

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Dominika Tokárová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



**Abnormality genu *MYC* u pacientů s mnohočetným
myelomem**

Bakalářská práce

Dominika Tokárová

Studijní obor: Biologie

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Mgr. Jana Balcárková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Dominika TOKÁROVÁ**
Osobní číslo: **R21757**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Abnormality genu MYC u pacientů s mnohočetným myelomem**
Zadávatel katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění terminálních vývojových stadií B-lymfocytů – plazmatických buněk. MM je charakterizován řadou cytogenetických změn, které se vyskytují v průběhu celého onemocnění, některé změny jsou spojeny se vznikem nádorové buňky (primární změny), jiné se vyskytují až v průběhu onemocnění (sekundární změny). Abnormality protoonkogenu *MYC* na dlouhém rameni chromosomu B(8q24.1) jsou považovány za sekundární změny spojené s progresí onemocnění a jejich prognostický význam není zcela jasný.

Detekce cytogenetických změn v plazmatických buňkách je obtížná, proto se využívá metody FICTION (imunofluorescenční detekce plazmatických buněk a následná fluorescenční *in situ* hybridizace) a hodnotí se pouze patologické buňky.

Cíle bakalářské práce:

1. Seznámení se s chodem laboratoře a základními principy vyšetření cytogenetických změn metodami FISH a FICTION.
2. Vypracování literárního přehledu o MM a cytogenetických změnách se zaměřením na abnormality genu *MYC*.
3. Retrospektivní a prospektivní vyšetření genu *MYC* metodou FICTION v souboru pacientů s MM diagnostikovaných a léčených na Hemato-onkologické klinice FNOL.
4. Zhodnocení nalezených změn genu *MYC* v souboru pacientů s MM.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Pospíšilová D, Dvořáková D, Mayer J, et al: Molekulární hematologie, Galén, 2013
2. Procházka M, Vodička R, Vrtěl R, et al: Základy lékařské genetiky pro studující všeobecného lékařství. Univerzita Palackého v Olomouci, 2018.
3. Sharma N, Smadbeck JB, Abdallah N, Zepeda-Mendoza C, Binder M, Pearce KE, Asmann YW, Peterson JF, Ketterling RP, Greipp PT, Bergsagel PL, Rajkumar SV, Kumar SK, Baughn LB. The Prognostic Role of MYC Structural Variants Identified by NGS and FISH in Multiple Myeloma. Clin Cancer Res. 2021 Oct 1;27(19):5430-5439.4.
4. Misund K, Keane N, Stein CK, Asmann YW, Day G, Welsh S, Van Wier SA, Riggs DL, Ahmann G, Chesi M, Viswanatha DS, Kumar SK, Dispenzieri A, Gonzalez-Calle V, Kyle RA, O'Dwyer M, Rajkumar SV, Kortüm KM, Keats JJ: MMRF CoMMpass Network; Fonseca R, Stewart AK, Kuehl WM, Braggio E, Bergsagel PL. MYC dysregulation in the progression of multiple myeloma. Leukemia. 2020 Jan;34(1):322-326.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jana Balcárková, Ph.D.**
Hemato-onkologická klinika

Datum zadání bakalářské práce: 23. března 2023
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2023

Bibliografické údaje + SOUHRN

Jméno a příjmení autora: Dominika Tokárová

Název práce: Abnormality genu *MYC* u pacientů s mnohočetným myelomem

Typ práce: bakalářská práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PŘF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Jana Balcárková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Abstrakt:

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium abnormalit genu *MYC* v souboru 35 pacientů s mnohočetným myelomem diagnostikovaných na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci. Mnohočetný myelom je nádorové onemocnění plazmatických buněk, které je charakteristické množstvím cytogenetických abnormalit. Mezi primární cytogenetické změny patří hyperdiploidie a chromozomální translokace *IgH* genu. S progresí onemocnění jsou spojovány sekundární změny, například změny v genu *MYC*. Cytogenetické změny jsou u mnohočetného myelomu hůře detekovatelné obvyklými cytogenetickými postupy, proto se používá metoda FICTION. Touto metodou byly analyzovány numerické a strukturní abnormality genu *MYC* lokalizovaného na 8q24.21. Vyšetření bylo provedeno v době diagnózy a v progresi či relapsu onemocnění. Bylo zjištěno, že 66 % pacientů mělo abnormalitu genu *MYC* již jako primární změnu v době diagnózy. Mezi nejčastější aberace genu *MYC* patřily nejen translokace, zejména t(8;14), delece a duplikace, ale také početní změny chromozomu 8.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, FICTION, gen *MYC*, plazmocyt, translokace, duplikace

Počet stran: 51

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification + SUMMARY

Author's first name and surname: Dominika Tokárová

Title: Abnormalities of *MYC* gene in patients with multiple myeloma

Type of thesis: bachelor thesis

Department: Department of cell biology and genetics, FoS UP Olomouc

Supervisor: Mgr. Jana Balcárková, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Abstract:

This bachelor thesis is focused on *MYC* gene abnormalities in 35 patients with multiple myeloma diagnosed and treated at the Department of Hemato-Oncology, University Hospital Olomouc. Multiple myeloma is a malignant plasma cell disease characterized by cytogenetic aberrations. Primary cytogenetic abnormalities are hyperdiploidy and chromosomal translocations of *IgH* gene. Disease progression or relapse are accompanied by secondary chromosomal aberrations including *MYC* abnormalities. Cytogenetic changes in multiple myeloma are difficult to detect by usual cytogenetic methods, so the FICTION method was used for analysis. Using this method, numerical and structural abnormalities of *MYC* gene localized at 8q24.21 were analysed. Examination was performed at the time of diagnosis at progression or relapse. *MYC* gene aberration as primary abnormality at the time of diagnosis was found in 66 % of patients. The most common changes of *MYC* gene were not only translocations, especially t(8;14), deletions and duplications, but also numerical changes of chromosome 8.

Keywords: multiple myeloma, FICTION, *MYC* gene, plasmocyte, translocation, duplication

Number of pages: 51

Number of appendices: 0

Language: czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jany Balcárkové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

.....

Dominika Tokárová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Janě Balcárkové, Ph.D. za její odborné vedení, velmi cenné rady, čas a laskavý přístup v průběhu práce na bakalářské práci. Také bych chtěla poděkovat kolektivu Cytogenomické laboratoře na Hemato-onkologické klinice FNOL za příjemný přístup a pomoc při práci v laboratoři.

Tato práce byla podporována grantem MZ ČR – RV(FNOI,00098892).

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Hematopoéza	3
3.1.1 Vývoj B-lymfocytu	3
3.1.2 Monoklonální protilátka	4
3.2 Kancerogeneze	5
3.2.1 Vznik nádorové buňky	5
3.3 Mnohočetný myelom	5
3.3.1 Epidemiologie	6
3.3.2 Symptomy	6
3.3.3 Diagnostika a stádia MM	6
3.3.4 Léčba	7
3.4. Cytogenetické změny u MM	7
3.4.1 Monozomie/delece chromozomu 13	9
3.4.2 Abnormality chromozomu 1	9
3.4.3 Delece krátkých ramen chromozomu 17	10
3.5 Onkogen <i>MYC</i>	10
3.6 Abnormality genu <i>MYC</i>	10
3.6.1 Translokace	11
3.6.2 Zmnožení	12
3.6.3 Amplifikace	13
3.6.4 Delece	13
3.6.5 Mutace	13
3.7 Cytogenetika	14
3.7.1 Základy cytogenetiky	14
3.7.2 FISH	14
3.7.3 MACS	15
3.7.4 FACS	16
3.7.5 FICTION	16
4 MATERIÁL A METODY	17
4.1 Zpracování vzorků pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření	17

4.1.1 Biologický materiál	17
4.1.2 Použité chemikálie a roztoky	17
4.1.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	17
4.1.4 Pracovní postup	18
4.2 Metoda FISH	19
4.2.1 Biologický materiál	19
4.2.2 Použité chemikálie a roztoky	19
4.2.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	20
4.2.4 Pracovní postup	20
4.2.5 Vyhodnocení	21
4.3 Metoda FICTION.....	21
4.3.1 Biologický materiál	21
4.3.2 Použité chemikálie a roztoky	21
4.3.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.3.4 Pracovní postup	23
4.3.5 Vyhodnocení	29
4.4 Separace CD 138+ buněk u MM	29
4.4.1 Biologický materiál	29
4.4.2 Vyhodnocení	30
5 VÝSLEDKY	31
5.1 Retrospektivní a prospektivní vyšetření genu <i>MYC</i>	31
5.2 Přehled abnormalit genu <i>MYC</i> v souboru pacientů.....	33
5.3 Translokace zahrnující gen <i>MYC</i>	33
5.4 Retrospektivní analýza primárních a sekundárních abnormalit genu <i>MYC</i>	35
5.5 Korelace dalších cytogenetických abnormalit se změnami v genu <i>MYC</i>	37
5.6 Srovnání různých sond u pacientů s delecí/duplikací genu <i>MYC</i>	38
6 DISKUZE.....	40
7 ZÁVĚR	44
8 LITERATURA.....	45

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

CRAB	hyperkalcémie, renální selhání, anémie, kostní léze (hypercalcemia, renal failure, anemia, bone disease)
DD	doba diagnózy
EMM	extramedulární mnohočetný myelom (extramedullary multiple myeloma)
FACS	fluorescenčně aktivované třídění buněk (fluorescence activated cell sorting)
FICTION	imunofluorescenční fenotypování buněk (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasms)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
Ig lokus	imunoglobulinový lokus
IgH	těžký řetězec imunoglobulinu
<i>IgK</i>	lehký řetězec imunoglobulinu kappa
<i>IgL</i>	lehký řetězec imunoglobulinu lambda
KD	kostní dřev
LDH	laktát dehydrogenáza
MACS	magneticky aktivované třídění buněk (magnetic activated cell sorting)
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance)
MM	mnohočetný myelom (multiple myeloma)
p	krátké rameno chromozomu
PB	plazmatická buňka
q	dlouhé rameno chromozomu
R-ISS	Revidovaný mezinárodní systém

SMM	doutnající myelom (smoldering myeloma)
t	translokace
β_2m	beta-2-mikroglobulin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vývoj B-lymfocytu.....	4
Obrázek 2: Schématické zobrazení monoklonální protilátky	5
Obrázek 3: Cytogenetické změny u MM.....	8
Obrázek 4: Normální nález pro gen <i>MYC</i> v PB (2 fúzní signály).....	11
Obrázek 5: PB s translokací t(8;14) (2 fúzní signály, zelený signál pro gen <i>IgH</i> , červený pro gen <i>MYC</i>)	12
Obrázek 6: PB s přestavbou genu <i>MYC</i> (oddělený červený a zelený signál)	12
Obrázek 7: Amplifikace genu <i>MYC</i> v PB (metoda FICTION).....	13
Obrázek 8: Schéma metody FISH.....	15
Obrázek 9: Genové mapy zobrazující vyšetřovanou oblast genu <i>MYC</i> sondami XL MYC BA (A), XL MYC AMP (B) a XL MYC BA Triple-color (C).....	26
Obrázek 10: Genová mapa zobrazující vyšetřovanou oblast genů <i>MYC</i> , <i>IgK</i> a <i>IgL</i>	27
Obrázek 11: Genová mapa zobrazující vyšetřovanou oblast genu <i>MYC</i> a <i>IgH</i>	27
Obrázek 12: Genová mapa zobrazující vyšetřovanou oblast genu <i>MYC</i> a <i>IgL</i>	28
Obrázek 13: Genová mapa zobrazující vyšetřovanou oblast genu <i>MYC</i> a <i>IgK</i>	28
Obrázek 14: Postup retrospektivního vyšetření pacientů s abnormalitami genu <i>MYC</i>	31

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Počet vyšetření odběrů KD provedených u pacientů s abnormalitami genu <i>MYC</i>	32
Graf 2: Abnormality genu <i>MYC</i> u souboru pacientů s MM	33
Graf 3: Přehled translokačních partnerů genu <i>MYC</i>	34
Graf 4: Abnormality genu <i>MYC</i> u pacientů s t(8;14)	34
Graf 5: Zastoupení primárních a sekundárních změn u genu <i>MYC</i>	37
Graf 6: Zastoupení dalších genetických aberací u souboru pacientů s abnormalitou <i>MYC</i>	37
Graf 7: Zastoupení abnormalit 1q21 u souboru pacientů s abnormalitou <i>MYC</i>	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Faktory k určení stádia MM pomocí R-ISS	7
Tabulka 2: Genetické abnormality u MM.....	9
Tabulka 3: Souhrn použitých genových sond pro vyšetření abnormalit genu <i>MYC</i>	25
Tabulka 4: Souhrnná tabulka pacientů s abnormalitami genu <i>MYC</i>	32
Tabulka 5: Procentuální zastoupení abnormalit genu <i>MYC</i> u pacientů s MM (v 1. až 4. odběru).....	36
Tabulka 6: Srovnání výsledků zjištěných sondami od výrobců Zytovision a MetaSystems u pacientů s abnormalitou genu <i>MYC</i>	39

1 ÚVOD

Neoplazie je nově vytvořený shluk buněk, který roste odlišně od normálních buněk, protože se vymyká kontrolním mechanismům. Takové buňky reagují jen na vlastní růstové faktory a ignorují signály okolních buněk a tkání. Mezi nádory z plazmatických buněk patří i mnohočetný myelom (MM) (Mačák *et* Mačáková, 2022). U MM dochází k maligní změně B-lymfocytu a vzniká patologická plazmatická buňka. Následným vývojem se mění na zralé myelomové buňky, které jsou téměř nesmrtelné. Tento vývoj probíhá v germinálním centru uzliny, a následně v kostní dřeni (Adam *et al.*, 1999).

MM tvoří asi 1 % nádorů a 10 % všech hematologických malignit. Onemocnění má lehce vyšší výskyt u mužů než u žen. Zároveň se vyskytuje častěji u afroamerické než u bělošské populace (Rajkumar, 2022).

Pro MM jsou typické mnohé cytogenetické změny související se vznikem a progresí nemoci. Jedná se například o delecii 17p, která je vysoce riziková a o zisk 1q (Rajkumar, 2016). Podstatným prognostickým faktorem jsou také abnormality genu *MYC*, které jsou spojeny s horší prognózou onemocnění (Abdallah *et al.*, 2020). Gen *MYC* je u pacientů s MM často pozměněn v rámci sekundárních změn v průběhu progresu MM. Mezi změny v tomto genu patří zmnožení, amplifikace, delece, mutace a translokace (Sharma *et al.*, 2021).

V současné době se k cytogenetickému vyšetření abnormalit genu *MYC* u pacientů s MM využívá především metody FICTION, která hodnotí jen myelomové buňky. Pomocí FICTION je možné odhalit více aberací než pomocí konvenční metody FISH, která hodnotí všechny buňky (Abaza *et al.*, 2015).

2 CÍLE PRÁCE

1. Seznámení se s chodem laboratoře a základními principy vyšetření cytogenetických změn metodami FISH a FICTION.
2. Vypracování literárního přehledu o MM a cytogenetických změnách se zaměřením na abnormality genu *MYC*.
3. Retrospektivní a prospektivní vyšetření genu *MYC* metodou FICTION v souboru pacientů s MM diagnostikovaných a léčených na Hemato-onkologické klinice FNOL.
4. Zhodnocení nalezených změn genu *MYC* v souboru pacientů s MM.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Hematopoéza

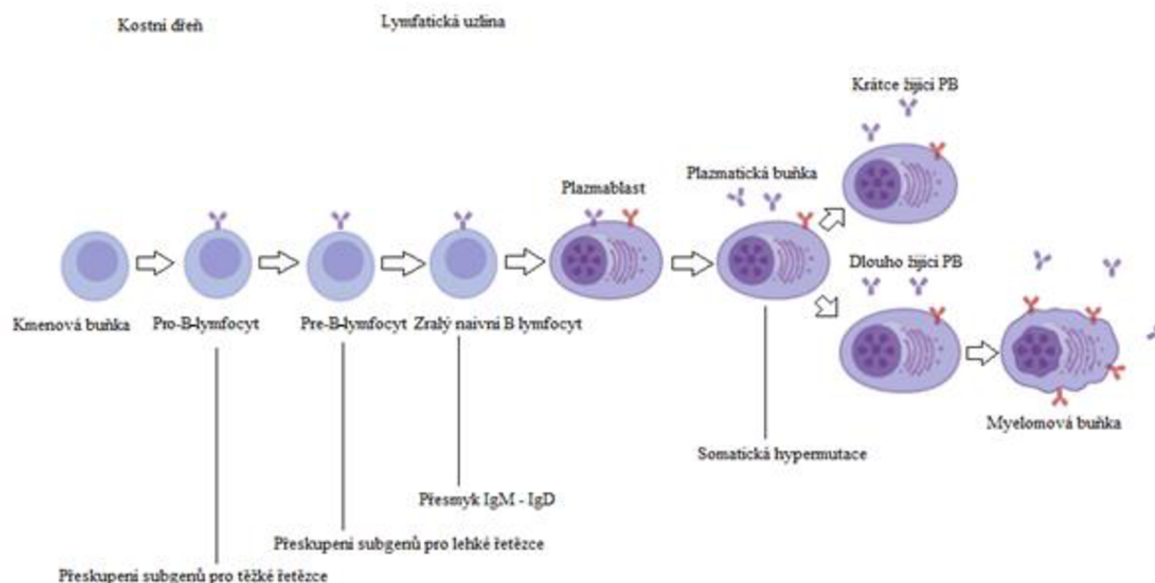
Hematopoéza (krvotvorba) je proces vývoje diferencovaných krevních buněk z hematopoetické kmenové buňky. V dospělosti probíhá hematopoéza v kostní dřeni. Z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky vzniká lymfoidní a myeloidní progenitor. Při lymfopoéze se lymfoidní progenitor diferencuje do B-lymfocytů, T-lymfocytů a NK-buněk. Při myelopoéze z myeloidního progenitoru vznikají erytrocyty, monocyty, trombocyty a granulocyty (Pospíšilová *et al.*, 2013).

