

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



***Význam antiangiogenní terapie u lymfomu z pláštěvých buněk***

*The Role of Antiangiogenic Therapy in Mantle Cell Lymphoma*

**MUDr. Petra Kovaříková**

**Praha, 2021**

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK

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

Disertační práce bude nejméně 5 pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty UK.

**OBSAH**

<b>OBSAH .....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>5</b>
<b>HYPOTÉZY A CÍLE STUDIE.....</b>	<b>7</b>
<b>METODY .....</b>	<b>8</b>
<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>10</b>
<b>DISKUZE.....</b>	<b>26</b>
<b>ZÁVĚRY STUDIE.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERENCE.....</b>	<b>32</b>
<b>SEZNAM PUBLIKACÍ .....</b>	<b>35</b>

**ABSTRAKT**

Lymfom z pláštěvých 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 pláštěvých 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.

**ABSTRACT**

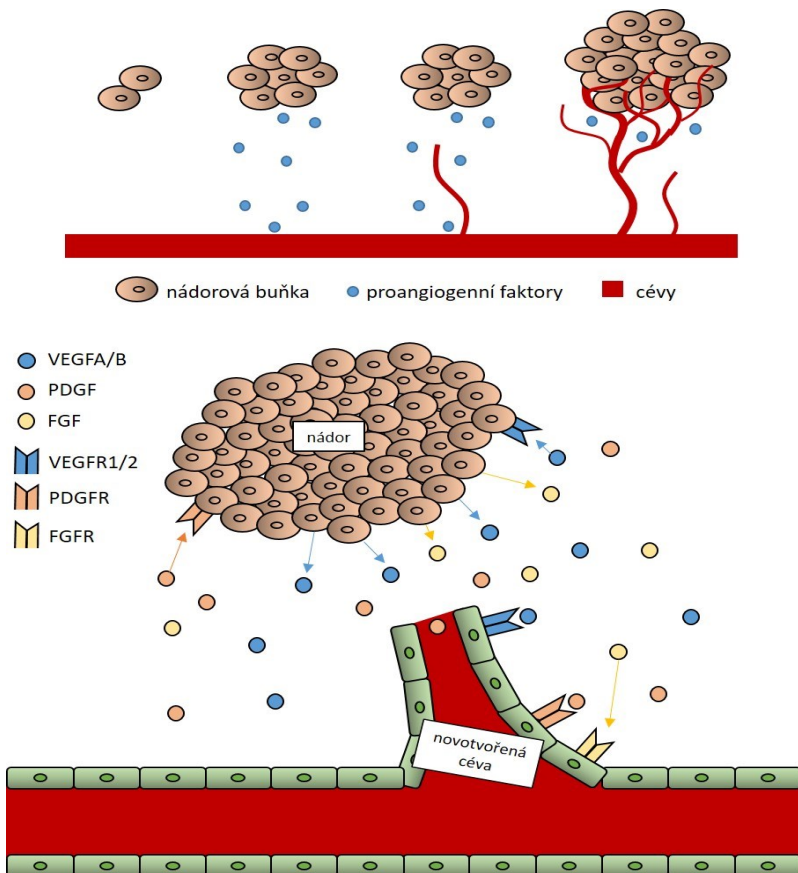
Mantle cell lymphoma (MCL) is a subtype of B-non-Hodgkin's lymphoma, characterized by often relapses. Despite an Ibrutinib (a Bruton's kinase inhibitor) implementation into salvage therapy, these patients often relaps with biologically highly aggressive disease and very poor prognosis. An increased activation 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.

## ÚVOD

Angiogeneze je nezbytnou součástí růstu tumoru. Základním mechanismem angiogeneze je tzv. angiogeneze pučením (Obrázek 1). Během přechodu z avaskulární do vaskulární fáze se projevuje účinek hypoxie doprovázený zvýšením a stabilizací HIF-1 $\alpha$ , který stimuluje expresi proangiogenních faktorů. Mezi nimi má nejvýznamnější proangiogenní efekt VEGFA.



**Obrázek 1. 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.

Na rozdíl od solidních nádorů víme velmi málo o roli angiogeneze v biologickém chování u hematologických malignit (leukémie, lymfom) a také o potenciálním

## ÚVOD

využití inhibice angiogeneze při jejich léčbě. U lymfomu z pláštových buněk byla popsána pozitivní korelace mezi stupněm vaskulární denzity a biologickou agresivitou lymfomu (vyšší proliferační aktivita a vyšší mezinárodní prognostický index pro MCL) (Ria et al., 2008; Vesela et al., 2014).

Antigen CD31 je široce používán jako endoteliální marker při určování mikrovaskulární denzity tumoru. Zvýšená exprese CD31 však byla také detekována na povrchu maligních lymfocytů (Akers et al., 2010; Boyd et al., 2009). Význam tohoto zjištění však zatím nebyl zkoumán. Několik studií uvádí, že CD31/PECAM-1 inhibuje mitochondriální cestu apoptózy a stimuluje růst nádorových buněk a jejich anoikis rezistenci (Gao et al., 2003; Poggi et al., 2010; Zhang et al., 2010). V roce 2013 jsme ukázali, že přihojení a růst buněk MCL u imunodeficientních myší je spojen s upregulací CD31 *in vivo* (Molinsky et al., 2013).

