO	-4,33	0,18067	0,11
ENSG00000225489		4,33	0,18067	2,44
ENSG00000135766	EGLN1	4,31	0,18272	1,67
ENSG00000115593	SMYD1	-4,31	0,18272	0,09
ENSG00000162551	ALPL	-4,30	0,18352	0,08
ENSG00000104112	SCG3	-4,29	0,18352	0,08
ENSG00000120498	TEX11	-4,29	0,18352	0,09
ENSG00000196586	MYO6	-4,24	0,19754	0,11
ENSG00000136546	SCN7A	-4,23	0,19754	0,12
ENSG00000225698	IGHV3-72	4,23	0,19830	3,29
ENSG00000052802	MSMO1	4,21	0,20311	1,60
ENSG00000134326	CMPK2	-4,16	0,21881	0,15
ENSG00000229344	MTCO2P12	-4,15	0,22130	0,65
ENSG00000144560	VGLL4	4,13	0,22483	1,56
ENSG00000170525	PFKFB3	4,13	0,22483	1,59
ENSG00000261158		4,11	0,22939	2,21
ENSG00000257303		-4,07	0,24283	0,17
ENSG00000048540	LMO3	4,06	0,24775	3,61
ENSG00000107679	PLEKHA1	4,05	0,24873	1,75
ENSG00000104765	BNIP3L	3,99	0,27441	1,57
ENSG00000166415	WDR72	-3,98	0,27543	0,11
ENSG00000174145	NWD2	-3,96	0,28332	0,12
ENSG00000066032	CTNNA2	-3,96	0,28332	0,13
ENSG00000152670	DDX4	-3,94	0,28825	0,12

Doplňková tabulka S2. Seznam transkriptů rozdílně exprimovaných v *in vivo* vzorcích s upregulací VEGFA ve srovnání se vzorky bez upregulace, kde $p < 0,05$ a alespoň dvojnásobná změna byly považovány za signifikantní.

- *Vzhledem k délce umístěna na web:*

<https://lymphoma-lab.lf1.cuni.cz/kovarikovadizertacedoplnkova-tabulka-s2>

PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU DISERTACE