3.1.1 Vývoj B-lymfocytu

Z pluripotentní kmenové buňky vzniká pro-B-lymfocyt. Z něj vzniká pre-B-lymfocyt a dále naivní B-lymfocyt, který opouští kostní dřev (KD) a dokončuje vývoj v lymfatické uzlině (Boyle *et al.*, 2014). Po stimulaci antigenem (aktivaci) se B-lymfocyt zvětšuje a prolifерuje v plazmablast. Proliferující buňky označované jako plazmablasty mohou produkovat monoklonální protilátky. Z plazmablastů vznikají krátce žijící a dlouhodobě žijící plazmatické buňky (plazmocyty) (Oracki *et al.*, 2010). Myelomové buňky se od zdravých plazmocytů liší nekontrolovatelným množením a dlouhým životem KD nemocného (Adam *et al.*, 1999).

V raných stádiích vývoje B-lymfocytu dochází u pro-B-lymfocytu ke komplexnímu přeskupování subgenů (genových segmentů) pro těžké řetězce, a poté v pre-B-lymfocytu k přeskupení genů pro lehké řetězce κ a λ . Kdyby přeskupení neproběhlo úspěšně, B-lymfocyt by zahynul. Ve zralém B-lymfocytu dochází k přesmyku imunoglobulinových tříd (Barajas-Mora *et Feeney*, 2023). Tyto procesy jsou zdrojem variability protilátek.

Diferenciace normální buňky je kontrolována koordinovanou regulací transkripčních faktorů. Klíčovou vlastností fyziologické plazmatické buňky je apoptóza ve chvíli, kdy již není v organismu potřebná (Boyle *et al.*, 2014).

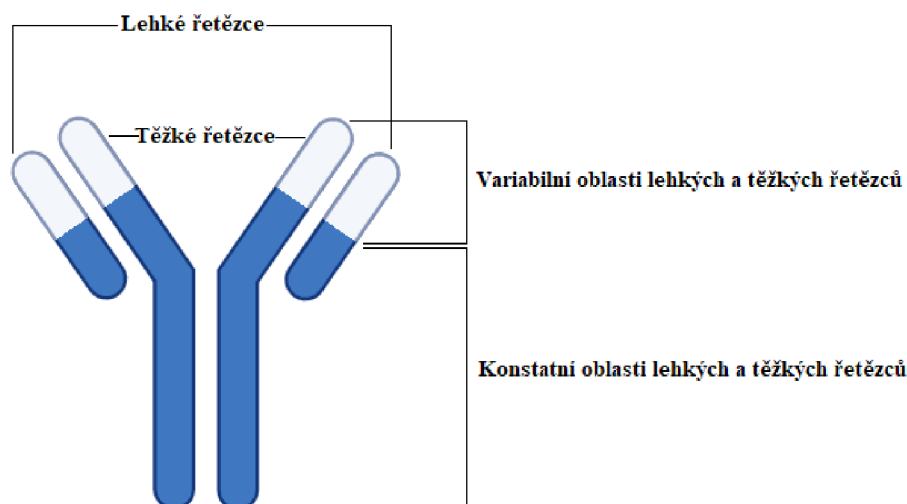


Obrázek 1: Vývoj B-lymfocyту (Vytvořeno v Biorender.com)

3.1.2 Monoklonální protilátka

Monoklonální imunoglobuliny (Ig) jsou glykoproteiny produkované jedním klonem patologických plazmatických buněk (Wootla *et al.*, 2014). Monoklonální protilátka se stejně jako fyziologické protilátky skládá ze čtyř polypeptidických řetězců. Je složena ze dvou dlouhých těžkých řetězců IgH typů α , δ , ϵ , γ a μ a ze dvou krátkých lehkých řetězců IgL typu κ (*IgK*) a λ (*IgL*).

Existují oddělené geny pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinu, které jsou přestavovány během diferenceace B-buňky. Při V(D)J rekombinaci dochází k seskupování za vzniku funkčního lidského genu. Lehké řetězce κ a λ obsahují 3 genové segmenty V (variable), J (joining) a C (constant), které jsou odděleny nekódujícími regiony. Těžké řetězce obsahují 4 genové segmenty V (variable), D (diversity), J (joining) a C (constant) (Barajas-Mora *et Feeney*, 2023).



Obrázek 2: Schématické zobrazení monoklonální protilátky (Vytvořeno v Biorender.com)

3.2 Kancerogeneze

Ke kancerogenezi (karcinogenezi) dochází na základě působení vnitřních a vnějších faktorů. Vnějšími faktory jsou například ionizující záření, viry nebo karcinogenní látky. Vnitřními faktory jsou dědičnost a vznik mutace v rámci buněčného cyklu (Petruželka *et* Konopásek, 2003).

3.2.1 Vznik nádorové buňky

Změny v tumor supresorových genech, protoonkogenech a genech regulujících apoptózu přispívají ke vzniku nádorové transformace. Protoonkogeny regulují buněčnou proliferaci. Jejich aktivací (nejčastěji mutací) vznikají onkogeny, které vyvolávají vznik nádorové buňky. Pro vytvoření aktivního onkogenu stačí pouze aktivace jedné ze dvou alel genu. Tumor supresorové geny mají schopnost inhibovat nádorovou transformaci a k jejich inaktivaci je potřeba ztráta funkce obou kopií genu. Nejčastěji se jedná o kombinaci delece jedné a mutace druhé alely (Petruželka *et* Konopásek, 2003).

3.3 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (MM) je nemoc charakteristická proliferací plazmatických buněk, jejich nahromaděním v KD a produkcí monoklonálních protilátek (Petruželka *et* Konopásek, 2003).

Patří do skupiny monoklonálních gamapatií, do které také řadíme monoklonální gamapatii nejasného významu (MGUS), doutnající myelom (SMM) a další méně časté choroby.

Předpokládá se, že MM u všech pacientů předchází bezpříznakové nemaligní stádium MGUS a někdy i SMM (Soliman *et al.*, 2021).

V současné době je MM považován za nevyлéčitelné onemocnění, ale při transplantaci kmenových buněk a užívání nových léků je medián přežití od diagnózy 8-10 let (Rohoň *et al.*, 2016).

3.3.1 Epidemiologie

MM je druhou nejčastější hematologickou malignitou. Jeho incidence se pohybuje kolem 4-5/100 000 obyvatel na rok. Při zjištění nemoci je medián věku u pacientů 63 let, přičemž převažují muži (Rohoň *et al.*, 2016).

3.3.2 Symptomy

Myelomové buňky tvoří monoklonální imunoglobuliny, které mohou tvořit různé příznaky onemocnění, jako jsou neuropatie, nefropatie či poruchy koagulace. Další symptomy MM jsou způsobeny cytokiny myelomových buněk. K nim lze zařadit bolesti kostí, frekventované infekce, horečky a celkovou slabost organismu. Za méně časté symptomy lze považovat zvýšenou kapilární propustnost, kardiální příznaky, plazmocelulární pleurální výpotek, metabolické poruchy a kožní projevy (Adam *et al.*, 1999).

3.3.3 Diagnostika a stádia MM

Pacienti s aktivním onemocněním MM mají příznaky orgánového postižení označovaného „CRAB“. Zkratka v překladu označuje hyperkalcémii, renální selhání, anémii a kostní léze. Pokud nejsou přítomny tyto čtyři příznaky, je diagnostickým faktorem pro diagnózu MM 60 % a více klonálních plazmocytů v KD, poměr dominantního a nedominantního volného lehkého řetězce v séru 100 a více a také 1 nebo více kostních lézí nad 5 mm zjištěných pomocí vyšetření magnetickou rezonancí (Minařík, 2021).

Revidovaný mezinárodní systém (R-ISS) dělí MM do třech stádií na základě kombinace biochemických markerů v séru a cytogenetických změn. Z biochemických markerů se jedná o hladinu laktátdehydrogenázy (LDH), beta-2 mikroglobulinu (β_2m) a albuminu. Jednotlivá stádia a hladiny biochemických markerů a cytogenetické změny jsou uvedeny v Tabulce 1 (Rajkumar, 2022).

Tabulka 1: Faktory k určení stádia MM pomocí R-ISS

Stádium I	normální hladina LDH v séru, hladina sérového albuminu $\geq 3,5$ g/l, hladina sérového $\beta_2m < 3,5$ mg/l
Stádium II	hodnoty mezi stádiem I a III
Stádium III	zvýšená hladina LDH v séru, hladina sérové $\beta_2m \geq 5,5$ mg/l, výskyt rizikových cytogenetických změn: t(4;14), t(14;16), del(17p)

3.3.4 Léčba

Pacienty s MM lze podle léčby rozdělit do dvou hlavních skupin. První je transplantabilní, což je skupina pacientů, kteří jsou schopni podstoupit vysokodávkovou terapii a autologní transplantaci krvetvorných buněk. Druhou skupinou jsou pacienti netransplantabilní, kteří mají obvykle přidružené jiné onemocnění nebo zhoršený celkový zdravotní stav. Tito pacienti jsou léčeni kombinovanými režimy konvenčních a nových léků. Aktuálně lze MM léčit 7 skupinami léků, které se dávkují v trojkombinaci či dvojkombinaci (Minařík, 2021).

K lékům konvenční terapie jsou řazeny zejména alkylační látky (melfalan, cyklofosamid) a kortikosteroidy (dexametazon, prednison). Mezi nové léky využívané v léčbě MM patří zejména inhibitory proteasomu (bortezomib, carfilzomib), dále imunomodulační látky (thalidomid, lenalidomid) a monoklonální protilátky (daratumumab, elotuzumab) (Jelínek *et al.*, 2015). Dále se využívají malé molekuly jako inhibitory histonové deacetylázy (panobinostat) a selektivní inhibitory jaderné membrány (selinexor). Po první intenzivní léčbě následuje léčba udržovací, ke které se v současnosti nejvíce používá nový lék lenalidomid. Pacienti, u kterých se po vyléčení projeví relaps, by měli být léčeni jinými léky než v první linii léčby. Budoucností léčby MM je cílená aktivace vlastního imunitního systému pacienta se zacílením na rakovinné buňky (Minařík, 2021).

3.4. Cytogenetické změny u MM

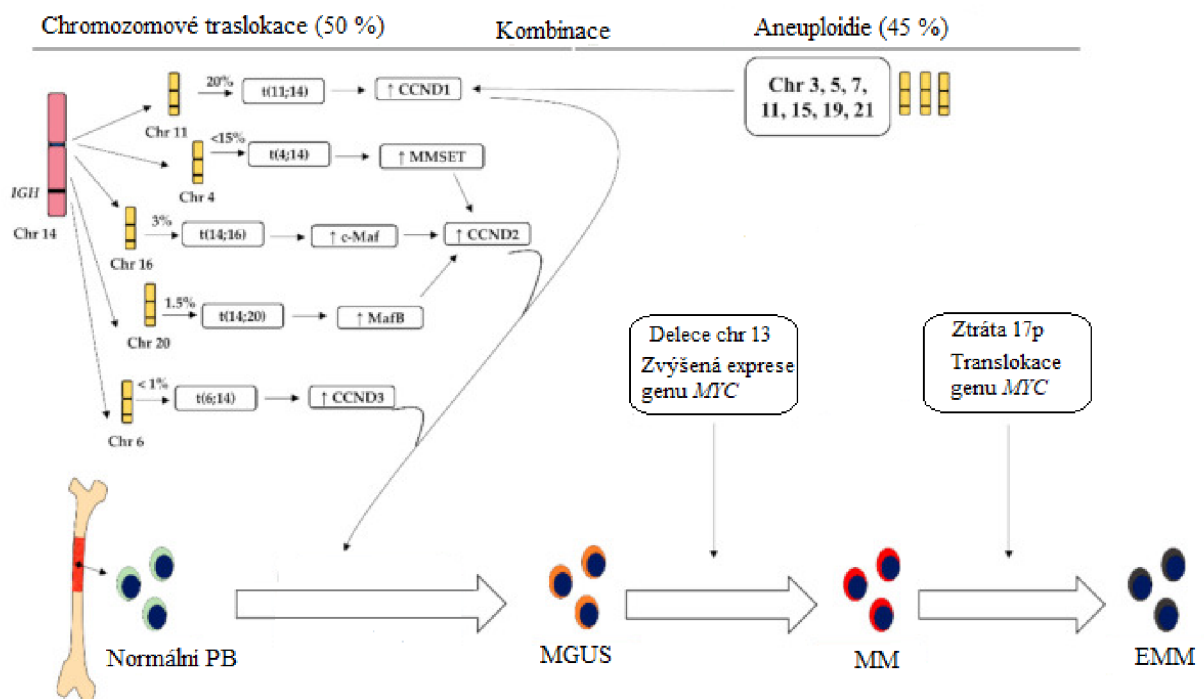
MM je charakteristický komplexními cytogenetickými změnami a molekulárně cytogenetickými aberacemi (Türkmen *et al.*, 2014).

Pacienti s MM jsou rozděleni podle primárních cytogenetických změn vyskytujících se v době diagnózy (DD) do dvou základních skupin. První skupinou je hyperdiploidie, která

je charakteristická trizomiemi lichých chromozomů, nejčastěji chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21. Objevuje se přibližně u 50 % pacientů s MM v DD a je spojena s lepší prognózou a odpovědí pacientů na léčbu (Shokripour *et al.*, 2024). Ke vzniku trizomií chromozomů pravděpodobně dochází následkem chybné segregace chromozomů během dělení plazmatické buňky.

Do druhé skupiny změn patří chromozomální translokace zahrnující *IgH* gen na chromozomu 14, které se vyskytují až u 50 % pacientů s MM. Mezi nejčastější translokace patří translokace t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23) a méně časté t(14;20)(q32q12) a t(6;14)(p21;q32) (Türkmen, *et al.*, 2014). Zmíněné translokace zahrnující chromozom 14 jsou zobrazeny na Obrázku 3. Primární změny a jejich prognostický význam jsou shrnuty v Tabulce 2.

U pacientů s MM se vyskytují také sekundární změny spojené s progresí onemocnění. Mezi ně řadíme zmnožení/amplifikaci 1q, delecii 1p, delecii/monozomii chromozomu 13, delecii 17p, translokaci genu *MYC* a přestavbu/delecii lehkých řetězců *IgK* (2p11) a *IgL* (22q11) (Clarke *et al.*, 2024). Přestavba *IgL* je u pacientů s MM častější než přestavba *IgK*, která se vyskytuje méně často (Türkmen *et al.*, 2014).



Obrázek 3: Cytogenetické změny u MM (Upraveno dle Soliman *et al.*, 2021)

Tabulka 2: Genetické abnormality u MM (Castaneda et Baz, 2019)

Abnormalita	Specifikace	Frekvence	Prognóza	
Hyperdiploidie	trizomie chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21	45 %	příznivá	
IgH translokace (14q32)	t(11;14)	gen <i>CCND1</i> (11q13)	15 %	příznivá
	t(4;14)	geny <i>FGFR3</i> a <i>NSD2</i> (4p16)	15 %	nepříznivá
	t(14;16)	gen <i>MAF</i> (16q23)	5 %	nepříznivá
	t(14;20)	gen <i>MAFB</i> (20q12)	1 %	nepříznivá
	t(6;14)	gen <i>CCND3</i> (6p21)	2 %	příznivá

3.4.1 Monozomie/delece chromozomu 13

Delece dlouhých ramen nebo častěji monozomie chromozomu 13 se vyskytuje asi u 50 % pacientů s nově diagnostikovaným MM. Delece většinou zahrnuje oblast 13q14, kde se nachází gen *RBI*, který se podílí na regulaci buněčného cyklu (Walker, 2020). Abnormality chromozomu 13 jsou spojeny s neutrální prognózou, ale často se vyskytují společně se změnami s nepříznivou prognózou, například s abnormalitami chromozomu 1 nebo t(4;14) (Iorgulescu *et al.*, 2024).

3.4.2 Abnormality chromozomu 1

Změny dlouhého ramene u chromozomu 1 (1q) jsou přítomny u poloviny nově diagnostikovaných pacientů s MM. K nárůstu výskytu dochází v progresi nebo relapsu onemocnění. Často dochází ke zmnožení (3-4 kopie) nebo amplifikaci (5 a více kopií) celého 1q. Tím dochází ke změně genové exprese řady genů, z nichž je za nejvýznamnější považován gen *CKS1B* (1q21). Další změnou na chromozomu 1 je delece krátkého ramene (1p), která se vyskytuje asi u 30 % nově diagnostikovaných pacientů. Nejčastěji deletované oblasti bývají 1p32 (gen *CDKN2C*) a 1p12 (gen *FAM46C*) (Iorgulescu *et al.*, 2024). Obě změny chromozomy 1 jsou spojeny s nepříznivou prognózou (Boyle *et al.*, 2023).