V roce 2003 Salven et al. popsal, že simultánní elevace VEGFA a FGF je prediktivní faktor špatné prognózy u pacientů s NHL (vyšší koncentrace v plazmě korelovaly s kratším celkovým přežitím) (Salven et al., 2000). Podobně nárůst sérových hladin VEGFA byl pozorován u pacientů s transformací indolentního lymfomu do agresivního DLBCL (Kuramoto et al., 2002). Po selhání studie MAIN v roce 2014 (Seymour et al., 2014), se již nikdo znovu nepokusil začlenit protilátku anti-VEGFA bevacizumab do standardní terapie lymfomů v jiné kombinaci než s režimem R-CHOP, přestože je bevacizumab široce používá u solidních tumorů v kombinační terapii, aniž by pacienti vykazovali zvýšený výskyt kardiotoxicity.

Podle dosavadních výsledků hraje VEGFA nepochybně důležitou roli v lymfomogenezi a představuje tak velmi slibný cíl pro léčbu agresivních lymfom

## 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:

Expese 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**

Byly použity buněčné linie lymfomu z pláštěvých buněk: JEKO1, HBL-2 a MINO.

### **Klony s manipulovanou expresí CD31**

Od linie JEKO1 a MINO byly pomocí systému pUNO1-hPECAM1 (InvivoGen; selekce blasticidinem) odvozeny klony s nadměrnou expresí (overexpresí) CD31. Klon se sníženou expresí (downregulací) CD31 byl odvozen od linie JEKO1 s použitím lentivirových partikulí CD31/PECAM-1 Human GIPZ Lentiviral shRNA Particles (Thermo Fisher Scientific; selekce puromycinem).

### **Klony se stabilní overexpresí VEGFA**

Pro vytvoření klonů HBL-2 a JEKO1 se stabilní overexpresí VEGFA byl použit Sleeping beauty transposon systém. VEGFA cDNA (OriGene) byla amplifikována a výsledný produkt vložen do pSBbi-Pur plasmidu (Addgene). 4 µg tohoto plasmidu bylo následně koelektroporováno s 6 µg savčího expresního plasmidu kódující transposázu (pCMV(CAT)T7-SB100, Addgene), díky níž byl vnesený gen pro VEGFA inkorporován do genomu a klon následně selektován Puromycinem. Analogicky byly vytvořeny kontrolní klony.

### **Modely xenotransplantátů odvozených od pacienta (PDX modely)**

Všechny PDX modely použité pro náš výzkum byly odvozeny od primárních (patientských) buněk v naší laboratoři na Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK v Praze. 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**

Jako pokusná zvířata byly použity imunodeficientní NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ myši. 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. Stejně množství buněk bylo použito i pro intravenózní (IV) aplikaci cestou ocasní žíly.

Myši určené k terapii bevacizumabem byly od 5. dne po xenotransplantaci léčeny 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 myšim SC injikovány klony VEGF-UP a jejich odpovídající kontroly („EMPTY“).

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.

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.

## METODY

Před ultrazvukovým vyšetřením byla myším provedena anestezie IP aplikací ketamin/xylazinu v dávce 80/10 mg/kg (Bioveta a.s.) a lokálně oholeny (Strep).

### **Vysokofrekvenční *in vivo* ultrasonografie a fotoakustické zobrazení**

Ultrasonografické a fotoakustické zobrazování bylo provedeno ve spolupráci Ing. Peterem Kešou v Centru pokročilého preklinického zobrazování (CAPI). Anatomické a molekulární zobrazení bylo prováděno za použití multimodálního zobrazovacího přístroje Vevo 3100/LAZR-X (ultrasonografie-fotoakustika; USG-PA) (FUJIFILM VisualSonics). K zobrazování byla použita lineární ultrazvuková sonda Mx400 (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Kanada). Všechna získaná USG-PA data byla dále zpracována softwarem Vevo LAB V.3.2.5. (FUJIFILM VisualSonics). Objemy tumorů v mm<sup>3</sup> byly určeny volumetrickou analýzou. Hodnoty saturace kyslíku v tkáních sO<sub>2</sub> Vital (%) a procento vaskularizace tumoru (%) byly získány z objemové analýzy nádoru ve třech časových bodech. Hodnota celkové oxygenace tumoru (sO<sub>2</sub> Total) byla pro každý tumor stanovená ze všech pixelů v jednotlivých 2D řezech včetně černých pixelů (černé pixely mají hodnotu 0%).

### **Měření proliferace *in vitro***

Vliv CD31 up- a downregulace na buněčnou proliferaci *in vitro* byl hodnocen pomocí WST8 WST8-based Quick Cell Proliferation Assay Kit (BioVision). 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).

### **ELISA**

Hladina lidského VEGFA (hVEGFA) v lyzátech SC tumorů byla změřena pomocí kitu Quantikine® ELISA – Human VEGF Immunoassay (R&D Systems) na přístroji Sunrise (Tecan Group Ltd).

### **Průtoková cytometrie (FCM)**

Všechny experimenty využívající pacientské tkáň 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. Byly použity následující fluorochrom-konjugované monoklonální protilátky: CD5 PerCP-Cy5.5, CD19 PE-Cy7, CD31 FITC, CD45 Krome Orange. MCL buňky byly charakterizovány koexpresí CD19 a CD5 (CD19+CD5+). Všechny vzorky byly analyzovány na přístroji FACS Canto (BD) nebo Navios (Beckman Coulter). Výsledky měření byly vyhodnoceny v systému Kaluza software, verze 2.1 (Beckman Coulter).

