

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2021**

**Bc. Tereza Křivánková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Molekulárně cytogenetická analýza u pacientů  
s AL amyloidózou**

**Diplomová práce**

**Bc. Tereza Křivánková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Tereza KŘIVÁNKOVÁ  
Osobní číslo: R190613  
Studijní program: N1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Molekulárně cytogenetická analýza u pacientů s AL amyloidózou  
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

AL amyloidóza je vzácné onemocnění, které patří mezi monoklonální gamapatie a je způsobené klonální proliferací plazmatických buněk. U pacientů s AL amyloidózou se vyskytují rekurentní cytogenetické změny, zejména t(11;14)(q13;q32) a hyperdiploidie. Detekce cytogenetických změn v plazmatických buňkách je obtížná, proto se využívá metody FICTION (imunofluorescenční detekce plazmatických buněk v kombinaci s fluorescenční *in situ* hybridizací) a hodnotí se pouze patologické buňky.

1. Cílem diplomové práce je vypracování literárního přehledu o AL amyloidóze a cytogenetických změnách.
2. Zpracování, kultivace a vyšetření buněk kostní dřeně metodou FICTION.
3. Retrospektivní a prospektivní vyšetření souboru pacientů s AL amyloidózou diagnostikovaných a léčených na Hemato-onkologické klinice FNOL.
4. Statistické zhodnocení nalezených cytogenetických změn v souboru pacientů s AL amyloidózou.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Ryšavá R. Systémové amyloidózy a jejich léčba. Maxdorf, 2013 ISBN 978-80-7345-341-1.

Študla V. *et al*: Diagnostika a stratifikace systémové AL amyloidózy ve světle Doporučení České myelomové skupiny 2013. *Klin. Biochem. Metab.*, 22 (43), 2014, No. 2, 49-60.

Muchtar E. *et al*: Interphase fluorescence in situ hybridization in untreated AL amyloidosis has an independent prognostic impact by abnormality type and treatment category. *Leukemia*. 2017 Jul;31(7):1562-1569.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Jana Balcárková, Ph.D.  
Hemato-onkologická klinika



Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

LS.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan



01-11-2019

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. listopadu 2018

## **Bibliografické údaje + SOUHRN**

Jméno a příjmení autora: Bc. Tereza Křivánková

Název práce: Molekulárně cytogenetická analýza u pacientů s AL amyloidózou

Typ práce: Diplomová práce

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

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

Rok obhajoby práce: 2021

Abstrakt:

Diplomová práce se zabývá molekulárně cytogenetickou analýzou AL amyloidózy. Jedná se o vzácné onemocnění charakterizované cytogenetickými změnami, které jsou obtížně detekovatelné klasickými cytogenetickými metodami, proto byla k analýze použita metoda FICTION. Soubor tvořilo 42 pacientů s AL amyloidózou diagnostikovanou na základě pozitivního nálezu amyloidu v postižené tkáni a dalších kritériích stanovených pro tuto chorobu. Pacienti byli vyšetřeni v letech 2019–2021. Retrospektivně bylo vyšetřeno 18 pacientů a 24 pacientů bylo vyšetřeno prospektivně, z čehož u 10 pacientů byl souběžně diagnostikován i mnohočetný myelom. Metodou FICTION byly analyzovány geny *IgH*, *RBI*, *TP53* a oblast 1q21. Cytogenetické změny byly nalezeny u 38 z 42 pacientů. Nejčastěji se jednalo o změnu v *IgH* genu (31 pacientů), u 17 pacientů byla prokázána t(11;14). Dále se jednalo o delecii *RBI* genu, která byla potvrzena u 13 pacientů v kombinaci se změnou v *IgH* a o zmnožení oblasti 1q21 u 12 pacientů, které bylo přítomno v 83,3 % v kombinaci se změnou *IgH*. Tato diplomová práce také prokázala význam metody FICTION v detekci cytogenetických změn u pacientů s AL amyloidózou.