3.4.3 Delece krátkých ramen chromozomu 17

Na 17. chromozomu v oblasti 17p13.1 se nachází gen *TP53*, který je nádorový supresor a inhibuje karcinogenezi. Jím kódovaný protein TP53 je nezbytný pro stabilitu genomu a odpovědi na poškození DNA (Iorgulescu *et al.*, 2024). Ztráta genu *TP53* se vyskytuje u 14 % diagnostikovaných pacientů (Mičková *et al.*, 2014). Delece je vysoce riziková a je spojena s horší prognózou a kratším přežitím (Rajkumar, 2016). Incidence této změny roste v průběhu onemocnění (Poppek-Marciniec *et al.*, 2023).

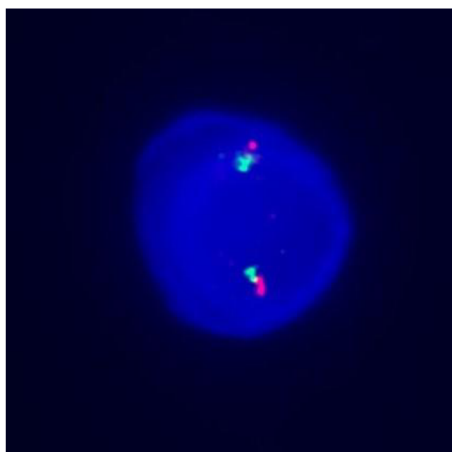
3.5 Onkogen *MYC*

Onkogen *MYC* nebo také *c-MYC* je součástí rodiny regulačních genů, které kódují transkripční faktory a regulují přímo a nepřímo tisíce genů. K aktivaci genu *MYC* dochází u většiny nádorů genetickými, epigenetickými a posttranslačními mechanismy. Aktivace genu se může podílet na proliferaci buněk, jejich době přežití, genomové nestabilitě a na úniku myelomových buněk imunitnímu systému. Samotná aktivace genu ke vzniku neoplastické transformace u zdravé buňky nestačí a jsou třeba i další příhodné podmínky jako zástava buněčného cyklu či apoptózy. Gen *MYC* mění metabolismus buněk tak, aby byl podpořen rychlý růst a proliferace (Dhanasekaran *et al.*, 2022).

3.6 Abnormality genu *MYC*

Změny genu *MYC* jsou u MM časté, ale jejich přesný význam v prognóze nebyl prozatím plně ověřen. Byla zjištěna souvislost mezi přítomností strukturních variant genu *MYC* a jeho zvýšenou expresí a horší prognózou nemoci. Gen *MYC* může být deregulován různými mechanismy, například chromozomovými přestavbami, zmnožením/amplifikací, delecí a mutací (Sharma *et al.*, 2021).

Ke změnám genu *MYC* dochází především sekundárně v rámci progresu či relapsu nemoci (Yamamoto *et al.*, 2009). Jen přibližně 15 % pacientů má přítomny abnormality genu *MYC* v počátku onemocnění MM. V průběhu vývoje nemoci, a následných pokročilejších stádiích jsou tyto abnormality přítomny až u 55 % případů (Avet-Loiseau *et al.*, 2001). Celková doba přežití pacientů s MM, u kterých byla zjištěna přestavba genu *MYC* je kratší než doba přežití pacientů bez přestavby (Abdallah *et al.*, 2020). Na Obrázku 4 je normální vzorec signálu pro gen *MYC* v PB identifikované metodou FICTION.



Obrázek 4: Normální nález pro gen *MYC* v PB (2 fúzní signály)

3.6.1 Translokace

Při vzniku translokací dochází nejdříve ke vzniku zlomů a poté ke špatnému spojení. Aktivace genu *MYC* je často způsobena sekundárními translokacemi, které mají za následek přemístění genu *MYC* k silným zesilovačům transkripce. Tím dochází k overexpresi tohoto onkogenu. Na rozdíl od primárních translokací, při kterých se jedná o reciprokovou výměnu chromozomových částí, translokace genu *MYC* jsou často komplexní, nebalancované a zahrnují různé partnerské geny. Většina translokací nezahrnuje Ig geny, přestože translokace s těmito geny jsou nejznámější (Walker *et al.*, 2014).

Většina zlomů na chromozomu 8 se nachází v 1Mb velké oblasti v pruhu 8q24. Může dojít ke zlomům ve vzdálenějších oblastech (až do vzdálenosti 3 Mb) od genu *MYC*. Centromericky od tohoto genu se nachází gen *POU5F1B* a telomericky od něj gen *PVT1*. Gen *POU5F1B* kóduje transkripční faktor, který se účastní procesů kancerogeneze. Gen *PVT1* je dlouhá nekódující RNA, která je považována za potenciální onkogen (Walker *et al.*, 2014). K deregulaci genu *MYC* Ig lokusy může dojít do vzdálenosti až přibližně 350 kbp (Zeidler *et al.*, 1994).

Translokace $t(8;14)(q24.21;q32.3)$ je nejčastější translokací genu *MYC*, která je známá především u Burkittova lymfomu, u kterého se vyskytuje jako primární změna. Tato translokace vede k deregulaci onkogenu *MYC* přemístěním k silnému promotoru genu *IgH*. Tím dochází k jeho aktivaci a vyšší transkripční aktivitě (Avet-Loiseau *et al.*, 2001). Na rozdíl od translokací s geny pro lehké řetězce Ig dochází ke zlomům na chromozomu 8 centromericky od genu *MYC* a tím aktivace genu *MYC* vzniká na derivovaném chromozomu 14 (Angi *et al.*, 2017). Na Obrázku 5 je vyobrazena $t(8;14)$, kde je PB vyšetřena metodou FICTION.

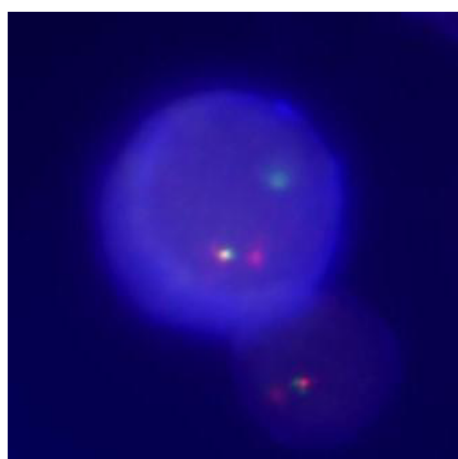


Obrázek 5: PB s translokací t(8;14) (2 fúzní signály, zelený signál pro gen *IgH*, červený pro gen *MYC*)

U translokace t(8;22)(q24.21;q11.22) dochází k fúzi genů *MYC* a *IgL*. Je spojována s negativní prognózou. Předpokládá se asociace s transkripčním faktorem *IKZF1* a nižší citlivost k léčbě (Sharma *et al.*, 2021). Vyskytuje se u asi 10 % pacientů (Soliman *et al.*, 2021).

Translokace t(2;8)(p11.2;q24.21) zahrnuje gen *MYC* a gen *IgK*. Tato translokace je nejméně častá (Yamamoto *et al.*, 2009).

U translokací s geny *IgL* a *IgK* dochází ke zlomům telomericky od genu *MYC*. To způsobuje aktivaci genu *MYC* zesilovači transkripce na derivovaném chromozomu 8 (Angi *et al.*, 2017). Přestavba genu *MYC* vyšetřovaná metodou FICTION je zobrazena na Obrázku 6.



Obrázek 6: PB s přestavbou genu *MYC* (oddělený červený a zelený signál)

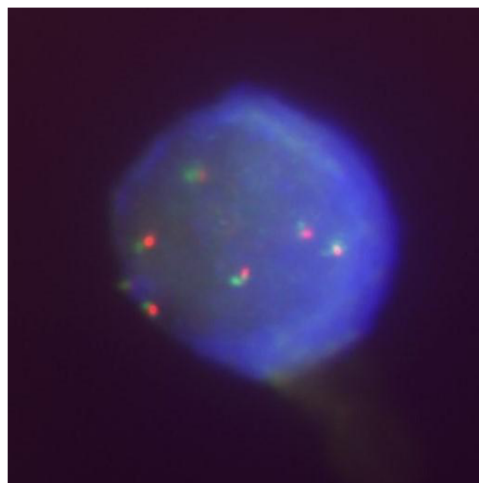
3.6.2 Zmnožení

Pacienti se 3 nebo 4 kopiemi genu *MYC* mají lepší reakci na léčbu a delší dobu přežití než pacienti se 4 a více kopiemi tohoto genu, amplifikací či translokací. Byla odhalena negativní korelace mezi počtem kopií genu *MYC* a dobou přežití. Délku

přežití u pacientů s MM se 4 a více kopiemi genu *MYC* lze zvýšit velmi intenzivní léčbou (Schieppati *et al.*, 2020). Zmnožení genu *MYC* může být také spojeno s trizomií chromozomu 8, která je ovšem méně častá než trizomie lichých chromozomů (Mlynářčiková *et al.*, 2016).

3.6.3 Amplifikace

Při amplifikaci dochází k výraznému zmnožení genů nad 5 kopií. K amplifikaci může docházet chromotripsí, která je příčinou rozpadu chromozomů a znovuseskupením s velkým množstvím přestaveb. Druhým mechanismem vzniku může být aneuploidní získání chromozomů. U pacientů s amplifikací byla zjištěna výrazně vyšší exprese genu *MYC*. Amplifikace nad 7 kopií má ze všech změn genu *MYC* nejhorší prognózu. Pacienti, u kterých byla identifikována, mají dobu přežití pouze 8 až 8,5 měsíců (Schieppati *et al.*, 2020). U pacientů, u kterých nebyly abnormality genu *MYC* zjištěny, byla prokázána nižší exprese tohoto genu i delší doba přežití (Sharma *et al.*, 2021). Amplifikaci genu lze ve fluorescenčním mikroskopu rozeznat zvýšeným počtem kopií genu (Obrázek 7).



Obrázek 7: Amplifikace genu *MYC* v PB (6 fúzních signálů)

3.6.4 Delece

Proximální či terminální delece genu *MYC* vznikají jednou strukturální změnou a následným spojením dvou zlomů DNA, kdy dochází k vynechání segmentu s genem *MYC* nebo jeho částí (Sharma *et al.*, 2021).

3.6.5 Mutace

Mutace v genu *MYC* přispívají k progresi onemocnění. Jediná mutace v genu *MYC* je dostačující ke zvýšení jeho exprese. Zvýšená exprese *MYC* proteinu v buňce je spojena

s mutací v C-T oblasti DNA genu. Tato mutace byla pozorována u 42 % pacientů s MM (Chappell *et al.*, 2000).

3.7 Cytogenetika

Cytogenetika je metodou používanou v klinických laboratořích. Poskytuje informace pro identifikaci chromozomálních abnormalit v buněčných kulturách (Bates *et al.*, 2014).

3.7.1 Základy cytogenetiky

Základními úkony prováděnými v rámci analýzy vzorků je stanovení počtu somatických a pohlavních chromozomů, jejich početní změny či přestavby. Typickým postupem stanovení změn v genomu je příprava preparátu, ve kterém je u buněk buněčným jedem zastaven buněčný cyklus v metafázi mitózy. Poté se provádí barvení chromozomů Giemsou a trypsinem, tzv. G-pruhování. Výsledkem je sestavený karyotyp z G-pruhovaných mitóz, přičemž jsou jednotlivé chromozomy seřazeny dle velikosti, pruhů a lokalizace centromery (Bates *et al.*, 2014). Lidský karyotyp je v normální situaci složen u ženy ze 46 chromozomů a dvou pohlavních X chromozomů. U muže je karyotyp složen ze 46 chromozomů a jednoho pohlavního X a jednoho pohlavního Y chromozomu (Roth, 2020). Pomocí karyotypování je možné odhalit přestavby jako inverze, translokace, delece nebo početní změny jednotlivých chromozomů (Bates *et al.*, 2014).

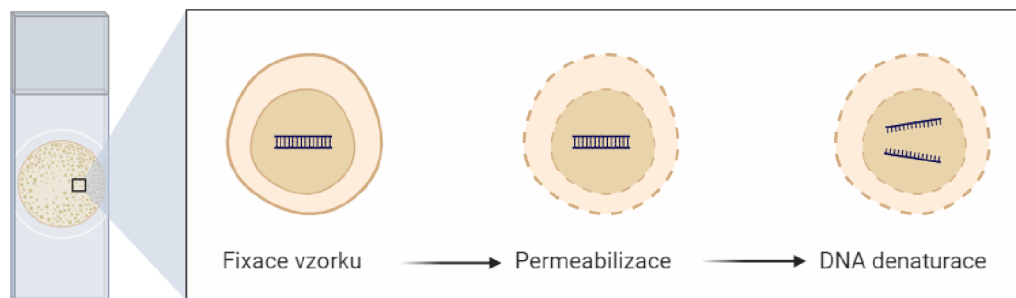
U MM je často zjištěn normální karyotyp, protože se jedná o onemocnění terminálně diferencovaných buněk (plazmocytů), které se obtížně dělí v buněčných kulturách. Většina nalezených metafází pochází z normálních hematopoetických buněk. Z tohoto důvodu se pro cytogenetické vyšetření MM využívá více specializovaných analýz, kterými jsou například FISH a FICTION (Tchinda *et al.*, 2004).

3.7.2 FISH

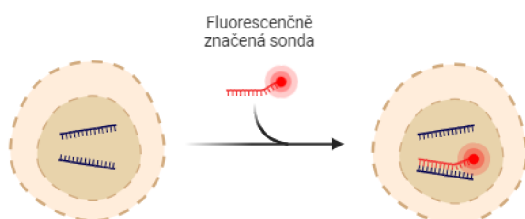
Fluorescenční *in situ* hybridizace je metoda využívána pro lokalizaci specifické sekvence nukleové kyseliny. Lze pomocí ní detekovat chromozomální změny. Principem je schopnost jednovláknové DNA za odpovídajících podmínek hybridizovat (tvořit duplex) s komplementárním vláknem DNA. Sondy, které jsou často cDNA nebo fragmenty genomické DNA jsou značeny fluorescenčně (Raimondi, 2009). Fluorescenční signály jsou obvykle pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem za použití imerzního oleje a odpovídajících fluorescenčních filtrů. Můžeme hodnotit nejen metafázní chromozomy, ale i interfázní jádra buněk (Fu *et al.*, 2021).

U MM je potřeba identifikovat plazmatické buňky, protože diagnostika MM je založena na nízké infiltraci KD patologickým klonem (10 % a více) a metoda FISH je obtížně hodnotitelná. Aktuálně používanými metodami detekce plazmatických buněk jsou MACS, FACS a FICTION (Kuru *et al.*, 2024).

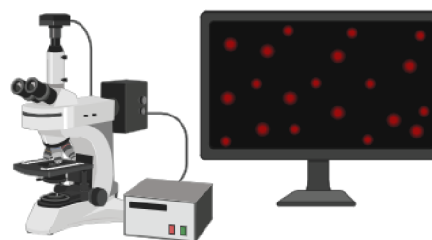
1 Příprava vzorku



2 Hybridizace



3 Hodnocení



Obrázek 8: Schéma metody FISH (Vytvořeno v Biorender.com)

3.7.3 MACS

Magneticky aktivované třídění buněk (MACS; Magnetic-activated cell sorting) je separační metoda, která využívá vysoce specifických protilátek k separaci požadovaných buněk z KD. Při provedení MACS dochází k selekci a separaci myelomových buněk ze směsi na základě jejich povrchového CD znaku detekovaného monoklonální protilátkou navázanou na magnetickou částici. Plazmatické buňky jsou charakteristické tím, že výrazně exprimují CD138. Pozitivní selekce CD138⁺ buněk probíhá tak, že je směs různých buněk z KD pacienta nejprve označena protilátkou anti-CD138. Poté dochází k promytí, inkubaci a aplikaci promyté KD do kolony v magnetickém poli separátoru. Výsledkem separace buněk je průchod negativních buněk kolonou a získání čistě pozitivních buněk po odstranění kolony z magnetu (Fišerová *et al.*, 2001).

3.7.4 FACS

Fluorescenčně aktivované třídění buněk (FACS; Fluorescence-activated cell sorting) je speciální separační metoda průtokové cytometrie, která umožňuje třídění buněk na základě jejich rozptylu světla a fluorescenčních vlastností. Separátor generuje proud kapiček se směsí buněk z KD. Poté elektrostaticky nabíjí a odklání cílové buňky a odděluje je tak od zbytku buněk. Značení probíhá fluorescenčními protilátkami (Bonner *et al.*, 1972).

3.7.5 FICTION

FICTION (fluorescence immunophenotyping and interphase hybridisation as a tool for the investigation of neoplasms) je metoda, která kombinuje běžnou FISH s fluorescenčním imunofenotypováním plazmatických buněk. Metoda je založena na detekci lehkých řetězců monoklonálního imunoglobulinu (kappa nebo lambda) v cytoplazmě myelomových buněk. To jsou jediné buňky, které jsou ve vzorku touto metodou hodnoceny (Fu *et al.*, 2021).