### **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). Endotel byl vizualizován pomocí imunohistochemického králičího anti-myšího CD31 monoklonálního IgG, klon SP38

## VÝSLEDKY

(ThermoFisher Scientific). Ke kvantifikaci nádorových cév bylo použito dvou parametrů – mikrovaskulární denzita (MVD) a mikrovaskulární oblast (MVA).

### Transkriptomová sekvenace Next Generation Sequencing

Transkriptomová analýza byla provedena v duplikátech z buněk pěstovaných jak *in vitro*, tak *in vivo* na buňkách JEKO1 a JEKO1 VEGF-UP. Celková RNA byla izolována kitem RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Vzorky RNA byly následně sekvenovány v Childhood Leukaemia Investigation Prague (CLIP) na sekvenačním přístroji NextSeq 500 (Illumina) 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

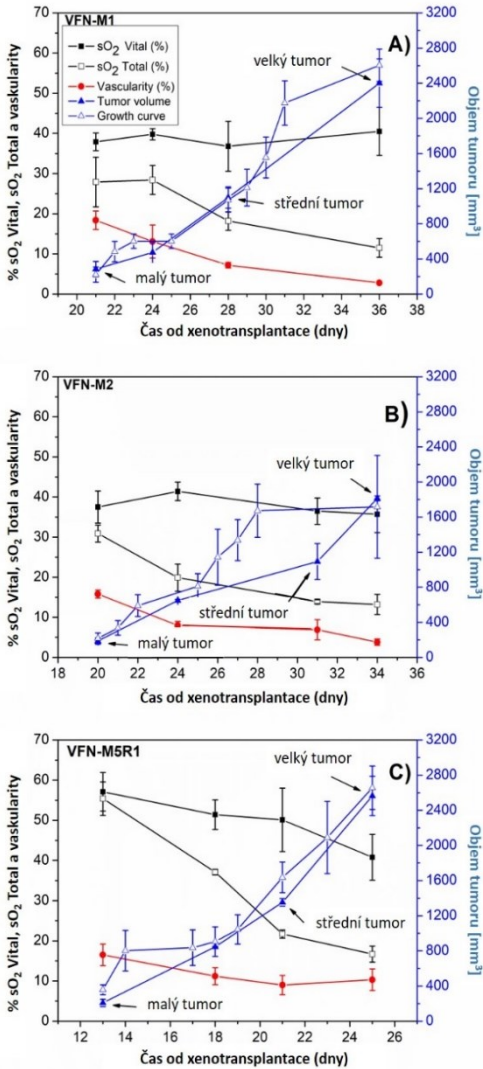
Kombinovaný přístup fotoakustického monitorování saturace kyslíkem v tkáních a ultrazvukového dopplerovského zobrazování umožňuje neinvazivní prostorové stanovení okysličených a nekrotických oblastí a perfúzi tumoru v reálném čase. V této studii byly použity tři PDX modely MCL, konkrétně VFN-M1 (3 myši), 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 2A). 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 2B). 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 2C). Buňky VFN-M5R1 se přihojily a dorostly velikosti tumoru cca  $250 \text{ mm}^3$  signifikantně dříve (D+13) než VFN-M1 (D+21) a VFN-M2 (D+20).

Ve srovnání s VFN-M5R1 (Obrázek 3) byly nádory VFN-M1 i VFN-M2 výrazně méně okysličené a měly několik jasně rozeznatelných nekrotických oblastí již u malých nádorů (Obrázek 4). 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).

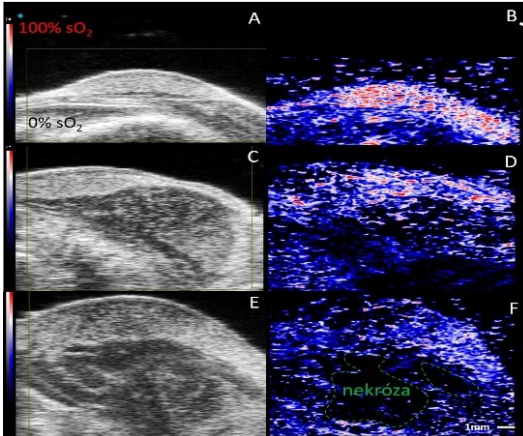
## VÝSLEDKY

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 2;  $P = 0,00329$ ). Naproti tomu vývoj vaskularizace u VFN-M5R1 byl složitější, s počátečním poklesem (ve stadiu středně velkých nádorů) následovaným terminálním zvýšením (ve stádiu velkých nádorů).