Klíčová slova: AL amyloidóza, imunofluorescenční detekce plazmatických buněk v kombinaci s fluorescenční *in situ* hybridizací (FICTION), plazmatická buňka, volné lehké řetězce (FLC)

Počet stran: 69

Počet příloh: -

Jazyk: Čeština

## **Bibliographical identification + SUMMARY**

Author's first name and surname: Bc. Tereza Křivánková

Title: Molecular and cytogenetic analysis in patients with AL amyloidosis

Type of thesis: Master thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Mgr. Jana Balcárková, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Abstract:

The diploma thesis deals with molecular cytogenetic analysis of AL amyloidosis. It is a rare disease characterized by cytogenetic changes, which are difficult to detect by classical cytogenetic methods, so the FICTION method was used for analysis. The cohort of 42 patients with AL amyloidosis based on histological proof of amyloid in affected tissue and other important factors for this disease, was examined in 2019 – 2021. This study retrospectively analyzed 18 patients and prospectively 24 patients, 10 patients have concurrent multiple myeloma. All patients were investigated by FICTION method for abnormalities of *IgH*, *RBI*, *TP53* genes and 1q21 region. Cytogenetic changes were found in 30 out of 42 patients. The most frequently detected aberration was the abnormality of *IgH* gene (31 patients). In 17 patients t(11; 14) was found. The deletion of *RBI* gene was observed in 13 patients with concomitant abnormality of *IgH* gene. Gain of 1q21 region was detected in 12 patients, mostly (83,3 %) with abnormality of *IgH* gene. This diploma thesis also proved the importance of the FICTION method in the detection of cytogenetic changes in patients with AL amyloidosis.

Keywords: AL amyloidosis, immunofluorescence detection of plasma cells in combination with fluorescence *in situ* hybridization (FICTION), plasmatic cell, free light chains (FLC)

Number of pages: 69

Number of appendices: -

Language: Czech

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

V Olomouci dne .....

.....

Bc. Tereza Křivánková

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat paní Mgr. Janě Balcárkové, Ph.D. za její odborné rady, vstřícný přístup, čas a trpělivost při zpracování mé diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky FNOL za pomoc při provádění experimentů a za skvělé laboratorní zázemí. Práce vznikla za finanční podpory projektu IGA\_LF\_2021\_001.



## Obsah

1	ÚVOD .....	1
2	CÍLE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	Hematopoéza .....	3
3.2	B-lymfocyty .....	5
3.2.1	Struktura Imunoglobulinu .....	5
3.2.2	Přeskupování genových segmentů .....	6
3.2.3	VDJ rekombinace .....	6
3.3	Monoklonální gamapatie .....	9
3.3.1	MGUS .....	10
3.3.2	Solitární plazmocytom .....	12
3.3.3	Doutňající mnohočetný myelom (SMM) .....	12
3.3.4	Mnohočetný myelom .....	12
3.3.5	Waldenströmova makroglobulinemie .....	13
3.3.6	AL amyloidóza .....	14
3.4	Systémové amyloidózy .....	14
3.4.1	Patogeneze .....	14
3.4.2	AA amyloidóza .....	15
3.4.3	Hereditární amyloidóza .....	15
3.4.4	AL amyloidóza .....	15
3.4.5	Klinické projevy a diagnostika .....	16
3.4.6	Kritéria stanovení diagnózy .....	18
3.4.7	Terapie .....	20
3.5	Cytogenetické abnormality .....	20
3.5.1	Delece <i>RBI</i> genu .....	23
3.5.2	Abnormality chromozomu 1 .....	23

3.5.3	Delece genu <i>TP53</i> .....	24
3.5.4	Hyperdiploidie .....	24
3.6	Možnosti detekce změn u AL amyloidóz .....	24
3.6.1	FISH .....	24
3.6.2	Metody detekce plazmatických buněk .....	25
3.6.3	MACS a FACS .....	25
3.6.4	Array komparativní genomová hybridizace (aCGH) .....	26
3.6.5	Sekvenování nové generace .....	26
4	MATERIÁL A METODY .....	27
4.1	Biologický materiál .....	27
4.2	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	27
4.3	Použité sondy .....	32
4.4	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	38
4.5	Laboratorní pomůcky .....	39
4.6	Použité chemikálie a roztoky .....	40
4.7	Statistická analýza dat .....	43
5	VÝSLEDKY .....	44
5.1	Změny v celkovém souboru pacientů .....	46
5.1.1	Změny <i>IgH</i> genu .....	47
5.1.2	Delece <i>RBI</i> genu .....	49
5.1.3	Abnormality chromozomu 1 .....	50
5.1.4	Delece <i>TP53</i> genu .....	51
5.1.5	Celková doba přežití .....	51
5.1.6	Retrospektivní analýza .....	52
5.1.7	Prospektivní analýza .....	53
5.1.8	Pacienti s AL amyloidózou a současně s MM .....	55
6	DISKUZE .....	56