Na rozdíl od metod FACS a MACS, u kterých je nutná analýza čerstvě odebrané KD, lze pomocí FICTION identifikovat strukturní nebo numerické změny i ve vzorcích, které byly archivovány. Pomocí metody FICTION je výrazně vyšší záchyt chromozomových abnormalit u pacientů s MM (32 %) než standardní metodou FISH (12 %) (Abaza *et al.*, 2015).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Zpracování vzorků pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření

Vyšetření kostní dřeně (KD) pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu bylo provedeno v Laboratoři cytogenomiky Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice a Lékařské Fakulty UP Olomouc. Vzorky KD jsou do Laboratoře cytogenomiky dodávány ve zkumavkách s protisrážlivým činidlem heparinem litným. Některé analýzy byly provedeny retrospektivně ze zpracovaných zamražených vzorků KD, část vzorků byla analyzována prospektivně.

4.1.1 Biologický materiál

- kostní dřeň pacientů s MM

4.1.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- 0,075M chlorid draselný (lékárna FNOL)
- 96% etanol (Fagron, kat. č. 605455)
- BIO-MARROW Karyotyping Medium (Sartorius Stedim Biotech GmbH, kat. č. 223900412)
- colcemid (Thermo Fisher Scientific, Gibco™ KaryoMAX™ Colcemide™ Solution in HBSS, kat. č. 15210040)
- injekční voda (ArdeaPharma a.s., kat. č. 76/926/95-C)
- kyselina octová ledová (Penta, kat. č. 19990-11000)
- metanol (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. R8758)
- RPMI-1640 médium (EuroClone S.p.A., kat. č. ECM2001L)

Použité roztoky a jejich příprava

- Carnoyův fixační roztok

Smíchat metanol a kyselinu octovou v poměru 3:1. Do odměrné baňky o objemu 100 ml, napipetovat 25 ml kyseliny octové a doplnit 75 ml metanolu.

4.1.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- CCD kamera (CoolTube 1, MetaSystems)
- CO₂ inkubátor s tepelnou sterilizací (PHCbi, MCO-170AICD)

- digitální laboratorní váhy (Scaltec, SPO 51)
- laboratorní digestoř (MERCY s.r.o, N/900 M2)
- lednička (Liebherr MediLine)
- mraznička (Liebherr Comfort)
- stolní centrifuga, výkyvný rotor (Hettich Universal, 320 R)
- vortex (Heidolph, Relax top)

4.1.4 Pracovní postup

Kultivace buněk kostní dřevě

1. KD byla omyta od heparinu a byla přelita do centrifugační zkumavky a doplněna do objemu 15 ml RPMI-1640 médiem.
2. Poté byl obsah zkumavky promíchán a centrifugován 10 minut při 1000 otáček.
3. Byl odebrán supernatant.
4. Sediment byl opatrně přenesen do kultivační nádoby s 10 ml BIO-MARROW (BM) média.
5. Byly přidány 2 kapky colcemidu.
6. Vzorek byl inkubován při 37 °C do druhého dne.

Zpracování biologického materiálu nemocných dospělých

1. Byl připraven Carnoyův fixační roztok smísením metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1.
2. Obsah kultivační nádoby byl přelit do označené centrifugační zkumavky o objemu 15 ml.
3. Byla provedena centrifugace 10 minut při 1000 otáček a 37 °C.
4. Poté byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 10 ml 0,075M roztoku KCl o laboratorní teplotě.
5. Materiál byl poté inkubován 20 minut při 37 °C.
6. Byla přidána 1 kapka fixačního roztoku Carnoye vychlazeného v lednici.
7. Byla provedena centrifugace 10 minut při 1000 otáček a 37 °C.
8. Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno 10 ml Carnoyova fixačního roztoku. Z toho byl přidán první mililitr po kapkách, a bylo promícháno pomocí vortexu.
9. Materiál byl inkubován 30 minut při pokojové teplotě.
10. Byla provedena centrifugace 10 minut při 1000 otáček a 37 °C.

11. Byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 10 ml Carnoyova fixačního roztoku a promícháno pomocí vortexu.
12. Kroky 7-11 byly opakovány do té doby, než výsledná suspenze získala mléčné opaleskující zabarvení.
13. Takto připravená suspenze buněk byla uchována v lednici k dalšímu použití po dobu několika týdnů.
14. Následně byl zbylý materiál archivován zamražením cca 2 ml buněčné suspenze v plastových zkumavkách značky Eppendorf při -20 °C.

4.2 Metoda FISH

4.2.1 Biologický materiál

- buněčné suspenze pacientů s MM

4.2.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- 20x SSC (Abbott Molecular Inc., kat. č. 02J10-032)
- 96% etanol (Fagron, kat. č. 605455)
- DAPI/DuraTect-Solution (ZytoVision, kat. č. MT-0007-0.8)
- fluorescečně značená sonda MYC BA (MetaSystems, kat. č. D-6023-100-OG)
- injekční voda (ArdeaPharma, kat. č. 76/926/95-C)

Použité roztoky a jejich příprava

- 20xSSC, pH 7,2-7,4

Na zásobní roztok navážit 132 g 20xSSC a rozpustit v 500 ml injekční vody. Upravit pH pomocí 1M NaOH na 7,2-7,4, který připravit rozpuštěním 40 g NaOH v 1 litru injekční vody.

- 0,4x SSC + 0,3% NP40

Zásobní mycí roztok připravit do odměrné baňky o objemu 1 litru. Nejprve do odměrné baňky nalít 20 ml 20x SSC, poté přidat 3 ml NP40 a nakonec doplnit po rysku injekční vodou a promíchat.

- 2x SSC + 1% NP40

Zásobní mycí roztok připravit do odměrné baňky o objemu 1 litru. Nejprve do odměrné baňky nalít 100 ml 20x SSC, poté přidat 1 ml NP40 a nakonec doplnit po rysku injekční vodou a promíchat.

- řada ledových alkoholů (příprava 70% a 80% etanolu z 96% etanolu)

Do první nádoby připravit 70% ethanol odměřením 73 ml 96% etanolu a 27 ml injekční vody. Poté připravit do druhé nádoby 80% etanol smísením odměřených 83 ml 96% etanolu a 17 ml injekční vody. Do třetí nádoby nalít 100 ml 96% etanolu.

4.2.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- CCD kamera (CoolTube 1, MetaSystems)
- denaturační plotýnka ThermoBrite™ StatSpin® (Abbott Molecular)
- hybridizační komůrka (Boeckel Scientific, 241000)
- automatické mikropipety s rozsahy od 0,5 µl do 1000 µl (Eppendorf, Gilson)
- kapací systém Chromosome Metaphase Spreader Hanabi (ADSTEC)
- laboratorní digestoř (MERCY s.r.o, N/900 M2)
- lednička (Liebherr MediLine)
- minicentrifuga (Phoenix Instrument, CD-1008)
- mraznička (Liebherr Comfort)
- počítač se softwarem Neon (IKAROS/ISIS, MetaSystems)
- stolní centrifuga, výkyvný rotor (Hettich Universal, 320 R)
- světelný, fluorescenční mikroskop (Olympus, BX51)
- vortex (Heidolph, Relax top)
- výhřevná plotýnka 12801 (Medax Nagel GmbH Kiel)
- vyhřívaná vodní lázeň GFL 101 (GFL)

4.2.4 Pracovní postup

Příprava a denaturace preparátu

1. Byl připraven preparát nakapáním 2-3 kapek buněčné suspenze na podložní sklo. To bylo ponecháno volně uschnout.
2. Pod světelným mikroskopem bylo zkontrolováno množství buněk a v případě nedostatku buněk byly nakapány další 2-3 kapky buněčné suspenze.
3. Do koplíny s 2x SSC byl vložen preparát a bylo inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě.
4. Poté bylo provedeno promytí v řadě ledových alkoholů uchované při - 20 °C (70%, 80%, 96% etanol) vždy po dobu 2 minut.
5. Sklo bylo po inkubaci přeneseno na plotýnku vytemperovanou na 45 °C a ponecháno uschnout.

Kodenaturace

6. Na preparát bylo napipetováno 5 μ l připravené sondy a bylo přikryto krycím sklem o velikosti 18x18 cm. Okraje krycího skla byly oblepeny Rubber cementem, který zabraňuje vysychání sondy během denaturace a hybridizace.
7. Sklo se sondou bylo zdenaturováno v komůrce ThermoBrite při 75 °C 2 minuty.

Hybridizace

8. Preparát byl hybridizován ve vlhké hybridizační komůrce při 37 °C do druhého dne.

Odmývání

9. Další den bylo provedeno odmytí zbytku nenavázané sondy inkubací skla v mycích roztocích.
10. Nejprve byl preparát omyt v 0,4x SSC/0,3 % NP40 ve vodní lázni při teplotě 73 °C po dobu 2 minut.
11. Poté byl preparát omyt ve 2x SSC/0,1% NP40 při laboratorní teplotě po dobu 2 minut.
12. Po omytí skla na něj bylo pipetováno 10 μ l DAPI a bylo překryto krycím sklem o velikosti 22x22 mm.

4.2.5 Vyhodnocení

Preparát byl vyhodnocen fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51 s příslušnou sadou fluorescenčních filtrů. Pro danou sondu bylo hodnoceno 300 buněk. U každého pacienta byl pořízen záznam hodnocených buněk v programu Neon (IKAROS/ISIS, MetaSystems).

4.3 Metoda FICTION

4.3.1 Biologický materiál

- buněčné suspenze pacientů s diagnózou MM

4.3.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- 96% etanol (Fagron, kat. č. 605455)
- AMCA Anti-Human IgG (H+L) (Vector Laboratories, kat. č. CI-3000)
- AMCA Anti-Human Kappa chain (Vector Laboratories, kat. č. CI-3060)
- AMCA Anti-Human Lambda chain (Vector Laboratories, kat. č. CI-3070)
- Antifade Counterstain Diluent (KreatechTM, kat. č. LK-097A)
- citronan sodný dihydrát p.a. (Lach-Ner, kat. č. 30009)

- fluorescenčně značené sondy (CytoCell): CytoCell myProbes IGL/cMYC Dual Fusion FISH Probe (kat. č. MPD4480), CytoCell myProbes IGK/c-MYC Dual Fusion FISH probe (kat. č. MPD4490)
- fluorescenčně značené sondy (MetaSystems): XL MYC BA (MetaSystems, kat. č. D-6023-100-OG), MYC AMP (MetaSystems, kat. č. D-6008-100-OG), MYC BA Triple-color (MetaSystems, kat. č. D-6030-100-TC)
- fluorescenčně značené sondy (Zytovision): *ZytoLight*[®] SPEC IGK Dual Color Break Apart Probe (Zytovision, kat. č. Z-2288-50), *ZytoLight*[®] SPEC IGL Dual Color Break Apart Probe (Zytovision, kat. č. Z-2099-20), *ZytoLight*[®] SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe (Zytovision, kat. č. Z-2090-50), *ZytoLight*[®] SPEC MYC/IGH Dual Color Dual Fusion Probe (Zytovision, kat. č. Z-2105-50)
- injekční voda (ArdeaPharma, kat. č. 76/926/95-C)
- kyselina citronová monohydrát p.a. (Lach-Ner, kat. č. 10020)
- kyselina octová ledová (Penta, kat. č. 19990-11000)
- metanol (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. R8758)
- NP40 (Abbott Molecular, kat. č. 07J05-001)
- postfixační roztok (Lékárna FNOL)
- 10x PBS pufr (Lékárna FNOL)
- 20x SSC (Abbott Molecular Inc., kat. č. 02J10-032)

Použité roztoky a jejich příprava

- 10mM citrátový pufr

Nejprve připravit roztok 0,1M kyseliny citronové navážením 2,101 g kyseliny citronové do odměrné baňky o objemu 100 ml, doplnit po rysku injekční vodou a promíchat.

Dále připravit roztok 0,1M citronanu sodného navážením 4,941 g citronanu sodného do odměrné baňky o objemu 100 ml, doplnit po rysku injekční vodou a promíchat.

Do 500ml odměrné baňky napipetovat 9 ml 0,1M kyseliny citronové, přidat 41 ml 0,1M citronanu sodného, doplnit přibližně 450 ml injekční vody po rysku odměrné baňky a promíchat.

- 1x PBS pufr

Do 50ml odměrné baňky napipetovat 5 ml 10x PBS, a poté doplnit do asi 45 ml injekční vody po rysku a obsah baňky promíchat.

- ředění protilátek AMCA Anti-Human Kappa chain a AMCA Anti-Human Lambda chain

Ředit v poměru 1:10, tedy smísením 100 µl zásobního roztoku protilátky a 1000 µl 1x PBS pufru.

- ředění protilátky AMCA Anti-Human IgG (H+L)

Ředit v poměru 1:20 smísením 50 µl zásobního roztoku protilátky a 1000 µl 1x PBS pufru.

4.3.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- hybridizační komůrka (Boekel Scientific, 241000)
- inkubační vodní lázeň (Schoeller Instruments, s.r.o.)
- laboratorní digestoř (MERCY s.r.o, N/900 M2)
- lednička (Liebherr MediLine)
- minicentrifuga (Phoenix Instrument, CD-1008)
- mraznička (Liebherr Comfort)
- počítač se softwarem Neon (IKAROS/ISIS, MetaSystems)
- stolní centrifuga, výkyvný rotor (Hettich Universal, 320 R)
- světelný, fluorescenční mikroskop (Olympus, BX51)

4.3.4 Pracovní postup

Příprava biologického materiálu

1. Do zkumavky bylo napipetováno 500 µl ze suspenze KD pacienta (čerstvá KD nebo archivovaná KD z mrazáku).
2. Zkumavka byla doplněna 96% etanolem do objemu 10 ml.
3. Takto připravená buněčná suspenze byla po dobu 10 minut inkubována při pokojové teplotě.
4. Byla provedena centrifugace 10 minut při 1000 otáček při 4° C.
5. Poté byl odstraněn supernatant a byl přidán 96% etanol do objemu 10 ml.
6. Následně byla suspenze po dobu 10 minut inkubována při pokojové teplotě.
7. Po inkubaci byla opět provedena centrifugace 10 minut při 1000 otáček při 4° C.
8. Ze zkumavky byl odebrán supernatant a byl přidán cca 1 ml 96% etanolu na naředění peletu.
9. Obsah zkumavky byl promíchán a tím byl připraven pro další přípravu preparátu.

Příprava preparátu

10. Na orosené podložní sklo byly z výšky nakapány 3 kapky připravené buněčné suspenze. Sklo bylo ponecháno volně uschnout.
11. Pod světelným mikroskopem bylo zkontrolováno množství buněk na preparátu. V případě nedostatku buněk byly stejným způsobem na podložní sklo přikápnuty další 2-3 kapky.
12. Do vyhřáté vodní lázně na 95 °C byla vložena kyveta s roztokem 10 mM citrátového pufru, a po jejím vytemperování byl vložen připravený preparát na podložním skle. Byla provedena inkubace po dobu 10 minut.
13. Kyveta se sklem byla vyjmuta z vodní lázně a byla ponechána chladnout při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
14. Následně bylo sklo omyto 2x po 2 minutách v 1x PBS pufru.
15. Na vlhké sklo bylo naneseo 60 µl naředěné protilátky AMCA Anti-Human Kappa chain nebo AMCA Anti-Human Lambda chain. Poté bylo překryto parafilmem a inkubováno 1 hodinu při 37 °C ve vlhké komůrce.
16. Po inkubaci byl odstraněn parafilm a 2x po 2 minutách byl preparát omyt v 1x PBS pufru.
17. Následně bylo na sklo naneseo 60 µl naředěné AMCA Anti-Human IgG a bylo inkubováno 1 hodinu při 37 °C ve vlhké komůrce.
18. Parafilm byl odstraněn a preparát byl omyt 2x po dobu 2 minut v 1x PBS pufru.
19. Poté bylo provedeno odvodnění skla promýváním ve vzestupné řadě ledových alkoholů (uchovávaných při -20 °C). Postupně byla provedena inkubace po dobu 2 minut v 70%, 80% a 96% etanolu.
20. Sklo bylo přeneseno na vytemperovanou plotýnku na 45 °C do uschnutí.

Příprava sondy

21. Do mikrozkuhavky typu Eppendorf bylo napipetováno 5 µl sondy, která byla zdenaturována podle pokynů v příbalovém letáku výrobce. Sondy, čas a teplota denaturace jednotlivých výrobců jsou uvedeny v Tabulce 3.
22. Denaturovaná sonda byla napipetována na sklo, přikryta krycím sklem 18x18 mm a byla zamontována Rubber cementem.
23. Takto připravený preparát byl hybridizován v hybridizační komůrce do druhého dne.