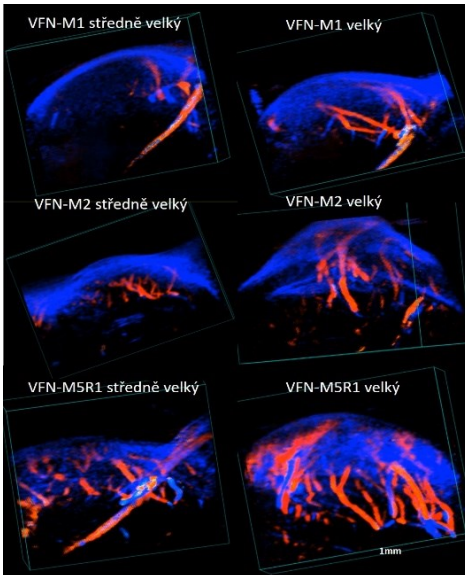
**Obrázek 2. Grafická prezentace změn hypoxie, vaskularizace a objemu tumoru v čase u PDX modelů VFN-M1 (A), VFN-M2 (B) a VFN-M5R1 (C).** Hypoxie tumoru byla stanovena jako saturace kyslíku sO<sub>2</sub> Vital (plně černé čtverce), celková oxygenace tumoru včetně nekrotických oblastí sO<sub>2</sub> Total (prázdné černé čtverce), a % mikrovaskulární oblasti tumoru získané barevným doplerovským měřením (plně červené kružky). Objemy tumoru byly získány ultrazvukovou volumetrickou analýzou (plně modré trojúhelníky) a růstové křivky tumorů byly počítány ze tří na sebe kolmých rozměrů změřených digitálním posuvným měřítkem (prázdné modré trojúhelníky).

## VÝSLEDKY



**Obrázek 3. 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 4. 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.**

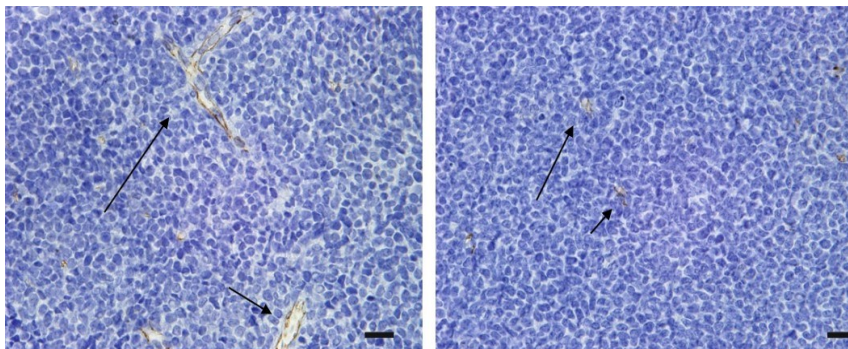
**Tabulka 1.** Průměrné hodnoty a standardní odchyly  $sO_2$  Vital (%),  $sO_2$  Total (%) and MVA (%) získané metodou UZ-PAI u modelů VFN-M1, VFN-M2 and VFN-M5R1 ve 3 časových bodech růstu tumorů. Spočítané hodnoty P: 0,80459 ( $sO_2$  Vital); 0,04134 ( $sO_2$  Total); 0,00329 (MVA)

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 ultrazukovými nálezy**

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

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



**Obrázek 5. 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 20um.**

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

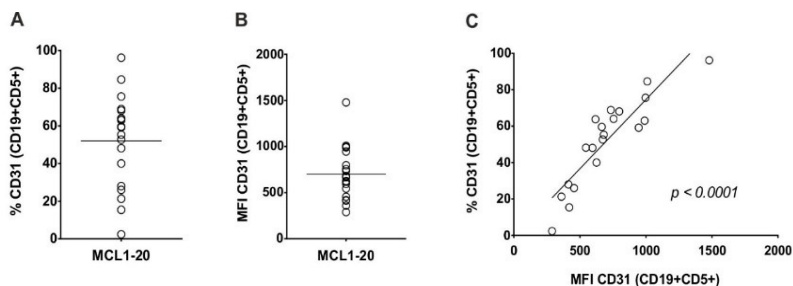
PDX model	Velikost tumoru	Hustota mikrocév (MVD) (cévní profily / mm <sup>2</sup> )	Oblast mikrocév (MVA) (%)
VFN-M1	malý	88 ± 3,3	6,8 ± 0,2
VFN-M1	velký	87 ± 6,5	4,8 ± 0,3
VFN-M2	malý	101,4 ± 8,8	8,0 ± 0,7
VFN-M2	velký	98,1 ± 3,6	8,6 ± 0,6
VFN-M5R1	malý	66,3 ± 3,6	6,9 ± 0,5
VFN-M5R1	velký	110,2 ± 7,7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

### Exprese CD31 na povrchu CD19+CD5+ MCL buněk

Provedli jsme analýzu exprese CD31 na povrchu primárních CD19+CD5+ MCL buněk získaných z kostní dřeně (BM) pacientů s novou diagnózou MCL. Exprese CD31 na povrchu CD19+CD5+ MCL buněk byla detekovatelná u všech patientských vzorků kostní dřeně, nicméně procento pozitivity 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 6A, B). Procento CD31+ buněk korelovalo s CD31 MFI ( $r = 0,8959$ ,  $p < 0,0001$ ; Obrázek 6C). Mezi expresí CD31 a mezinárodním prognostickým indexem pro MCL (MIPI) 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 pozitivity i MFI bylo v periferní krvi a v kostní dřeni byly srovnatelné.