7	ZÁVĚR.....	59
8	LITERATURA.....	60

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

CRAB	hyperkalcemie, selhání ledvin, anémie, postižení kostí ( <i>calcium, renal failure, anemia, bone</i> )
FICTION	imunofluorescenční detekce plazmatických buněk v kombinaci s fluorescenční <i>in situ</i> hybridizací ( <i>fluorescence immunophenotyping and fluorescence in situ hybridization</i> )
FLC	volné lehké řetězce ( <i>free light chains</i> )
Ig	imunoglobulin
KD	kostní dřev
MG	monoklonální gamapatie
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu ( <i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i> )
MM	mnohočetný myelom
PB	plazmatická buňka
SMM	doutnající mnohočetný myelom ( <i>smoldering multiple myeloma</i> )
SWM	doutnající Waldenströмова makroglobulinemie ( <i>smoldering Waldenström's macroglobulinemia</i> )
WM	Waldenströмова makroglobulinemie

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek č. 1.:</b> Schéma diferenciacie mateřské kmenové buňky do myeloidní a lymfoidní linie při hematopoéze.....	4
<b>Obrázek č. 2.:</b> Organizace zárodečné linie lidských imunoglobulinových lokusů těžkého řetězce a dvou variant lehkého řetězce.....	6
<b>Obrázek č. 3.:</b> Schematicky znázorněné procesy probíhající při přeskupování genových komplexů pro těžké řetězce imunoglobulinů.....	8
<b>Obrázek č. 4.:</b> Exprese Ig v průběhu zrání B-lymfocytů.....	9
<b>Obrázek č. 5.:</b> Elektroforetické profily sérových proteinů pacienta s MGUS a pacienta s normálními hodnotami.....	10
<b>Obrázek č. 6.:</b> Možnosti přechodu MGUS do dalších typů monoklonálních gamapatií.....	11
<b>Obrázek č. 7.:</b> Podmínky přechodu MGUS do dalších typů monoklonálních gamapatií s charakteristickými klinickými projevy.....	13
<b>Obrázek č. 8.:</b> Křivky celkového přežití od stanovení diagnózy.....	17
<b>Obrázek č. 9.:</b> Amyloidová depozita v kůži barvená Kongo červení vykazující dichroismus.....	18
<b>Obrázek č. 10.:</b> Diagnostický postup při biopsii systémových amyloidóz.....	19
<b>Obrázek č. 11.:</b> Schématické znázornění translokace t(11;14)(q13;q32).....	22
<b>Obrázek č. 12.:</b> Schématický postup vyšetření vzorků pacientů s AL amyloidózou s využitím základních FISH sond.....	27
<b>Obrázek č. 13.:</b> Mapa sondy IgH (14q32) Break.....	33
<b>Obrázek č. 14.:</b> Mapa sondy ZytoLight SPEC IgH Dual Color Break Apart Probe.....	33
<b>Obrázek č. 15.:</b> Mapa sondy CCND1/IgH t(11;14) Fusion.....	34
<b>Obrázek č. 16:</b> Mapa sondy ZytoLight FGFR3/IgH t(4;14) Dual Color Dual Fusion Probe.....	34

<b>Obrázek č. 17.:</b> Mapa sondy RB1 (13q14)/RCAN1 (21q22).....	35
<b>Obrázek č. 18.:</b> Mapa sondy Cytotest RB1/CCP15 FISH Probe Kit.....	35
<b>Obrázek č. 19.:</b> Mapa sondy 1q21/SRD (1p36).....	36
<b>Obrázek č. 20.:</b> Mapa sondy ZytoLight SPEC CKS1B/CDKN2C Dual Color Probe.....	36
<b>Obrázek č. 21.:</b> Mapa sondy DLEU1 (13q14)/TP53 (17p13).....	37
<b>Obrázek č. 22.:</b> Mapa sondy TP53 (17p13)/MPO (17q22) “ISO 17q”.....	37
<b>Obrázek č. 23.:</b> Mapa sondy ZytoLight SPEC TP53/CEN 17 Dual Color Probe.....	38
<b>Obrázek č. 24.:</b> Výsledek vyšetření metodou FICTION se sondou IgH (14q32) Break (Kreatech).....	48
<b>Obrázek č. 25.:</b> Výsledek vyšetření metodou FICTION se sondou CCND1/IgH t(11;14) Fusion (Kreatech).....	49
<b>Obrázek č. 26.:</b> Výsledek vyšetření metodou FICTION se sondou RB1/CCP15 FISH Probe Kit (Cytotest).....	50
<b>Obrázek č. 27.:</b> Výsledek vyšetření metodou FICTION se sondou 1q21/SRD (1p36) (Kreatech).....	51
<b>Obrázek č. 28.:</b> Celkové přežívání pacientů s t(11;14) a pacientů s jinou změnou nebo beze změn.....	52