Tabulka 3: Souhrn použitých genových sond pro vyšetření abnormalit genu *MYC*

Název	Lokalizace	Výrobce	Katalogové číslo	Denaturace
XL MYC BA	8q24.21	MetaSystems	D-6023-100-OG	73 °C, 5 minut
XL MYC AMP	8q24.21	MetaSystems	D-6008-100-OG	73 °C, 5 minut
XL MYC BA Triple-color	8q24.21	MetaSystems	D-6030-100-TC	73 °C, 5 minut
ZytoLight[®] SPEC IGK Dual Color Break Apart Probe	2p11.2	Zytovision	Z-2288-50	73 °C, 10 minut
ZytoLight[®] SPEC IGL Dual Color Break Apart Probe	22q11.22	Zytovision	Z-2099-20	73 °C, 10 minut
ZytoLight[®] SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe	8q24.21	Zytovision	Z-2090-50	73 °C, 10 minut
ZytoLight[®] SPEC MYC/IGH Dual Color Dual Fusion Probe	8q24.21, 14q32.33	Zytovision	Z-2105-50	73 °C, 10 minut
CytoCell myProbes IGL/cMYC Dual Fusion FISH Probe	8q24.21, 22q11.21-q11.23	Cytocell	MPD4480	73 °C, 5 minut
CytoCell myProbes IGK/c-MYC Dual Fusion FISH probe	2p11.2, 8q24.21	Cytocell	MPD4490	73 °C, 5 minut

Použité sondy

- XL MYC BA

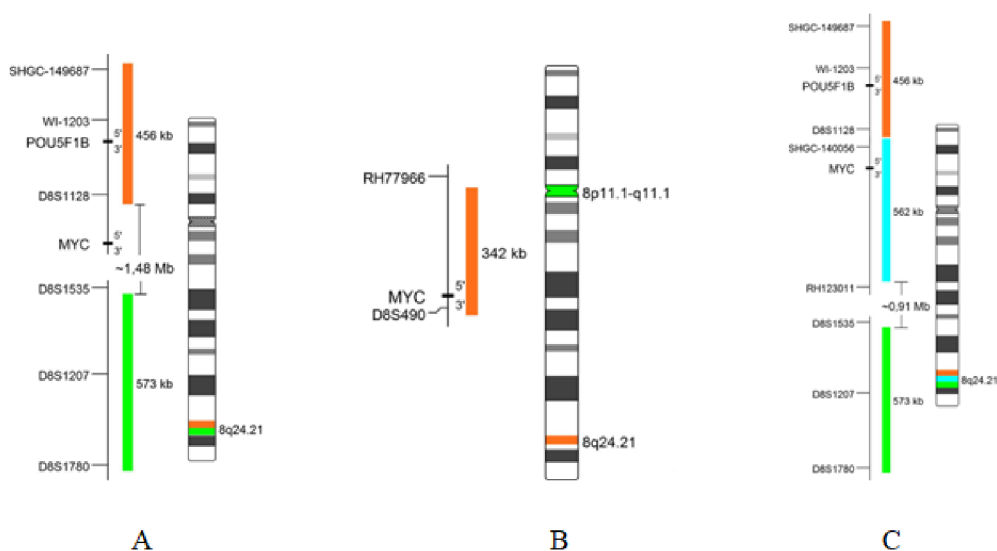
Sonda je dvoubarevná a skládá se z oranžové části hybridizující k sekvencím před 5'koncem genu *MYC* a ze zelené barvy hybridizující k sekvencím za 3'koncem genu *MYC*. U normální buňky je možné pozorovat dva fúzní signály oranžové a zelené barvy. V případě translokace dochází k rozdělení fúzního signálu na oranžový a zelený. Genová mapa je na Obrázku 4 označena jako A.

- XL MYC AMP

Jedná se o sondu, která je složená z oranžové části hybridizující k oblasti genu *MYC* a přilehlým sekvencím a dále ze zeleně značené části, která hybridizuje k centromere chromozomu 8. U zdravého člověka jsou pozorovány dva zelené a dva oranžové signály. V případě zmnožení/amplifikace genu *MYC* je u aberantní buňky přítomno více oranžových a dva zelené signály. Genová mapa je na Obrázku 4 označena jako B.

- XL MYC BA Triple-color

Jedná se o třibarevnou sondu, kdy je oblast před 5' koncem genu *MYC* značena oranžovou sondou. Modrou sondou je značena oblast genu *MYC* a zelenou v oblasti za 3' koncem genu *MYC*. Tato sonda umožňuje přesněji stanovit místa zlomu u translokací genu *MYC*. V normálním případě se vyskytují 2 fúzní signály (obsahující oranžovou, modrou a zelenou). U aberantních buněk se může vyskytnout fúze pouze 2 barev a 1 barva je oddělená v důsledku proběhlého zlomu chromozomu. V případě delece dochází ke ztrátě jednoho nebo více barevných signálů. Genová mapa je na Obrázku 4 označena jako C.



Obrázek 9: Genové mapy zobrazující vyšetřovanou oblast genu *MYC* sondami XL MYC BA (A), XL MYC AMP (B) a XL MYC BA Triple-color (C) (Upraveno podle: MetaSystems Probes, 2024)

- ZytoLight[®] SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe

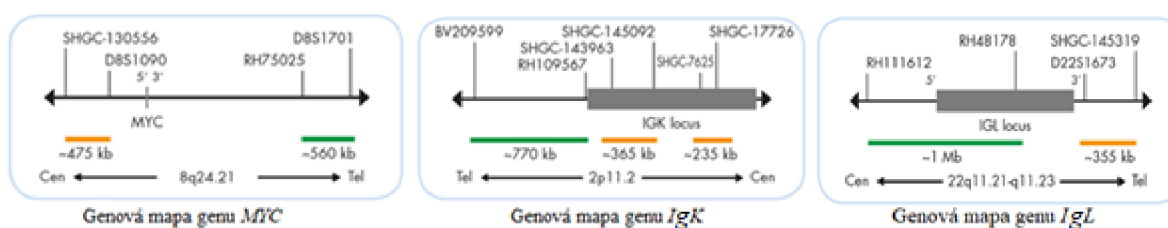
Jedná se o dvoubarevnou sondu, přičemž oranžová barva hybridizuje k sekvencím blíže k centromere a 5' konci genu a zelená barva směrem ke 3' konci genu *MYC* a k telomeře. Tato sonda slouží k detekci přestaveb v oblasti genu *MYC*. Genová mapa genu *MYC* je uvedena jako první zleva na Obrázku 5.

- ZytoLight[®] SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe

Dvoubarevná sonda se používá pro identifikaci translokací zahrnujících *IgK* lokus. Zelená barva značí oblast 770 kb od *IgK* směrem k telomeře a oranžová dvě oblasti *IgK* lokusu směrem k centromeře. U normální buňky jsou přítomny dva fúzní signály, u aberantní buňky je oddělen zelený a oranžový signál. Genová mapa genu *IgK* je na Obrázku 5 druhá zleva.

- ZytoLight[®] SPEC IGL Dual Color Break Apart Probe

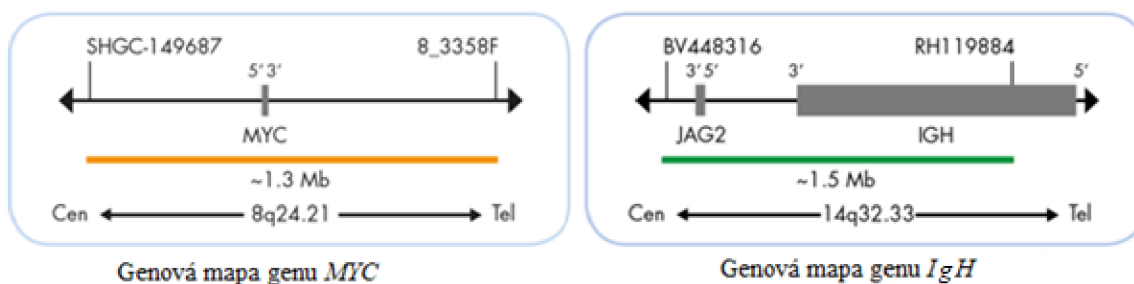
Dvoubarevná sonda se používá pro určení translokací, které zahrnují *IgL* lokus. Zelená barva značí oblast 1 Mb směrem k centromeře a oranžová oblast 355 kb směrem k telomeře. U normální buňky lze pozorovat dva fúzní signály a u aberantní je oddělen zelený a oranžový signál. Genová mapa genu *IgL* je na Obrázku 5 třetí zleva.



Obrázek 10: Genová mapa zobrazující vyšetřovanou oblast genů *MYC*, *IgK* a *IgL* (Upraveno podle: Zytovision Molecular diagnostics simplified, 2024)

- ZytoLight[®] SPEC MYC/IGH Dual Color Dual Fusion Probe

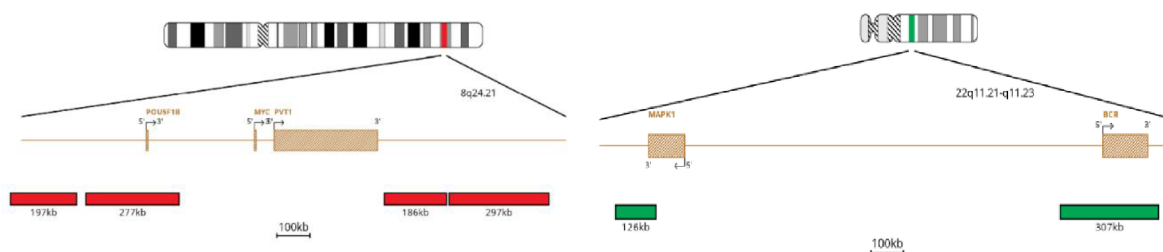
Jedná se o sondu ke kvantitativní detekci translokace t(8;14), která zahrnuje geny *MYC* (8q24.21) a *IgH* (14q32.33). K oblast genů *MYC* hybridizuje sonda s oranžovým značením, na *IgH* gen se zeleným. V normálních interfázních jádrech jsou dva oddělené zelené a dva oddělené oranžové signály. V abnormálních jádrech, kde proběhl zlom a reciproká translokace je možné pozorovat dva fúzní signály (složené z oranžové a zelené barvy) a jeden samostatný oranžový a jeden samostatný zelený signál.



Obrázek 11: Genová mapa zobrazující vyšetřovanou oblast genu *MYC* a *IgH* (Upraveno podle: Zytovision Molecular diagnostics simplified, 2024)

- CytoCell myProbes IGL/cMYC Dual Fusion FISH Probe

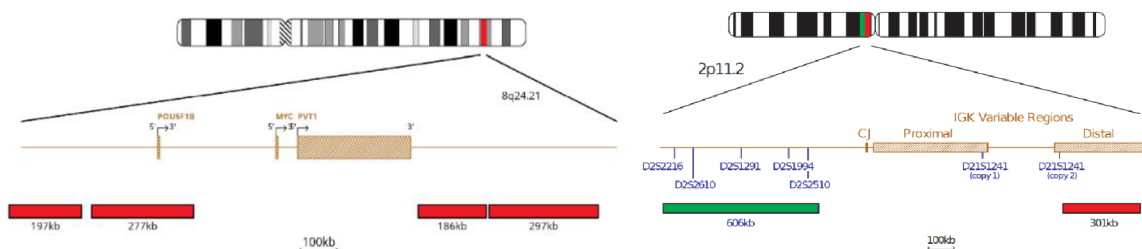
Dvoubarevná sonda pro detekci t(8;22) se skládá z červené oblasti genu *MYC* na lokusu 8q24.21 a zelené části genu *IgL* v oblasti 22q11.21-q11.23. Při cytogenetických změnách může dojít k přestavbám *IgL*, kdy *MYC* zůstává na chromozomu 8 a *IgL* se připojí z 22q11.



Obrázek 12: Genová mapa zobrazující vyšetřovanou oblast genu *MYC* a *IgL* (Převzato z: A Sysmex Group Company, 2024)

- CytoCell myProbes IGK/c-MYC Dual Fusion FISH probe

Sonda používaná pro detekci t(2;8) je dvoubarevná, označena oranžovou a zelenou barvou. Používá se k vyšetření přestaveb lehkého řetězce *IgK*, který je umístěn v normální situaci na 2p11.2 s genem *MYC*, který je v normální situaci na 8q24.21.



Obrázek 13: Genová mapa zobrazující vyšetřovanou oblast genu *MYC* a *IgK* (Převzato z: A Sysmex Group Company, 2024)

Odmývání

24. Druhý den byl odstraněn Rubber cement a krycí sklo. Podložní sklo s preparátem bylo odmyváno 0,4x SSC/0,3% NP40 při 73 °C po dobu 2 minut.
25. Následně bylo odmyváno v 2xSSC/0,1% NP40 při pokojové teplotě po dobu 1 minuty.
26. Po omytí skla byl preparát zamontován pomocí Antifade Counterstain Diluent. Na sklo bylo pipetováno 10 µl Antifade Counterstain Diluent a bylo překryto krycím sklem.

4.3.5 Vyhodnocení

Preparát byl vyhodnocen fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51 s příslušnou sadou fluorescenčních filtrů. Pro danou sondu bylo hodnoceno 50 plazmatických buněk. U každého pacienta byl pořízen záznam hodnocených buněk v programu Neon (IKAROS/ISIS, MetaSystems).

4.4 Separace CD 138+ buněk u MM

Pracovníci v Laboratoři cytogenomiky Hemato-onkologické kliniky separují z dodané KD pacientů s MM CD 138+ (patologické) plazmatické buňky na principu MACS. Pomocí navázané protilátky v koloně umístěné v magnetickém poli separátoru jsou zadrženy CD138+ buňky. Po odstranění kolony z magnetického pole jsou CD 138+ buňky z kolony vymyty a využity k přípravě cytospinového preparátu pro FISH a izolaci DNA. Jedná se o alternativní přístup přípravy buněk, které jsou poté hodnoceny jako u FICTION.

4.4.1 Biologický materiál

- cytospinová skla se separovanými CD 138+ buňkami pacientů s MM

Příprava preparátu pro FISH

1. Byla provedena fixace skla 2x po 10 minutách v Carnoyově roztoku.
2. Kyveta s 1 ml 1M HCl a 99 ml destilované vody byla vyhřáta na 37 °C.
3. Do kyvety bylo přidáno 500 µl pepsinu.
4. Sklo bylo vloženo do kyvety a inkubováno 7 minut.
5. Sklo bylo opláchnuto v 1x PBS po dobu 3 minut.
6. Na sklo bylo nakapáno 50 µl postfixačního roztoku, byl přiložen parafilm a bylo inkubováno 10 minut při pokojové teplotě.
7. Parafilm byl sejmut a sklo bylo inkubováno 3 minuty v PBS.
8. Sklo bylo opláchnuto v ledové etanolové řadě (70%, 80%, 96%) po 2 minutách v každém alkoholu.
9. Sklo bylo usušeno při pokojové teplotě.
10. Byla přidána specifická sonda a sklo se sondou bylo zdenaturováno podle návodu výrobce použité sondy z Tabulky 3.

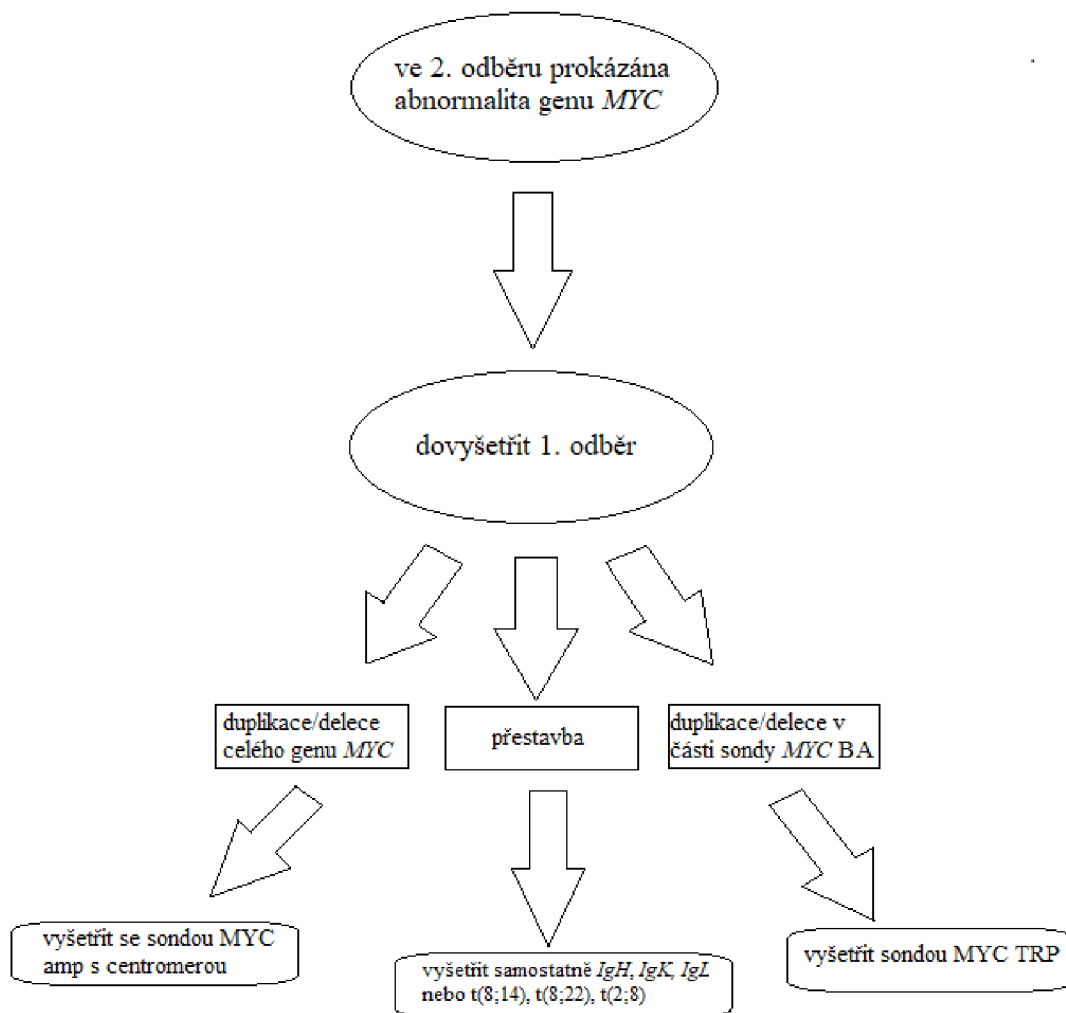
4.4.2 Vyhodnocení

Preparát byl vyhodnocen fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51 s příslušnou sadou fluorescenčních filtrů. Pro danou sondu bylo hodnoceno 50 buněk. U každého pacienta byl pořízen záznam hodnocených buněk v programu Neon (IKAROS/ISIS, Metasystems).