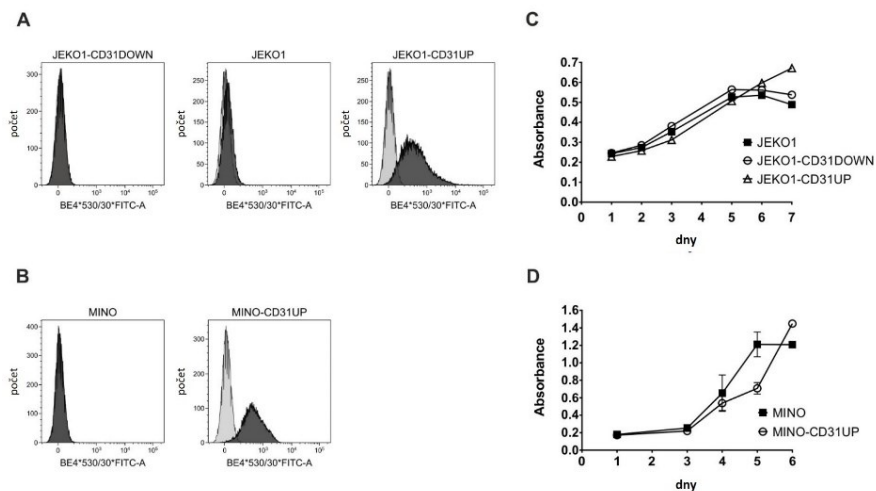


**Obrázek 6.** Exprese CD31 na povrchu CD19+CD5+ lymfocytů v KD získané od pacientů s novou diagnózou MCL; (A) % CD31+CD19+CD5+ buněk, medián % = 57,25; (B) MFI CD31+CD19+CD5+ buněk, medián MFI = 669,5; (C) MFI korelovalo s procentem pozitivních buněk ( $r = 0,8959$ ,  $p < 0,0001$ )

### Vytvoření klonů s manipulovanou expresí CD31

Nedávno jsme ukázali, že CD31 je upregulována *in vivo* při přihojování většiny testovaných MCL linií v imunodeficientních myškách (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 7A, 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 7A). *In vitro* overexprese ani downregulace CD31 neovlivňuje proliferaci buněk (obrázek 7C, D).

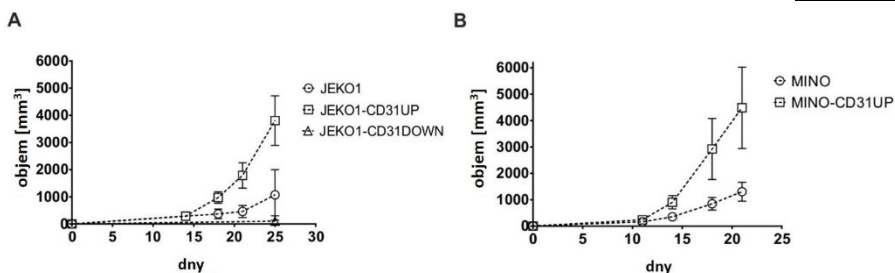




**Obrázek 7.** Buněčné linie JEKO1 a MINO a jejich příslušné klony s transgenní expresí CD31: (A, B) povrchová exprese CD31 (FCM) reprezentována tmavě šedými histogramy, světle šedé histogramy zobrazují histogramy izotypových kontrol; (C, D) srovnání *in vitro* proliferací

### CD31 ovlivňuje přijetí a růst MCL linií *in vivo*

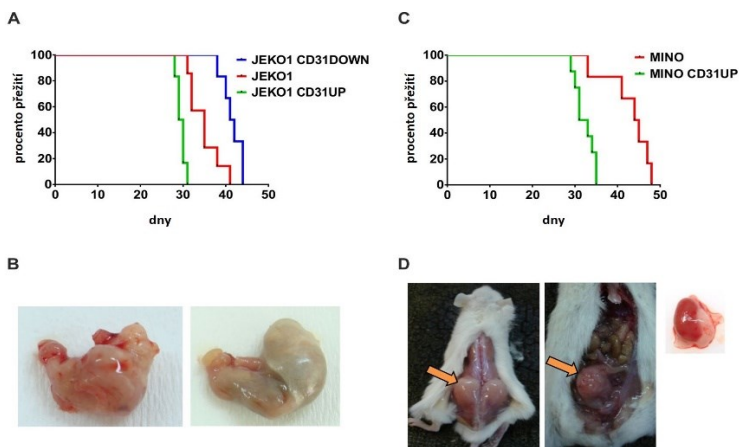
Zatímco *in vitro* nebyla rychlost proliferace významně odlišná mezi CD31 manipulovanými buněčnými liniemi ve srovnání s původními (Obrázek 7C, D), *in vivo* jsme pozorovali výrazné změny rychlosti přijetí a růstu SC tumorů. Xenotransplantace klonálních buněk JEKO1-CD31UP a MINO-CD31UP vedla k signifikantně zrychlenému růstu nádoru ve srovnání s kontrolami (Obrázek 8). Trvalé zachování overexprese CD31 na přijetých MCL buňkách byla potvrzena *ex vivo* průtokovou cytometrií. Naopak narušení upregulace CD31 při přijetí trvalou CD31-downregulací v klonálních buňkách JEKO1-CD31DOWN bylo spojeno se zhoršeným přijetím a zpomaleným růstem odpovídajících xenotransplantátů MCL (Obrázek 8A). Přijetí štěpu bylo detekováno pouze u 2 z 8 myši injikovaných JEKO1-CD31DOWN, přičemž i tyto dva tumory rostly pomaleji ve srovnání s kontrolami.