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf č. 1.:</b> Zastoupení jednotlivých cytogenetických změn v souboru 42 pacientů s AL amyloidózou vyšetřovaných metodou FICTION.....	47
<b>Graf č. 2:</b> Zastoupení jednotlivých typů translokací u přestavby <i>IgH</i> .....	48
<b>Graf č. 3.:</b> Zastoupení jednotlivých cytogenetických změn u skupiny 18 pacientů vyšetřovaných retrospektivně.....	53
<b>Graf č. 4.:</b> Zastoupení jednotlivých cytogenetických změn u skupiny 24 pacientů vyšetřovaných prospektivně.....	54
<b>Graf č. 5.:</b> Zastoupení jednotlivých cytogenetických změn u skupiny 10 pacientů se souběžnou MM.....	55

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka č. 1.:</b> Porovnání diagnostických kritérií pro MGUS a MM.....	11
<b>Tabulka č. 2.:</b> Klinické a laboratorní varovné příznaky (tzv. <i>red flags</i> ) indukující možný výskyt AL amyloidózy.....	19
<b>Tabulka č. 3.:</b> Seznam a charakteristika použitých genových sond.....	32
<b>Tabulka č. 4.:</b> Charakteristika vyšetřovaného souboru pacientů s AL amyloidózou.....	45
<b>Tabulka č. 5.:</b> Poměr pacientů podle počtu cytogenetických změn.....	46
<b>Tabulka č. 6.:</b> Poměr pacientů s daným počtem kopií 1q21 oblasti.....	50



# 1 ÚVOD

Amyloidóza je vzácné onemocnění, pro které je charakteristické extracelulární ukládání amyloidu do tkání. Amyloid je obtížně vstřebatelná bílkovina tvořící amyloidní nerozpustné fibrily, které se pozitivně barví konžskou červení a v místech depozice poškozují tkáň a tím narušují jejich funkci (Ryšavá, 2013). AL amyloidóza je nejčastějším typem. Příčinou tohoto typu onemocnění je ukládání volných lehkých řetězců (FLC) monoklonálních imunoglobulinů, které jsou produkovány klonálními plazmatickými buňkami (PB). Incidence tohoto onemocnění je 5–12 případů na 1 milion obyvatel za rok. Může postihovat kterýkoliv orgán, přičemž mezi nejčastější patří ledviny, srdce, játra a nervový systém. Z těchto důvodů je včasná diagnostika a terapie pro další prognózu pacienta zcela zásadní. V 10–20 % případů je AL amyloidóza asociována s hematologickými nádorovými onemocněními jako je mnohočetný myelom (MM), Waldenströмова makroglobulinémie či monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS). Medián přežití od doby diagnózy se pohybuje v rozmezí 6 měsíců do 8 let. Prognóza se výrazně odvíjí od závažnosti poškození srdce a dalších orgánů (Zahrádková, 2016).

Základním vyšetřením pro určení diagnózy je průkaz amyloidu v orgánech, stanovení přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu v krvi nebo séru a monoklonální plazmocelulární populace v kostní dřeni.

Detekce cytogenetických změn v PB je poměrně obtížná, z tohoto důvodu se využívá metody FICTION (imunofluorescenční detekce plazmatických buněk v kombinaci s fluorescenční *in situ* hybridizací), díky které je možné hodnotit pouze patologické buňky v kostní dřeni.