5 VÝSLEDKY

5.1 Retrospektivní a prospektivní vyšetření genu *MYC*

V rámci bakalářské práce bylo vyšetřeno 35 pacientů s diagnózou MM diagnostikovaných a léčených v letech 2005-2023 na Hemato-onkologické klinice FNOL, na které se standardně vyšetřují abnormality genu *MYC* při druhém a dalších následných odběrech KD (v relapsu nebo progresi MM). U prospektivně vyšetřených pacientů byly vyšetřeny abnormality genu *MYC* již při prvním odběru KD. Postup vyšetření genu *MYC* u pacientů s MM probíhal dle schématu na Obrázku 13.



Obrázek 14: Postup retrospektivního vyšetření pacientů s abnormalitami genu *MYC*

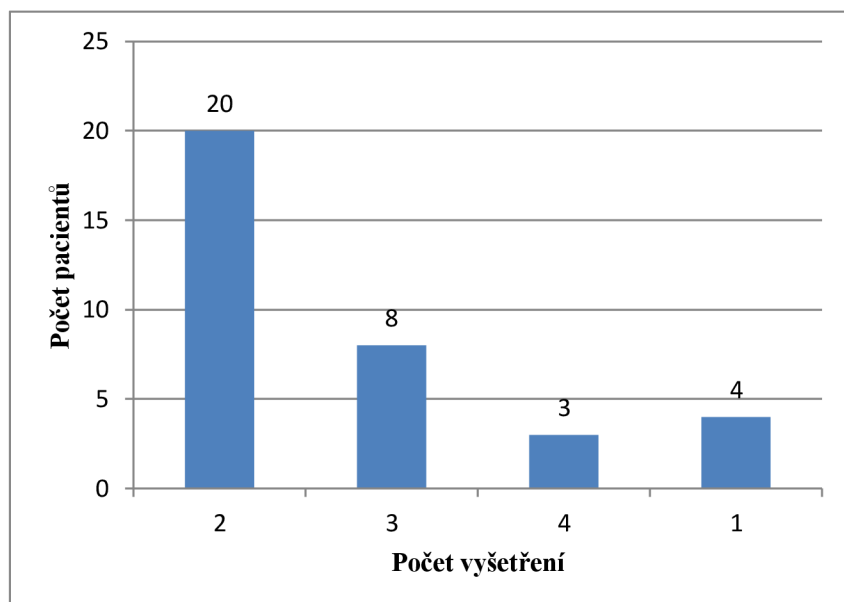
Soubor tvořilo 35 pacientů, u kterých byla prokázána abnormalita genu *MYC* v následujícím odběru. Proto byly zpětně vyšetřeny na přítomnost genu *MYC* předchozí odběry KD. Většina pacientů podstoupila odběry KD opakovaně, což je uvedeno v Grafu 1.

Vyšetření KD pacientů s MM bylo provedeno u 31 pacientů pomocí metody FICTION, u 2 pacientů kombinovaně pomocí MACS a FICTION, u 1 pacienta pomocí MACS a u 1 pacienta pomocí FISH.

Tabulka 4 popisuje počet mužů a žen v souboru, dále zastoupení typů lehkých řetězců Ig a medián a rozmezí věku diagnózy MM u žen a mužů.

Tabulka 4: Souhrnná tabulka pacientů s abnormalitami genu *MYC*

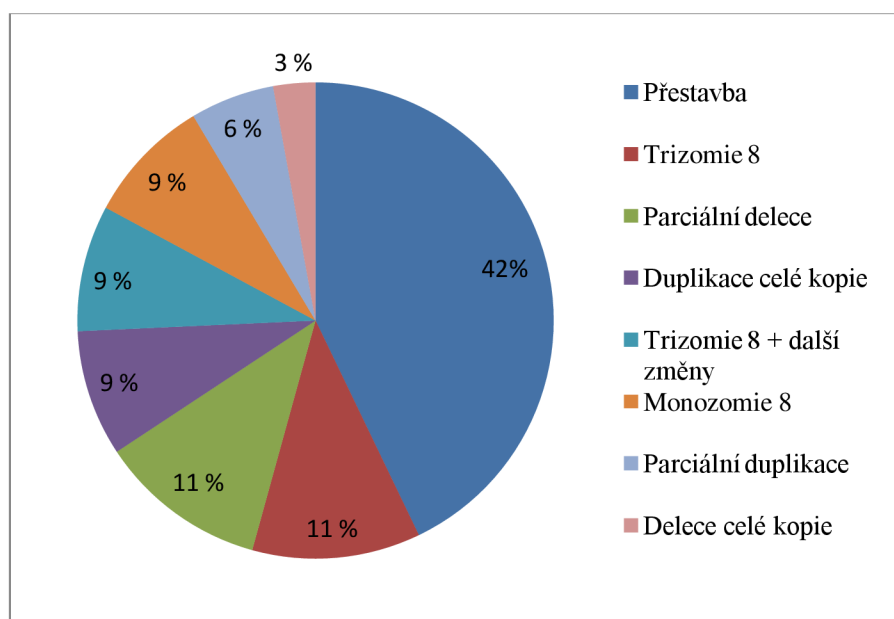
Soubor pacientů s MM		Hodnota
Pohlaví	Muži	16
	Ženy	19
Typ lehkého řetězce	Kappa	23
	Lambda	12
Medián věku (rozmezí)	Muži	68 let (40-77 let)
	Ženy	67 let (43-78 let)



Graf 1: Počet vyšetření odběrů KD provedených u pacientů s abnormalitami genu *MYC*

5.2 Přehled abnormalit genu *MYC* v souboru pacientů

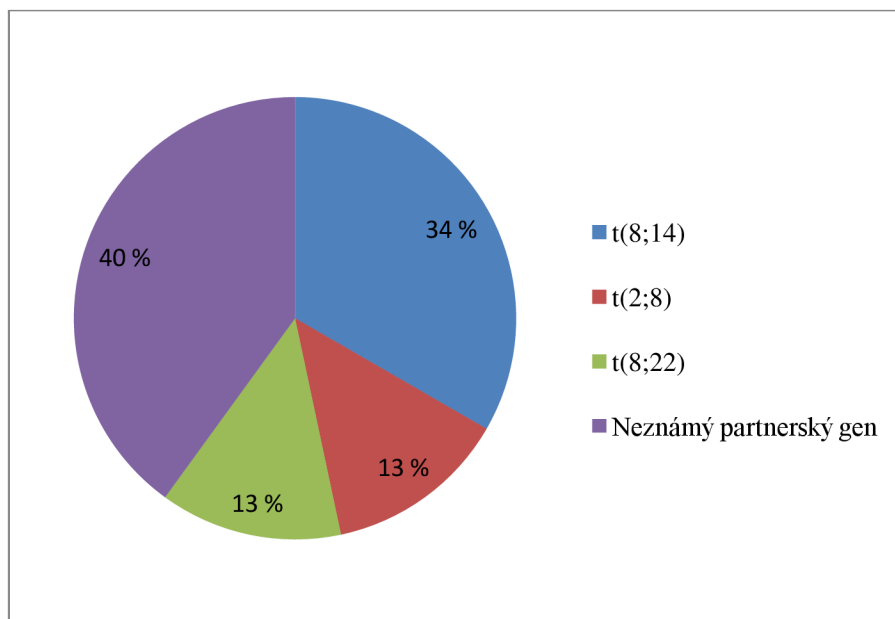
U 35 pacientů byly určeny abnormality genu *MYC*. Přestavba genu *MYC* byla nalezena u 15 (42 %) pacientů. U 4 (11 %) pacientů byla nalezena trizomie chromozomu 8, a u 3 (9 %) trizomie chromozomu 8 s dalšími přídatnými změnami. U 3 (9 %) pacientů byla nalezena monozomie 8. Duplikace celé kopie genu *MYC* byla nalezena u 3 (9 %) pacientů, a parciální duplikace u 2 (6 %) pacientů. Delece celé kopie genu *MYC* byla nalezena u 1 (3 %) pacientů a parciální delece u 4 (11 %) pacientů. Přehled abnormalit genu *MYC* je uveden v Grafu 2.



Graf 2: Abnormality genu *MYC* u souboru pacientů s MM

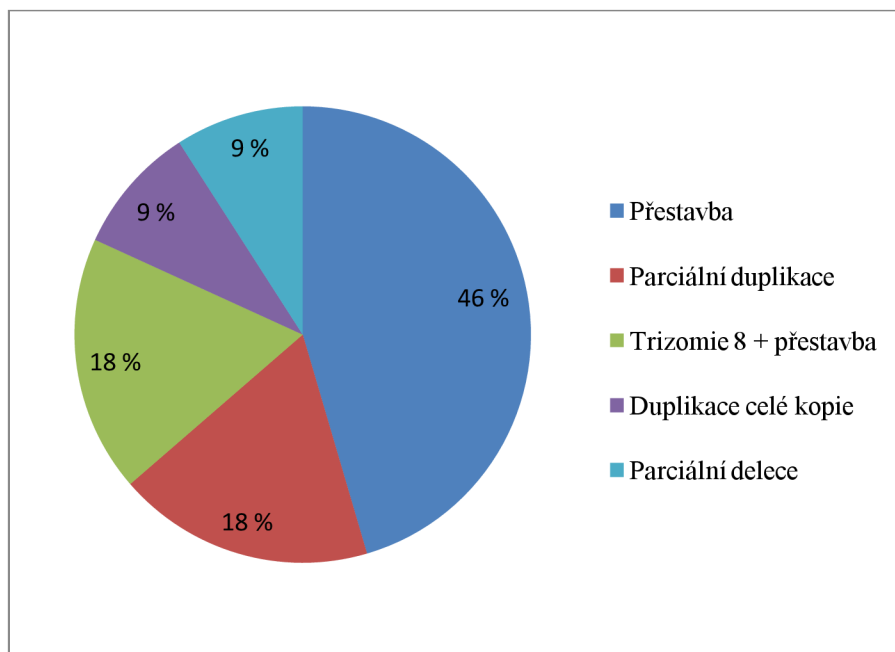
5.3 Translokace zahrnující gen *MYC*

U 15 ze souboru 35 pacientů byla zjištěna přestavba genu *MYC*. Z toho byla u 5 (34 %) pacientů diagnostikována $t(8;14)$, u 2 (13 %) pacientů $t(2;8)$, u 2 (13 %) pacientů $t(8;22)$. Z toho u 1 pacienta (29 v Tabulce 4) došlo k přestavbě genu *MYC* a jeho translokaci na chromozom 22 (prokázáno jinými molekulárně genetickými metodami v Cytogenomické laboratoři), ale nebyla prokázána přestavba genu *IgL* ani fúze genů *IgL* a *MYC* při použití specifické sondy pro $t(8;22)$. U 6 (40 %) pacientů došlo k translokaci s neznámým partnerským genem. Výsledky jsou zobrazeny v Grafu 3.



Graf 3: Přehled translokačních partnerů genu *MYC*

Translokace t(8;14) byla identifikována u celkově 11 (46 %) z 35 pacientů. U 5 pacientů byla zjištěna přestavba genu *MYC*, u 2 pacientů parciální duplikace, u 2 pacientů trizomie chromozomu 8 s přestavbou genu *MYC*. U 1 pacienta byla prokázána duplikace celé kopie genu a u 1 pacienta parciální delece genu *MYC*. Tyto nalezené abnormality jsou vyobrazeny v Grafu 4.



Graf 4: Abnormality genu *MYC* u pacientů s t(8;14)

5.4 Retrospektivní analýza primárních a sekundárních abnormalit genu *MYC*

Retrospektivně bylo vyšetřeno zastoupení změn v genu *MYC* v souboru 31 pacientů s MM. Primární změna genu *MYC* byla nalezena u 23 (66 %) pacientů. U 14 z 23 pacientů byla početní změna v retrospektivně vyšetřeném starším odběru v nižším zastoupení v PB (13 až 66 %), než v jakém byla u dalších odběrů, kde došlo k výraznému zvýšení patologicky změněných PB (30 až 100 %). U 5 pacientů (1, 28, 29, 30, 34 v Tabulce 5) bylo nalezeno téměř stejné a velmi vysoké zastoupení (70 až 100 %) abnormality genu *MYC* jak v DD, tak i při druhém, či případně dalším vyšetření. U 4 pacientů (18, 25, 26 a 32 v Tabulce 5) byla prokázána abnormalita genu *MYC* již v prvním odběru v DD.

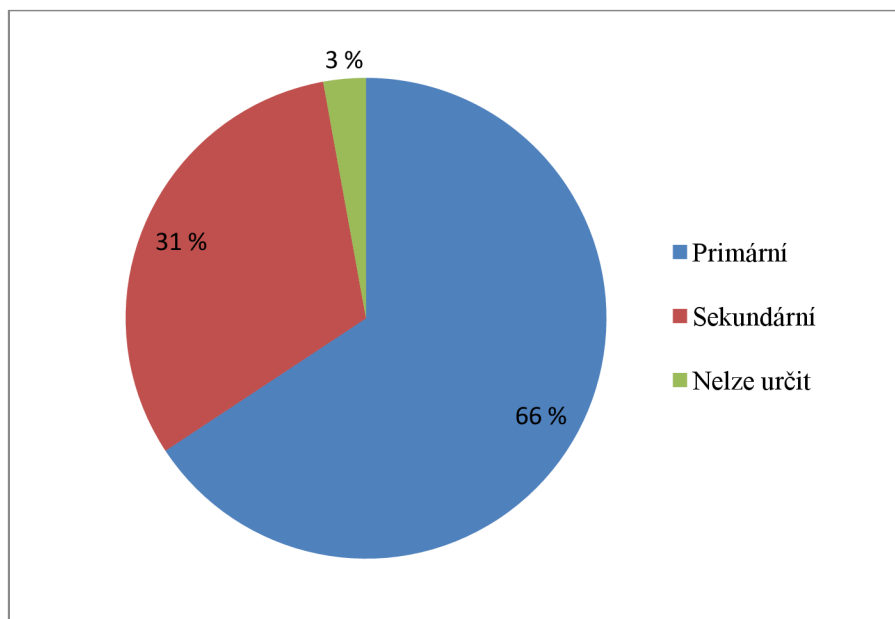
U 11 (31 %) pacientů byla nalezena změna genu *MYC* až v dalších odběrech, tudíž se u nich jednalo o sekundární změnu spojenou s progresí nebo relapsem MM. U pacienta 20 (Tabulka 5) bylo nízké zastoupení abnormalit genu *MYC* po dobu onemocnění, kdežto u pacienta 27 (Tabulka 5) byla zjištěna maximální 100 % hodnota změněných PB ve druhém odběru a na této hladině zůstala po celou dobu onemocnění.

Kvůli malému množství materiálu získaného z odběru KD v DD nebylo možné vyšetřit u 1 (3 %) pacienta (17 v Tabulce 5) primární nebo sekundární původ změny v genu *MYC*.

Procentuální zastoupení abnormalit genu *MYC* v různých odběrech je zaznamenáno v Tabulce 5. Modře označení jsou pacienti s primární změnou. Červeně označení jsou pacienti se sekundární změnou a zeleně je označen pacient, u kterého nebylo možné určit původ změny genu *MYC*. Zastoupení primárních a sekundárních změn genu *MYC* je v Grafu 5.