**Obrázek 8.** 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

### Exprese CD31 koreluje s přežitím systémově (IV) xenotransplantovaných myší

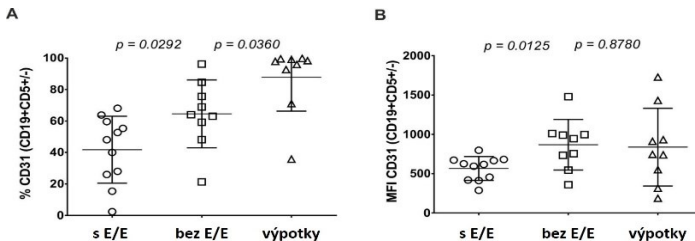
Přežití myší xenotransplantovaných MCL buňkami s transgenní overexpresí CD31 bylo významně kratší ve srovnání s myšmi injikovanými buňkami příslušných parentálních buněčných linií. Medián přežití myší JEKO1-CD31UP dosáhl 29,5 dne ve srovnání se 41,5 dny JEKO1-CD31DOWN ( $p = 0,0006$ , Obrázek 9A). Medián přežití MINO-CD31UP byl 32 dnů, u MINO WT dosáhl 44,5 dnů ( $p = 0,003$ , Obrázek 9C). 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 vyvinulo E/E masy, 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. 25 %) myší IV injikovaných MINO (Obrázek 9B,D). Infiltrace tkání MCL buňkami byla potvrzena IHC analýzou.



**Obrázek 9.** Křivky přežití myši 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.

### Exprese CD31 je asociována s E/E postižením u pacientů s MCL

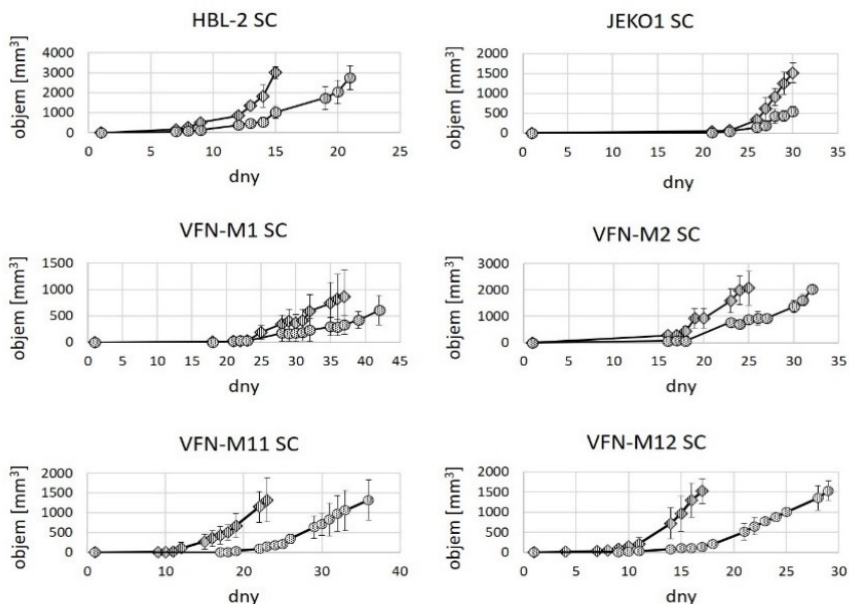
Na základě výsledků myších experimentů jsme analyzovali potenciální korelaci exprese antigenu CD31 na MCL buňkách získaných z kostní dřeně pacientů s novou diagnózou MCL, kteří vykazovali E/E postižení. Intenzita exprese i procento pozitivita CD31 na povrchu CD19+CD5+ MCL buněk byly signifikantně vyšší u pacientů s E/E postižením ve srovnání s pacienty bez E/E šíření detekovaným dle CT nebo PET-CT (průměrná MFI 868,3 +/- 107,0 u E/E a 566,7 +/- 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 1, Obrázek 10). 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 +/- 164,8 versus 868,3 +/- 107,0 s  $p = 0,88$ ; procento 97,9 % versus 64,0 %,  $p = 0,036$ ) (Obrázek 10).



**Obrázek 10.** 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 anti-lymfomový efekt byl pozorován u PDX modelů odvozených od pacientů po selhání ibrutinibu (Obrázek 11).



	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 11. Růstové křivky porovnávají vývoj bevacizumabem léčených (kosočtverec) a neléčených (kroužky) 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 potlačoval růst tumorů.

### **Bevacizumab nezabraňuje systémovému šíření podkožních MCL tumorů**

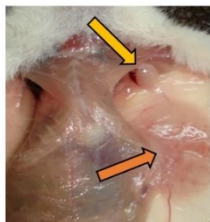
Obecně se uznává, že angiogeneze podporuje šíření tumoru a metastazování (Cigrovski Berkovic et al., 2016; Ishigami et al., 1998; Khademi et al., 2014; Li et al., 2004). Navzdory pozorované inhibici VEGFA-závislého lokálního růstu podkožních MCL nádorů bylo u obou skupin (neléčených i bevacizumabem léčených) myší pozorováno šíření lymfomu formou vzdálených metastáz s tvorbou tumorů imitujících lymfatické uzliny nebo makroskopicky patrná infiltrace myších orgánů (především jater a sleziny) (Obrázek 12).