## **2 CÍLE PRÁCE**

Předložená diplomová práce se skládá z teoretické a praktické části. Cílem teoretické části je vypracovat literární rešerši o AL amyloidóze a cytogenetických změnách. Cílem praktické části je zpracování, kultivace a vyšetření buněk kostní dřeně metodou FICTION, retrospektivní a prospektivní vyšetření souboru pacientů s AL amyloidózou diagnostikovaných a léčených na Hemato-onkologické klinice FNOL a statistické zhodnocení nalezených cytogenetických změn v souboru pacientů s AL amyloidózou.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

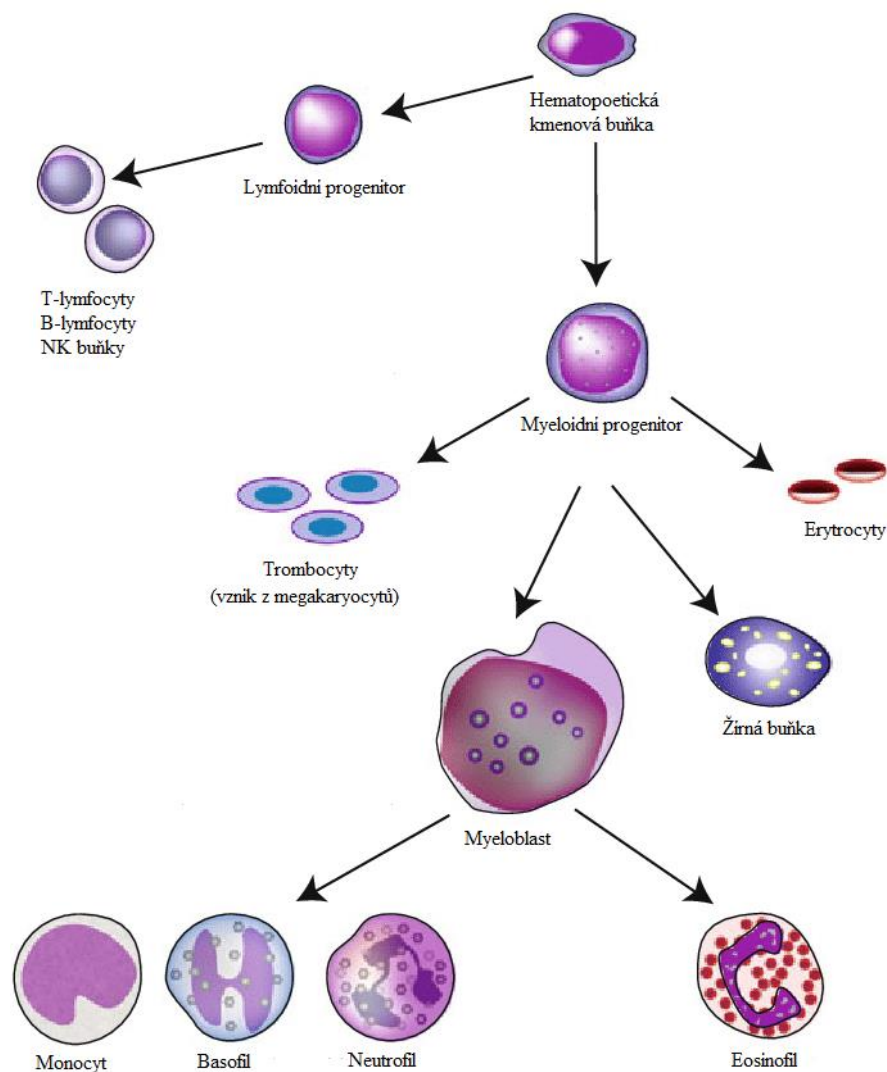
### 3.1 Hematopoéza

V období prenatalního a postnatalního vývoje dochází v krevtovorných orgánech ke tvorbě krevních elementů procesem zvaným hematopoéza (krevtvorba). Krevtvorba je lokalizována nejdříve v oblasti žloutkového vaku, později tuto funkci přebírají játra a slezina, nakonec kostní dřeň (KD). K opětovné aktivaci hematopoézy v játrech a slezině může dojít za patologických stavů (hemolýza, myeloproliferativní onemocnění apod.). V průběhu vývoje organismu prochází hematopoéza 3 obdobími, která se vzájemně prolínají. Mezoblastové období začíná asi 14.–20. den embryonálního vývoje, kdy se v oblasti žloutkového vaku z embryonálních kmenových buněk diferencují kmenové buňky hematopoézy. Pro toto období je charakteristická tvorba ostrůvků z primitivních hematopoetických buněk, které jsou ohraničeny endoteliemi (*area vasculosa*). Kolem 4. týdne vývoje dochází k propojení primitivních cév žloutkového vaku s cévním systémem embrya. Toto období trvá asi do 10. týdne nitroděložního vývoje, přičemž v 6. týdnu vývoje se objevuje krevtvorba v mezenchymu mezi hepatocyty v játrech a dále v menší míře i ve slezině – hepatolienální období. Počátkem 20. týdne nitroděložního vývoje se krevtvorba přesouvá do kostní dřene, která je hlavním hematopoetickým orgánem. Toto období se označuje jako medulární, kdy se z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky (HSC), která má vysokou schopnost regenerace a diferenciaci, postupně vyvíjí progenitory myeloidní a lymfoidní linie (Penka *et* Slavíčková, 2011; Pospíšilová *et al.*, 2013). Každé diferenciační stádium hematopoetických buněk má své specifické povrchové znaky.

Myeloidní řada má společnou multipotentní kmenovou buňku, ze které se dále diferencují morfologicky, fenotypicky i funkčně odlišné buněčné typy: granulocyty (neutrofilů, bazofilů, eozinofilů), erytrocyty, monocytů/makrofágy a megakaryocyty (Seita *et* Weissman, 2010). Fragmentací cytoplazmy megakaryocytů (řízeno hormonálně trombopoetinem) vznikají krevní destičky (Platelets on the Web, 2020). Lymfoidní kmenová buňka je společná pro