Tabulka 5: Procentuální zastoupení abnormalit genu *MYC* u pacientů s MM (v 1. až 4. odběru)

Pacient	Odběr 1	Odběr 2	Odběr 3	Odběr 4
1	87 %	100 %	30 %	-
2	0 %	60 %	-	-
3	0 %	64 %	-	-
4	15 %	94 %	90%	-
5	0 %	55 %	-	-
6	20 %	83 %	-	-
7	0 %	70 %	-	-
8	60 %	95 %	-	-
9	40 %	64 %	-	-
10	66 %	90 %	-	-
11	13 %	30 %	-	-
12	0 %	85 %	-	-
13	16 %	52 %	-	-
14	29 %	68 %	-	-
15	0 %	98 %	-	-
16	60 %	100 %	100 %	-
17	-	98 %	74 %	-
18	100 %	-	-	-
19	0 %	90 %	-	-
20	0 %	7 %	15 %	14 %
21	62 %	80 %	-	-
22	0 %	0 %	65 %	-
23	0 %	94 %	-	-
24	60 %	0 %	82 %	-
25	80 %	-	-	-
26	25 %	-	-	-
27	0 %	100 %	100 %	100 %
28	86 %	90 %	100 %	84 %
29	90 %	92 %	-	-
30	90 %	86 %	-	-
31	37 %	90 %	-	-
32	90 %	-	-	-
33	24 %	96 %	-	-
34	70 %	87 %	-	-
35	38 %	75 %	94 %	-

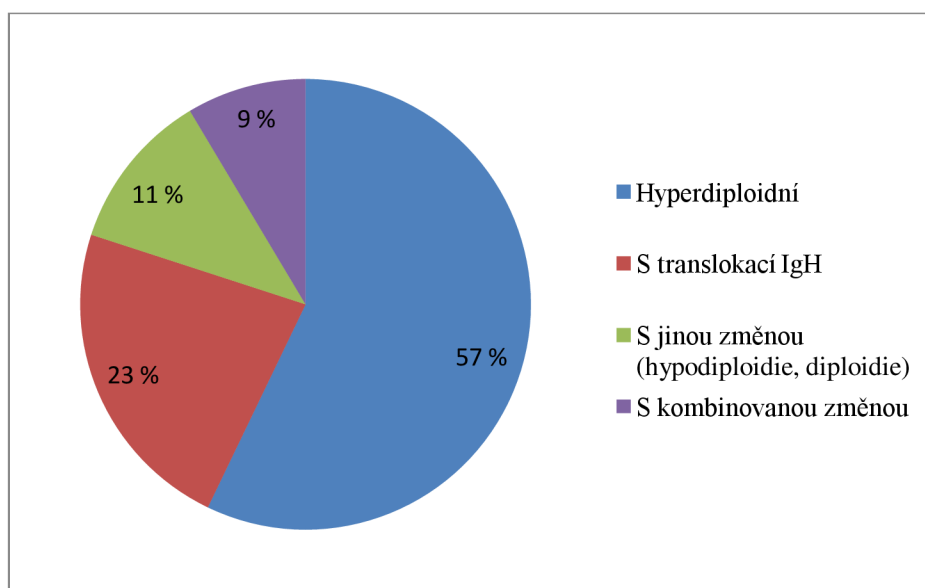


Graf 5: Zastoupení primárních a sekundárních změn u genu *MYC*

5.5 Korelace dalších cytogenetických abnormalit se změnami v genu *MYC*

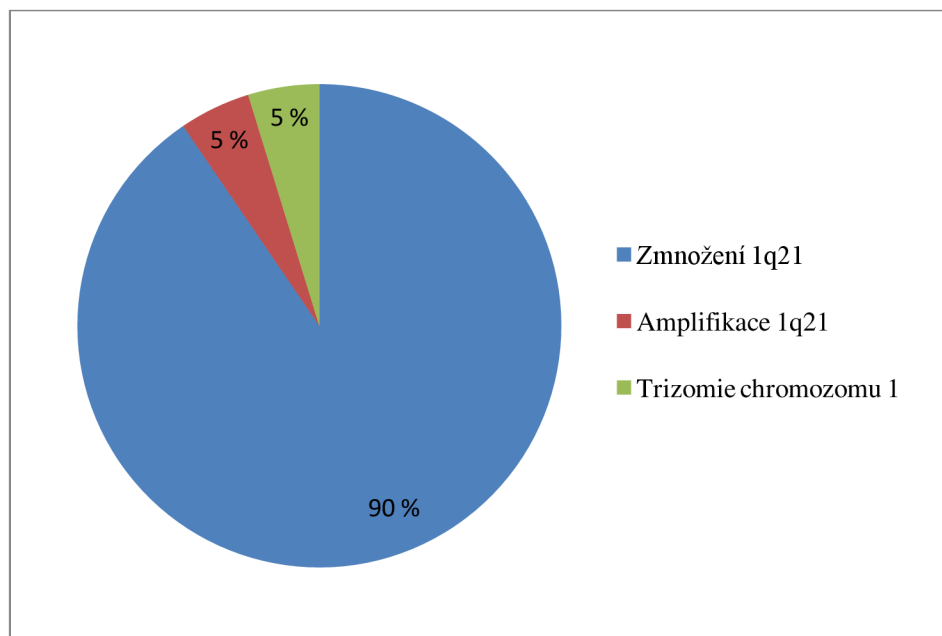
Laboratoř cytogenomiky provádí v rámci rutinních vyšetření také vyšetření dalších cytogenetických abnormalit u pacientů s MM. Výsledky prezentované v Grafu 6 a 7 byly pro posouzení komplexního obrazu genetických změn v souboru převzaty.

Celkem 20 (57 %) pacientů bylo hyperdiploidních, 8 (23 %) pacientů s translokací *IgH* genu: 5x t(11;14), 2x t(4;14) a 1x t(14;20). U 4 (11 %) pacientů byla prokázána jiná změna (3x hypodiploidie a 1x diploidie) a 3 (9 %) pacientů s kombinovanou změnou (hyperdiploidie s t(11;14), diploidie s delecí *IgH*). Popsaná data jsou zobrazena v Grafu 6.



Graf 6: Zastoupení dalších genetických aberací u souboru pacientů s abnormalitou *MYC*

Dále byla hodnocena přítomnost více kopií 1q21, což je u pacientů s MM spojeno s nepříznivou prognózou. Celkem byla abnormalita identifikována u 21 pacientů z 35. Zmnožení 1q21 bylo prokázáno u 19 pacientů, u 1 pacienta byla prokázána amplifikace (7 kopií) a u 1 pacienta byla prokázána trizomie chromozomu 1. Tato data jsou zobrazena v Grafu 7.



Graf 7: Zastoupení abnormalit 1q21 u souboru pacientů s abnormalitou MYC

5.6 Srovnání různých sond u pacientů s delecí/duplikací genu MYC

Pro vyšetření 4 pacientů s delecí v oblasti genu *MYC* bylo použito více sond od různých výrobců. Při použití sondy od firmy Zytovision SPEC MYC Dual Color BA byla prokázána u 3 pacientů celková delece sekvencí přilehlých k 5'konci genu *MYC* (červený signál). U 2 pacientů byla pomocí sondy XL MYC BA a XL MYC BA Triple-color od MetaSystems pozorován velmi malý červený signál, který ukazoval na parciální delecí. U 1 pacienta byla prokázána pomocí sondy XL MYC BA Triple-color od MetaSystems delece jak sekvencí přilehlých k 5'konci genu *MYC*, tak i samotného genu *MYC*. Zachována zůstala oblast sekvencí přilehlých k 5'konci genu *MYC* (zelená část sondy). U posledního pacienta byla pomocí sondy SPEC MYC Dual Color BA prokázána parciální delece červeně naznačené části sondy (oblasti přilehlé 5'konci genu *MYC*). Při použití sond XL MYC BA a XL MYC BA Triple-color od MetaSystems byly pozorovány červené signály standardní velikosti.

Bylo prokázáno, že sondy od různých výrobců zahrnují jinak velkou červeně značenou oblast sekvencí přilehlých k 5'konci genu *MYC*. Sonda od firmy Zytovision nezahrnuje gen

POUF5B1, který leží v bezprostřední blízkosti 5' konce genu *MYC*. Na základě těchto výsledků je možné odvodit, že u pacientů došlo k deleci ve vzdálenějších oblastech před 5' koncem genu *MYC*. Zjištěné změny u pacientů 6, 12, 13 a 15 z Tabulky 5 se srovnáním sond od výrobců Zytovision a MetaSystems jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Srovnání výsledků zjištěných sondami od výrobců Zytovision a MetaSystems u pacientů s abnormalitou genu *MYC*

Pacient	Sonda Zytovision	Abnormalita	Sonda MetaSystems	Abnormalita
6	SPEC MYC Dual Color BA	celková delece sekvencí u 5' konce <i>MYC</i>	XL MYC BA, XL MYC BA Triple- color	parciální delece genu <i>MYC</i>
12	SPEC MYC Dual Color BA	celková delece sekvencí u 5' konce <i>MYC</i>	XL MYC BA, XL MYC BA Triple- color	parciální delece genu <i>MYC</i>
13	SPEC MYC Dual Color BA	celková delece sekvencí u 5' konce <i>MYC</i>	XL MYC BA Triple- color	delece sekvencí u 5' konce <i>MYC</i> a delece genu <i>MYC</i>
15	SPEC MYC Dual Color BA	parciální delece oblasti u 5' konce <i>MYC</i>	XL MYC BA, XL MYC Triple- color	neprokázána

6 DISKUZE

MM je choroba plazmatických buněk, která patří mezi monoklonální gamapatie. Tvoří 1 % všech nádorů a jedná se o druhé nejčastější hemato-onkologické onemocnění. Vyskytuje se častěji u mužů než u žen (Rajkumar, 2016). V současnosti je MM nevléčitelnou nemocí s dobou přežití 8-10 let od diagnózy (Minařík, 2021).

U MM se vyskytují četné cytogenetické abnormality, které mají často komplexní charakter. Podle primárních cytogenetických změn se MM rozděluje na dvě základní skupiny. První skupinou jsou hyperdiploidie charakteristické trizomiemi lichých chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 (Shokripour *et al.*, 2024). Druhou skupinou jsou chromozomální translokace zahrnující *IgH* gen na chromozomu 14. Obě skupiny se mohou překrývat (Türkmen *et al.*, 2014). Sekundárními změnami spojenými s progresí onemocnění jsou například abnormality chromozomu 13, 1q, 1p, 17p, translokace genu *MYC* a přestavba/delece lehkých řetězců *IgK* a *IgL* (Clarke *et al.*, 2024).

Změny genu *MYC* jsou považovány u pacientů s MM za sekundární (Yamamoto *et al.*, 2009). U 15 % pacientů jsou přítomny abnormality genu *MYC* již v DD, v relapsu a progresi jsou nalezeny až u 55 % případů (Avet-Loiseau *et al.*, 2001). Abnormality genu *MYC* jsou buď strukturní (přestavba, mutace) nebo početní (zmnožení, amplifikace, delece), případně jejich kombinace (Sharma *et al.*, 2021).

Mezi metody využívané pro identifikaci genetických abnormalit u MM patří prostá FISH, metody separace PB (MACS a FACS) a následná FISH nebo metoda FICTION. MM patří mezi onemocnění s nízkým zastoupením patologické populace buněk, proto je pomocí FISH prokázán nižší záchyt abnormalit a metoda byla použita jen ve výjimečných případech. Většina pacientů byla vyšetřena metodou FICTION, která umožňuje přesnější identifikaci abnormalit. FICTION lze zároveň využít jak u recentních, tak u archivovaných vzorků KD (Abaza *et al.*, 2015). U recentních odběrů KD byla použita i metoda MACS s následnou FISH.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na analýzu souboru 35 pacientů s MM, u kterých byla prokázána abnormalita genu *MYC*. Většina pacientů (31/35) byla vyšetřena opakovaně s cílem zjistit, zda dochází ke klonálnímu vývoji zjištěných abnormalit genu *MYC* již v DD nebo se jedná o sekundární změnu spojenou s progresí onemocnění, která nebyla v DD nalezena.

Z 35 pacientů v souboru mělo 23 (66 %) pacientů přítomnou abnormalitu genu *MYC* již v DD, ale u většiny z nich pouze v menším subklonu PB. V průběhu onemocnění došlo k výraznému nárůstu myelomových buněk s abnormálním genem *MYC*. Pouze u 11 (31 %) pacientů vznikla abnormalita genu *MYC* nově až sekundárně v progresi či relapsu onemocnění. U 1 (3 %) pacienta nebylo možné původ změny identifikovat. Uvádí se, že 23 až 32 % pacientů má přítomny abnormality genu *MYC* v počátku nemoci, zatímco v progresi jsou přítomny až u 55 % případů (Barwick *et al.*, 2019). Zastoupení v našem souboru pacientů je výrazně vyšší než v literatuře, což může být způsobeno malou velikostí souboru a výběrem pacientů s již identifikovanou abnormalitou v genu *MYC*.

Mezi nejčastěji zjištěné abnormality patří přestavba genu *MYC*, trizomie chromozomu 8, duplikace celé kopie genu *MYC* a parciální duplikace genu *MYC*. Častá je také delece celé kopie genu *MYC*, parciální delece genu *MYC*, a monozomie chromozomu 8.

Přestavba genu *MYC* byla zjištěna u 15 pacientů (42 %). Translokace t(8;14) tvořila 34 % ze všech nalezených translokací, a zároveň 14 % abnormalit u pacientů ze souboru. Translokace zahrnující *IgH* lokus a gen *MYC* se u pacientů s MM vyskytují ve 30 % případů (Rajkumar, 2016). U souboru pacientů byla hodnota výrazně nižší než v literatuře. Translokace t(8;14) nebyla nalezena jen u pacientů s přestavbou *MYC*, ale i u pacientů s jinými změnami (parciální delece/duplikace), což svědčí o heterogenitě přestaveb a sekundárním původu aberací genu *MYC*. Translokace je spojena s progresí onemocnění MM (Angi *et al.*, 2017).

Méně často byla identifikována translokace t(2;8) s *IgK*. Ta byla zjištěna u 13 % pacientů s přestavbou a u 6 % pacientů z celého souboru. Translokace s *IgK* jako partnerským genem byly nalezeny u 5,5 % pacientů ze souboru (Sharma *et al.*, 2021). Zjištěná hodnota byla odpovídající literatuře.

Translokace t(8;22) s genem *IgL* byla zjištěna u 13 % pacientů s přestavbou a celkově u 6 % pacientů z celého souboru. Běžně se t(8;22) vyskytuje u 10 % pacientů (Soliman *et al.*, 2021), což je mírně vyšší výskyt než v tomto souboru. U 1 pacienta se nejednalo o klasickou translokaci s *IgL*, protože k samotné přestavbě *IgL* nedošlo. Přesto však mohlo dojít k deregulaci genu *MYC* silnými zesilovači transkripce, které působí i na velkou vzdálenost. Pacienti s translokací t(8;22) mají výrazně horší prognózu oproti pacientům bez této strukturní abnormality (Barwick *et al.*, 2019).

Translokace s neznámým partnerským genem byla identifikována u 40 % pacientů s přestavbou a u 17 % pacientů z celého souboru. Translokace s jinými partnery než *IgH*, *IgK* a *IgL* byla popisována u 55,7 % pacientů (Sharma *et al.*, 2021). Zjištěná hodnota byla výrazně nižší než hodnota uvedená v literatuře.

Trizomie chromozomu 8 byla zjištěna u 7 (20 %) pacientů, z toho u 3 (9 %) pacientů s přídatnými změnami. V průběhu onemocnění se u 2 pacientů s trizomií chromozomu 8 vyvinula t(8;14). Trizomie chromozomu 8 přispívá k nepříznivému vývoji onemocnění MM (García *et al.*, 2018), což bylo prokázáno i v tomto souboru. U 1 pacienta došlo k dalšímu nárůstu počtu kopií chromozomu 8 a vývoji různých subklonů, což svědčí o nestabilitě genomu. Trizomie chromozomu 8 nepatří mezi nejčastější trizomie a bývá detekována asi u 4 % pacientů (Sharma *et al.*, 2021). Zjištěná hodnota byla mírně vyšší než v literatuře.

Další identifikovanou změnou byla duplikace celé kopie genu *MYC* nebo části genu *MYC* u 5 (15 %) pacientů. U 2 pacientů byla následně prokázána t(8;14), kdy došlo k translokaci celého nebo části genu *MYC* na chromozom 14 do blízkosti genu *IgH*, což svědčí o sekundárním původu t(8;14) (Schieppati *et al.*, 2020).

Delece celého nebo části genu *MYC* byla identifikována u 5 (14 %) pacientů. U těchto pacientů byly použity sondy od různých výrobců a bylo prokázáno, že se tyto sondy liší v délce značené oblasti před 5' koncem genu *MYC*, která bývá nejčastěji deletována. V této oblasti se nachází gen *POU5F1B*, který kóduje transkripční faktor zapojený do procesů kancerogeneze (Walker *et al.*, 2014).

Monozomie chromozomu 8 byla prokázána u 3 (9 %) pacientů. Monozomie spojená s hypodiploidii postihuje nejčastěji chromozomy 13, 14, 16 a 8. Hypodiploidní pacienti vykazují špatný klinický výsledek (Yoshida *et al.*, 2019).

Je známa asociace abnormalit genu *MYC* s hyperdiploidii jako primární změnou, což bylo prokázáno i v tomto souboru pacientů, kde byla identifikována hyperdiploidie u 57 % pacientů s abnormalitou genu *MYC*. Hyperdiploidie je obecně spojována s lepší prognózou a dobrou odpovědí pacientů na léčbu (Shokripour *et al.*, 2024), ale i v této skupině pacientů existuje podskupina s abnormalitami genu *MYC* a horší prognózou.

Zmnožení nebo amplifikace oblasti 1q21 je další abnormalita, která bývá spojena se změnami v genu *MYC*. Nárůst kopií oblasti 1q21 se vyskytuje jako sekundární změna a její zastoupení roste v progresi nebo relapsu onemocnění. Je spojováno s nepříznivou prognózou (Boyle *et al.*, 2023). Zmnožení 1q21 bylo prokázáno u 19 (54 %) pacientů, což je výrazně vyšší

hodnota než v literatuře, kde je nález zmnožení 1q21 u nově diagnostikovaných případů uváděn s 10% výskytem (Rajkumar, 2016).

Změny genu *MYC* jsou relativně časté i jako primární v DD. Jejich analýza proto může být významná v prognostickém rozdělení pacientů. K diagnostice abnormalit genu *MYC* u pacientů s MM je třeba využít všech dostupných metod včetně molekulárních (sekvenování nové generace), aby bylo s velkou přesností identifikováno co nejvíce změn.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sestavení literárního přehledu o mnohočetném myelomu, cytogenetických abnormalitách a významu aberací genu *MYC* u tohoto onemocnění.