**A**

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

**Obrázek 12. 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 myši VFN-M2 a VFN-M11 léčených bevacizumabem.

**B** VFN-M2 SC

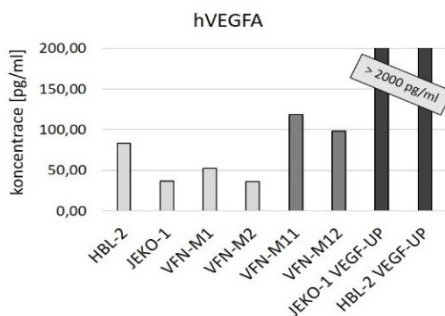


VFN-M11 SC



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

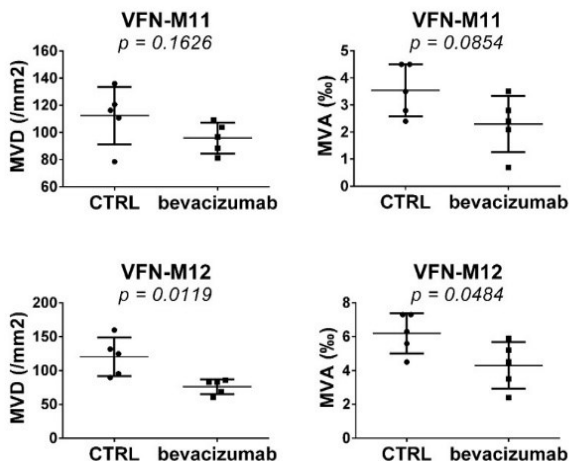
Předpokládali jsme, že rozdíly v antilymfomovém účinku bevacizumabu pozorované *in vivo* na myších modelech mohou korelovat s hladinou lidského VEGFA (hVEGFA) secernovaného v tumoru MCL buňkami. Hladiny hVEGFA byly zjišťovány metodou ELISA v lyzátech podkožních tumorů získaných od neléčených myši (50 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 13).



**Obrázek 13.** 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 a změnami genové exprese v MCL buňkách

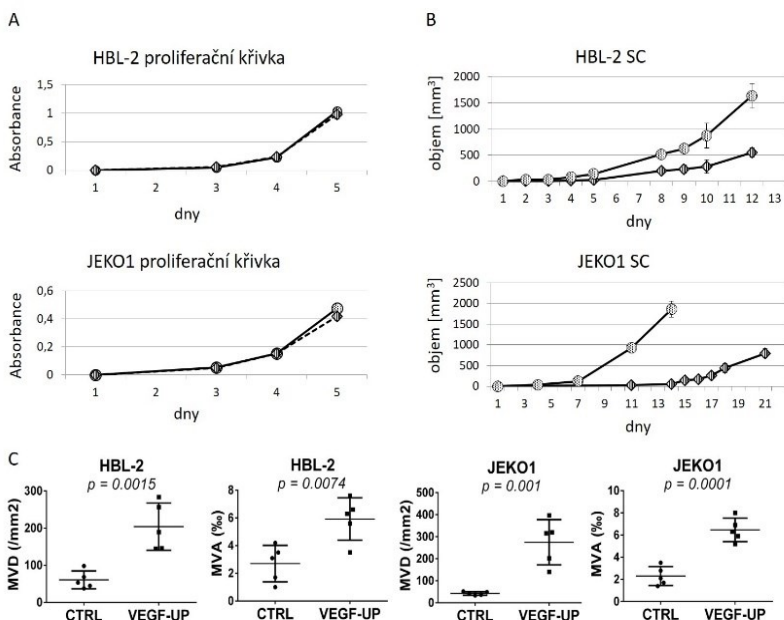
IHC analýza tumorů získaných z myší léčených bevacizumabem a z neléčených myší odhalily významně nižší MVD a MVA v bevacizumab-rezistentních tumorech ve srovnání s kontrolními tumory (Obrázek 14).



**Obrázek 14.** 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 vykazuje trend.

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

Abychom mohli blíže prozkoumat vliv VEGFA na přijetí, 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 výraznou akcentaci agresivních biologických projevů VEGFA-upregulovaných klonů ve srovnání s původními liniemi. Podkožně xenotransplantované klony se projevovaly promptním přijetím a rychlým invazivním růstem (Obrázek 15A, B). IHC analýza potvrdila vysokou MDV a MVA tumorů se stabilní upregulací VEGFA ve srovnání s příslušnými kontrolními tumory (Obrázek 15C). Naše data tedy ukazují na jasnou korelaci mezi hladinou VEGFA a rozsahem neovaskularizace u MCL.



**Obrázek 15. A – Proliferační křivky JEKO1 a HBL-2:** Zvýšení exprese VEGFA nemá prakticky žádný efekt na proliferaci MCL buněk *in vitro* (kontrolní buňky = kosočtverce, klony VEGF-UP = kroužky). **B – Růstové křivky tumorů JEKO1 a HBL-2:** Významný efekt upregulace VEGFA se projeví *in vivo* urychlením přihojení a růstu tumorů SC injikovaných myši (VEGF-UP = kolečka, kontrolní tumory = kosočtverce). **C – Grafy porovnávající MVD a MVA:** Oba parametry jsou statisticky signifikantně vyšší u VEGF-upregulovaných klonů.