B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky (*natural killer*), má zásadní roli v regulaci imunitních pochodů (imunokompetentní buňky) a díky tomu poměrně složitý vývoj (Obrázek č. 1). Všechny kmenové buňky podléhají tzv. asymetrickému dělení, po kterém je jedna z dceřiných buněk identická s mateřskou kmenovou buňkou a druhá se dále diferencuje. Hematopoéza je pod kontrolou řady interleukinů, CSF (kolonie stimulující faktory) a také zde hrají významnou roli interakce kmenových buněk se stromatem hematopoetických orgánů (Penka *et* Slavíčková,

2011). Interleukin 3 má vliv na progenitory všech vývojových řad hematopoézy – stimuluje proliferaci a diferenciaci výchozích kmenových buněk (Aglietta *et al.*, 1993).

Krvetvorba probíhá za normálních okolností pouze v kostní dřeni, která je zdrojem všech druhů krvinek přítomných v cirkulující krvi. Po narození jsou krevní buňky produkovány kostní dření po celém těle, postupně dochází k inaktivaci hematopoetické dřene a přeměně v tukovou. Krvetvorba je nejdéle zachována v plochých kostech a epifýzách dlouhých kostí. Po narození se může část lymfocytů tvořit nadále v lymfatické tkáni (Navrátil, 2017).



**Obrázek č. 1.:** Schéma diferenciacie mateřské kmenové buňky do myeloidní a lymfoidní línie při hematopoéze (převzato a upraveno podle Sanganalmath *et al.*, 2011).

Progenitory myeloidní a lymfoidní línie mají nízkou schopnost regenerace a vysokou schopnost diferenciacie do daných typů buněk v rámci línie.

## 3.2 B-lymfocyty

B-lymfocyty představují hlavní složku specifické imunity, jejíž hlavní funkcí je produkce protilátek, která trvá po celý život. B-lymfocyty se mohou neustále obnovovat díky malému množství pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni. Specifická a nespecifická imunita je odvozena od myeloidní a lymfoidní linie vznikající z kmenové buňky (Hořejší *et Bartůňková*, 2005).

Ke zrání B-lymfocytů dochází v primárních lymfatických orgánech, kterými jsou kostní dřeň a brzlík (*thymus*), jejich vývoj je dokončen po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech – uzliny, slezina, Peyerovy pláty (Hořejší *et al.*, 2017). Jako naivní jsou označeny B-lymfocyty, které opustily primární lymfatické orgány, ale dosud se neseťkaly s cílovými antigeny (infekční agens, tumory, tělu vlastní nepatologické antigeny při autoimunitních onemocněních). B-lymfocyty, které se již setkaly s cílovými antigeny, podléhají apoptóze, která eliminuje autoreaktivní klony (menší část), nebo se diferencují v tzv. paměťové buňky nebo PB. Paměťové buňky cirkulují v krvi a zodpovídají za rychlejší produkci příslušných klonů PB, jejichž funkcí je produkce protilátek (imunoglobuliny).