V rámci praktické části byly vyšetřeny abnormality genu *MYC* v souboru 35 pacientů s MM v době diagnózy a v relapsu/progresi onemocnění. Následně byly srovnány nalezené aberace. Mezi nejčastěji identifikované abnormality patřila přestavba genu *MYC*. Dále byly nalezeny také delece a duplikace části nebo celého genu *MYC* a početní změny chromozomu 8. Z translokací byla nejvíce zastoupena t(8;14). Ta byla zjištěna nejen u pacientů s přestavbou, ale i u pacientů s duplikací nebo delecí genu *MYC*. Abnormality genu *MYC* byly spojeny také s dalšími cytogenetickými změnami, například s hyperdiploidií a zmnožením oblasti 1q21.

U 66 % pacientů byla abnormalita genu *MYC* prokázána již v době diagnózy jako primární změna. U většiny pacientů však byla prokázána pouze v menším zastoupení a až průběhu onemocnění došlo k nárůstu patologických buněk s abnormalitou genu *MYC*.

Bakalářská práce prokázala význam vyšetřování aberací genu *MYC* již v době diagnózy, což by mohlo vést k přesnější identifikaci prognosticky nepříznivých změn u pacientů s MM.

8 LITERATURA

A Sysmex Group Company, příbalové informace o produktu MPD4480 – CytoCell myProbes IGL/cMYC Dual Fusion FISH Probe, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: <https://www.ogt.com/products/product-search/cytocell-myprobes-igl-cmyc-dual-fusion-fish-probe/>.

A Sysmex Group Company, příbalové informace o produktu MPD4490 – CytoCell myProbes IGK/cMYC Dual Fusion FISH Probe, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: <https://www.ogt.com/products/product-search/cytocell-myprobes-igk-c-myc-dual-fusion-fish-probe/>.

Abaza M. H. H., Soha R. Y., Abeer A. S., Kamal M. G., Hegazy G. A. M., Ibrahim I. R. *et al.* Annaka M. H. L. Detection of 14q32 rearrangements in multiple myeloma, using simultaneous FISH analysis combined with immunofluorescence. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* [online]. 2015, 8(2), 56-63 [navštíveno 1.4.2024]. ISSN 16583876. Dostupné z: doi:10.1016/j.hemonc.2015.04.002.

Abdallah N. Baughn L. B., Rajkumar S. V. *et al.* Implications of MYC Rearrangements in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* [online]. 2020, 2020-12-15, 26(24), 6581-6588 [navštíveno 1.4.2024]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2283.

Adam Z., Hájek R., Mayer J., Ščudla V., Vorlíček J. *et al.* *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. 1. vydání. Brno: Masarykova Univerzita, 1999. ISBN 80-210-2034-2.

Angi M., Vandana K., Sugumaran Y. *et al.* The t(8;14)(q24.1;q32) and its variant translocations: A study of 34 cases. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* [online]. 2017, 10(3), 126-134 [navštíveno 24.4.2024]. ISSN 16583876. Dostupné z: doi:10.1016/j.hemonc.2017.03.002.

Avet-Loiseau, H., Fabienne G., Florence M., Minvielle S., Harousseau J. *et al.* Bataille R. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* [online]. 2001, 98(10), 3082-3086 [navštíveno 29.3.2024]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V98.10.3082.

- Barajas-Mora M. E. *et* Feeney A. J.. Enhancers within the Ig V Gene Region Orchestrate Chromatin Topology and Regulate V Gene Rearrangement Frequency to Shape the B Cell Receptor Repertoire Specificities. *The Journal of Immunology* [online]. 2023, 2023-12-01, 211(11), 1613-1622 [navštíveno 2.4.2024]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.2300261.
- Barwick B. G., Neri P., Bahlis N. J. *et al.* Multiple myeloma immunoglobulin lambda translocations portend poor prognosis. *Nature Communications* [online]. 2019, 10(1), 2-4 [navštíveno 25.4.2024]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-09555-6.
- Bates S. E. Classical Cytogenetics: Karyotyping Techniques. In: *Human Pluripotent Stem Cells* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, s. 177-190 [navštíveno 11.2.2024]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-200-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-201-4_13.
- Bonner W. A., Hulett H. R., Sweet R. G. *et* Herzenberg L.A. Fluorescence Activated Cell Sorting. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1972, 1972-03-01, 43(3), 404-409 [navštíveno 29.3.2024]. ISSN 0034-6748. Dostupné z: doi:10.1063/1.1685647.
- Boyle E. M., Davies F. E., Leleu X. *et* Morgan G. J. Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica* [online]. 2014, 2014-03-31, 99(4), 605-612 [navštíveno 22.2.2024]. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2013.097907.
- Boyle, E. M., Blaney P., Stoeckle J. H. *et al.* Multiomic Mapping of Acquired Chromosome 1 Copy-Number and Structural Variants to Identify Therapeutic Vulnerabilities in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* [online]. 2023, 2023-10-02, 29(19), 3901-3913 [navštíveno 12.3.2024]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-3209.
- Castaneda O. *et* Baz R. Multiple Myeloma Genomics – A Concise Review. *Acta Medica Academica* [online]. 2019, 2019-06-26, 48(1), 57-67 [navštíveno 15.4.2024]. ISSN 1840-2879. Dostupné z: doi:10.5644/ama2006-124.242.
- Clarke S. E., Fuller K. A. *et* Erber W. N. Chromosomal defects in multiple myeloma. *Blood Reviews* [online]. 2024, 64(101168), 3-11 [navštíveno 12.3.2024]. ISSN 0268960X. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2024.101168.

Dhanasekaran R., Deutzmann A., Mahauad-Fernandez W. D., Hansen A. S., Gouw A. M. *et* Felsher D. W. The MYC oncogene – the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nature Reviews Clinical Oncology* [online]. 2022, 19(1), 23-36 [navštíveno 12.3.2024]. ISSN 1759-4774. Dostupné z: doi:10.1038/s41571-021-00549-2.

Fišerová A., Hájek R. *et* Doubek M. Imunomagnetická separace myelomových buněk. *Klinická onkologie* [online]. Brno: ApS BRNO, 2001, 14(2), 46-50 [navštíveno 25.3.2024]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2001-04-15-2/imunomagneticka-separace-myelomovych-bunek/>.

Fu Q., Xie S., Chen J. *et* Huang H. (2021). Modified Culture System and Combination of FICTION Could Increase the Detection Rate of Abnormalities in Multiple Myeloma. *Annals of clinical and laboratory science*, 51(1), 61–72.

García R., Chen W *et* Koduru P. Clinical impact of MYC abnormalities in plasma cell myeloma. *Cancer Genetics* [online]. 2018, 228-229(6), 115-126 [navštíveno 25.4.2024]. ISSN 22107762. Dostupné z: doi:10.1016/j.cancergen.2018.10.007.

Chappell S. A., Lequesne J. P. C., Paulin F. E. M. *et al.* A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: A novel mechanism of oncogene deregulation. *Oncogene* [online]. 2000, 2000-09-07, 19(38), 4437-4440 [navštíveno 7.4.2024]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1203791.

Iorgulescu B. J., Medeiros J. L. *et* Patel K. P. Predictive and prognostic molecular biomarkers in lymphomas. *Pathology* [online]. 2024, 56(2), 239-258 [navštíveno 2.4.2024]. ISSN 00313025. Dostupné z: doi:10.1016/j.pathol.2023.12.001.

Jelínek T., Všianská P. *et* Hájek R. Monoklonální protilátky v léčbě mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes*. Společnost pro transfúzní lékařství a Česká hematologická společnost ČLS JEP, 2015, 21/2015(2), 74-81. ISSN 1213-5763.

Kuru C. İ., Ulucan-Karnak F., Dayioğlu B., Şahinler M., Şendemir A. *et* Akgöl S. Affinity-Based Magnetic Nanoparticle Development for Cancer Stem Cell Isolation. *Polymers* [online]. 2024, 16(2), 196 [navštíveno 1.4.2024]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym16020196.

Mačák J. *et* Mačáková J. *Patologie*. 3., doplněné a přepracované vydání. Praha: Grada Publishing, 2022. ISBN 978-80-271-3507-3.

MetaSystems Probes, příbalové informace o produktu D-6008-100-OG – XL MYC AMP, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: <https://metasystems-probes.com/site/templates/images/probes/INSERTS/INS-EN/INS-D-6008-100-OG-EN.pdf>.

MetaSystems Probes, příbalové informace o produktu D-6023-100-OG – XL MYC BA, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: <https://metasystems-probes.com/site/templates/images/probes/INSERTS/INS-EN/INS-D-6023-100-OG-EN.pdf>.

MetaSystems Probes, příbalové informace o produktu D-6030-100-TC – XL MYC BA Triple-color, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: <https://metasystems-probes.com/site/templates/images/probes/INSERTS/INS-EN/INS-D-6030-100-TC-EN.pdf>.

Mičková P., Balcárková J., Pika T., Ščudla V., Bačovský J., Minařík J., Nevimová K. *et* Jarošová M. Delece TP53 u nemocných s mnohočetným myelomem a monoklonální gamapatií nejistého významu – molekulárně cytogenetická analýza souboru 84 nemocných. *Transfúze a hematologie dnes*. 2014, 20(1/2014), 32. ISSN 1213-5763.

Minařík J. Léčba mnohočetného myelomu v roce 2021. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2021, 35(3), 70-77 [navštíveno 1.4.2024]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2021/03/04.pdf>.

Mlynarčíková M., Balcárková J., Mičková P. *et al.* Molecular Cytogenetic Analysis of Chromosome 8 Aberrations in Patients With Multiple Myeloma Examined in 2 Different Stages, at Diagnosis and at Progression/Relapse. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* [online]. 2016, 16(6), 358-365 [navštíveno 15.4.2024]. ISSN 21522650. Dostupné z: doi:10.1016/j.clml.2016.02.038.

Oracki S. A., Walker J. A., Hibbs M. L., Corcoran L. M. *et* Tarlinton D. M. Plasma cell development and survival. *Immunological Reviews* [online]. 2010, 237(1), 140-159 [navštíveno 22.2.2024]. ISSN 0105-2896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00940.x.

Petruželka L. *et* Konopásek B. *Klinická onkologie*. Praha: Karolinum, 2003. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0395-0.

Popek-Marciniak S., Styk W., Wojciewska-Litwin M. *et al.* Association of Chromosome 17 Aneuploidy, TP53 Deletion, Expression and Its rs1042522 Variant with Multiple Myeloma Risk and Response to Thalidomide/Bortezomib Treatment. *Cancers* [online]. 2023, 15(19), 1-2 [navštíveno 12.3.2024]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers15194747.

Pospíšilová Š., Dvořáková D. et Mayer J. *Molekulární hematologie*. Praha: Galén, c2013. ISBN: 978-80-7262-942-8.

Raimondi S. C. Fluorescence in Situ Hybridization: Molecular Probes for Diagnosis of Pediatric Neoplastic Diseases. *Cancer Investigation* [online]. 2009, 2009-06-11, 18(2),135-147 [navštíveno 22.2.2024]. ISSN 0735-7907. Dostupné z: doi:10.3109/07357900009038245.

Rajkumar S. V. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology* [online]. 2016, 91(7), 719-734 [navštíveno 2.4.2024]. ISSN 0361-8609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.24402.

Rajkumar, S. V. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology* [online]. 2022, 97(8), 1086-1107 [navštíveno 12.3.2024]. ISSN 0361-8609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.26590.

Rohoň P. *Nové možnosti v léčbě vybraných hematologických onemocnění*. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-4220-8.

Roth L. M., Czernobilsky B., Akgul M. et Cheng L. Gonadoblastoma in individuals with a normal karyotype and no evidence of a disorder of sex development. *Pathology* [online]. 2020, 52(5), 605-607 [navštíveno 23.2.2024]. ISSN 00313025. Dostupné z: doi:10.1016/j.pathol.2020.04.01.

Sharma N., Smadbeck J. B., Abdallah N. et al. The Prognostic Role of MYC Structural Variants Identified by NGS and FISH in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* [online]. 2021, 2021-10-01, 27(19), 5430-5439 [navštíveno 29.3.2024]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-0005.

Shokripour M., Hosseini S. E., Omidifar N., Mokhtari M. et Safaei A. Cytogenetic, Clinical, Hematologic, Demographic, Immunohistochemical, and Flow Cytometry Characteristics of Patients with Plasma Cell Neoplasm in Five Years: A First Report from Iran. *Iran Journal of Medical Sciences* [online]. 2024, 49(2), 77-87 [navštíveno 1.4.2024]. Dostupné z: doi:10.30476/IJMS.2023.96892.2855.

Schieppati F., Balzarini P., Fisogni S. et al. An increase in MYC copy number has a progressive negative prognostic impact in patients with diffuse large B-cell and high-grade lymphoma, who may benefit from intensified treatment regimens. *Haematologica* [online]. 2020, 2020-05-01, 105(5), 1369-1378 [navštíveno 8.4.2024]. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2019.223891.

Soliman A. M., Das S. *et* Teoh S. L. Next-Generation Biomarkers in Multiple Myeloma: Understanding the Molecular Basis for Potential Use in Diagnosis and Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(14), 2-14 [navštíveno 22.4.2024]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22147470.

Tchinda J., Volpert S., Kropff M., Berdel W. E., Kienast J., Meinhardt F. *et* Horst J. Frequent Gains of the Short Arm of Chromosome 9 in Multiple Myeloma With Normal G-Banded Karyotype Detected by Comparative Genomic Hybridization. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 2004, 2004-12-01, 122(6), 875-882 [navštíveno 11.3.2024]. ISSN 0002-9173. Dostupné z: doi:10.1309/5KWKP6UKGNXXHMYH.

Türkmen S., Binder A., Gerlach A., Niehage S., Melissari M. T., Inandiklioglu N., Dörken B. *et* Burmeister T. High prevalence of immunoglobulin light chain gene aberrations as revealed by FISH in multiple myeloma and MGUS. *Genes, Chromosomes and Cancer* [online]. 2014, 53(8), 650-656 [navštíveno 9.3.2024]. ISSN 1045-2257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc.22175.

Walker B. A. The Chromosome 13 Conundrum in Multiple Myeloma. *Blood Cancer Discovery* [online]. 2020, 2020-07-01, 1(1), 16-17 [navštíveno 12.3.2024]. ISSN 2643-3230. Dostupné z: doi:10.1158/2643-3249.BCD-20-0081.

Walker B. A., Wardell C. P., Brioli A. *et al.* Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer Journal* [online]. 2014, 4(3), e191-e191 [navštíveno 15.4.2024]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2014.13.

Wootla B., Denic A. *et* Rodriguez M. Polyclonal and Monoclonal Antibodies in Clinic. In: STEINITZ, Michael, ed. *Human Monoclonal Antibodies* [online]. 1. Totowa, NJ: Humana Press, 2014, s. 79-110 [navštíveno 9.3.2024]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-585-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-586-6_5.

Yamamoto Y., Konoike Y., Nakamine H., Nakamura S., Morii T. *et* Kimura H.. Multiple Myeloma with a Variant Burkitt-type Translocation, t(2;8)(p12;q24), Associated with Hyperammonemia. *Internal Medicine* [online]. 2009, 48(14), 1239-1242 [navštíveno 29.3.2024]. ISSN 0918-2918. Dostupné z: doi:10.2169/internalmedicine.48.1298.

Yoshida T., Ri M., Fujinami H. *et al.* Impact of chromosomal abnormalities on the efficacy of lenalidomide plus dexamethasone treatment in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *International Journal of Hematology* [online]. 2019, 110(2), 228-236 [navštíveno 20.4.2024]. ISSN 0925-5710. Dostupné z: doi:10.1007/s12185-019-02669-z.

Zeidler R., Lipp M., Joos S., Delecluse H., Bornkamm G. W., Klobeck G., Vuillaume M. *et* Lenoir G. M. Breakpoints of burkitt's lymphoma t(8;22) translocations map within a distance of 300 kb downstream of MYC. *Genes, Chromosomes and Cancer* [online]. 1994, 9(4), 282-287 [navštíveno 28.3.2024]. ISSN 1045-2257. Dostupné z: doi:10.1002/gcc.2870090408.

Zytovision Molecular diagnostics simplified, příbalové informace o produktu Z-2090-50 – ZytoLight[®] SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: https://www.zytovision.com/downloads_products/datasheets/z-2090-ce-ivd.pdf.

Zytovision Molecular diagnostics simplified, příbalové informace o produktu Z-2288-50 – ZytoLight[®] SPEC IGK Dual Color Break Apart Probe, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: https://www.zytovision.com/downloads_products/datasheets/z-2288-ce-ivd.pdf.

Zytovision Molecular diagnostics simplified, příbalové informace o produktu Z-2286-50 – ZytoLight[®] SPEC IGL Dual Color Break Apart Probe, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: https://www.zytovision.com/downloads_products/datasheets/z-2286-ce-ivd.pdf.

Zytovision Molecular diagnostics simplified, příbalové informace o produktu Z-2105-50 – ZytoLight[®] SPEC MYC/IGH Dual Color Fusion Probe, 2024 [online] [navštíveno 25.2.2024]. Dostupné z: https://www.zytovision.com/downloads_products/datasheets/z-2105-ce-ivd.pdf.