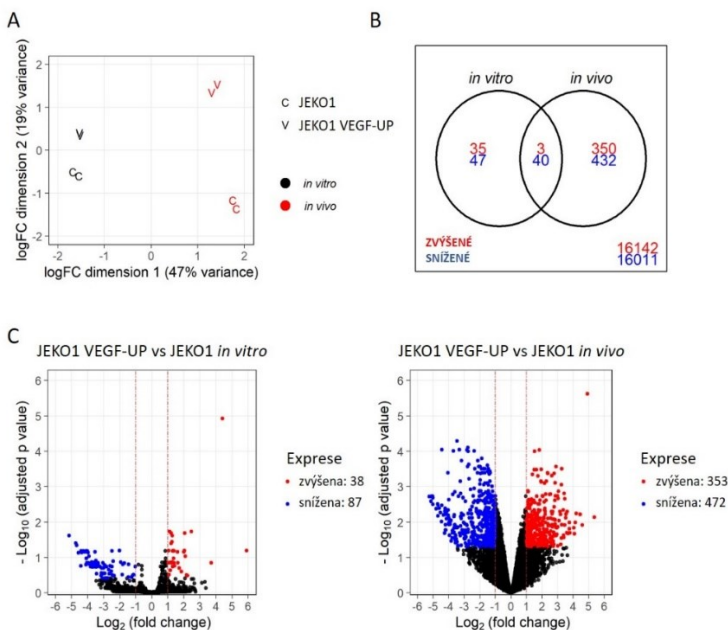
### Změny transkriptomu MCL buněk vyvolané transgenní overexpresí VEGFA a prostředím (srovnání *in vitro* versus *in vivo*)

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 identifikováno 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

## VÝSLEDKY

(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 $\alpha$  signalizace cestou NF- $\kappa$ B, mTORC1 signalizace, angiogeneze, androgenní odpovědi a řady dalších. *In vitro* bylo též pozorováno snížení transkripce řady genových setů, např. metabolismu xenobiotik, INF- $\alpha$  a INF- $\gamma$  odpovědi. *In vivo* dochází vlivem zvýšené exprese VEGFA mimo jiné též ke zvýšení exprese TNF $\alpha$  signalizace cestou NF- $\kappa$ B a hypoxie, ale také metabolismu xenobiotik, jehož transkripce je *in vitro* snižena. *In vivo* naopak dochází ke snížení transkripce mTORC1 signalizace a odpovědi na androgeny, které jsou *in vitro* zvýšeny (Tabulka 5).



**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, snižené exprimované pak modře.**



**VÝSLEDKY**

**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 (přízpusobeno)	Násobek změny	
				in vitro	in vivo
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 STATS 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<sup>3</sup>) až po velké (přibližně 1500 mm<sup>3</sup>) 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 mm<sup>3</sup>) 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>) a tedy i měřenou saturaci (Greening et al., 2018), což vyžaduje použití kombinovaných roztoků ketamin/xylazin. Další metodou, kterou lze pro analýzu saturace O<sub>2</sub> 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 modalit (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 mm<sup>3</sup>) a střední (přibližně 1000 mm<sup>3</sup>) 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 O<sub>2</sub> 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 nanoplatforem 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 dřene (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 myšního 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 myši 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, předlěčených 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.



**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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Cigrovski Berkovic, M., Cacev, T., Catela Ivkovic, T., Marout, J., Ulamec, M., Zjadic-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.
- Dadgar, S., Troncso, J.R., Rajaram, N., 2018. Optical spectroscopic sensing of tumor hypoxia. *J Biomed Opt* 23(6), 1-6.
- Durduran, T., Choe, R., Baker, W.B., Yodh, A.G., 2010. Diffuse Optics for Tissue Monitoring and Tomography. *Rep Prog Phys* 73(7).
- Gallay, N., Anani, L., Lopez, A., Colombat, P., Binet, C., Domenech, J., Weksler, B.B., Malavasi, F., Herauld, 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.
- 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.
- 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.
- Ishigami, S.I., Ariei, 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., Yoroze, K., Kurasawa, M., Yanagisawa, M., Sugimoto, M., Yamamoto, K., 2019. Sustained effect of continuous treatment with bevacizumab following bevacizumab in

## REFERENCE

- combination with chemotherapy in a human ovarian clear cell carcinoma xenograft model. *Oncol Rep* 42(3), 1057-1065.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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*.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rich, L.J., Seshadri, M., 2016. Photoacoustic monitoring of tumor and normal tissue response to radiation. *Scientific reports* 6, 21237.

## **REFERENCE**

- 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.
- 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.
- Seymour, J.F., Pfreundschuh, M., Trneny, M., Sehn, L.H., Catalano, J., Csinady, 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.
- 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., Jubbs, 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.
- Tomaszewski, M.R., Gehrung, M., Joseph, J., Quiros-Gonzalez, I., Disselhorst, J.A., Bohndiek, S.E., 2018. Oxygen-Enhanced and Dynamic Contrast-Enhanced Optoacoustic Tomography Provide Surrogate Biomarkers of Tumor Vascular Function, Hypoxia, and Necrosis. *Cancer research* 78(20), 5980-5991.
- 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.
- 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.
- West, M.J., 2013. Tissue shrinkage and stereological studies. *Cold Spring Harb Protoc* 2013(3).
- 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.

## 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- $\kappa$ 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. (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, Obrtlíkova 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. (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. **Pevonedistat, 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. (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, Vejmelkova 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 B, 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.**

**SEZNAM PUBLIKACÍ**

Lab Invest. 2014 Jul;94(7):806-17. doi: 10.1038/labinvest.2014.61. Epub 2014 May 26. (IF = 3,4)