Nezralé lymfocyty se označují jako lymfoblasty, pro které je charakteristické kulaté jádro s hutnějším chromatinem a 1–2 jadérky. Zralé lymfocyty se vyznačují výraznou morfologickou i funkční variabilitou, místem jejich zrání jsou primární a sekundární lymfatické orgány.

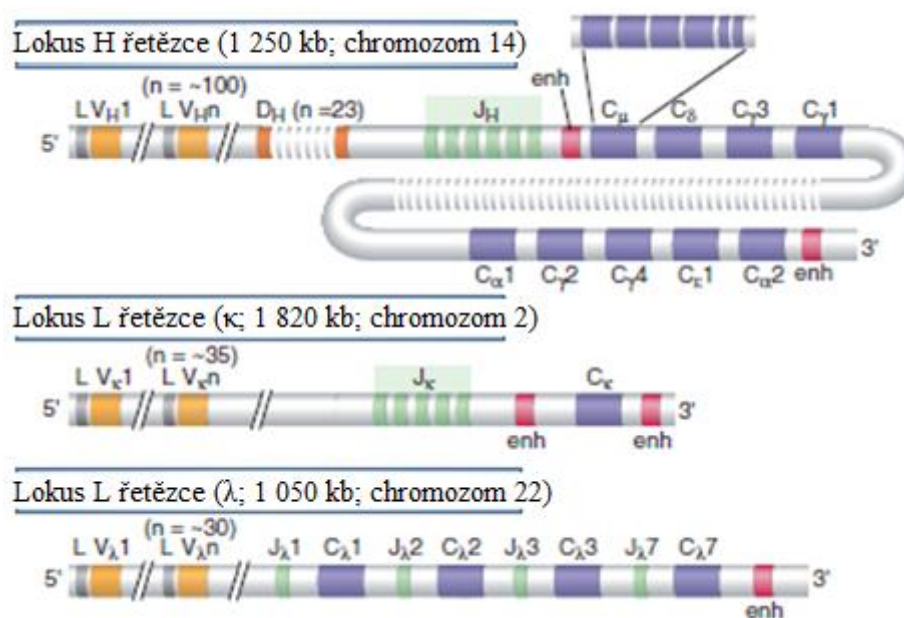
### 3.2.1 Struktura Imunoglobulinu

Struktura molekuly imunoglobulinu (Ig) připomíná tvar písmena Y a sestává ze dvou částí. Variabilní oblast (Fab fragment) charakterizuje specifitu dané protilátky – pro každý antigen existuje předem připravená molekula imunoglobulinu navázaná na povrch B-lymfocytu. Tento komplex se označuje jako BCR (*B-Cell Receptor*), který rozpoznává obrovské množství různých antigenů. Tato oblast podléhá významným množstvím rekombinací na genové úrovni, což generuje obrovskou variabilitu. Druhá oblast se označuje jako konstantní (Fc fragment) a podle ní se rozlišuje 5 izotypů imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Buňky s příslušným receptorem (granulocyty, NK buňky, makrofágy) jsou schopny vázat Fc fragment imunoglobulinu a podílet se tak na odstranění cizorodých látek. Molekula imunoglobulinu se podélně skládá ze dvou těžkých řetězců (H), jejichž varianty ( $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) určují izotop protilátky, a dvou řetězců lehkých (L – varianty kappa, lambda). B-lymfocyty, společně s T-lymfocyty, mají nejvýznamnější podíl na regulaci imunitní odpovědi, jedná se o představitele

specifické adaptivní imunity (Penka *et Slavičková*, 2011; Navrátil, 2017; Rheingold *et al.*, 2003; Akira, 2011).

### 3.2.2 Přeskupování genových segmentů

Řetězce imunoglobulinů jsou kódovány genovými segmenty, které se v průběhu dozrávání B-lymfocytů přeskupují (*rearrangement*). Tyto genové segmenty se nacházejí ve třech samostatných lokusech, přičemž každý lokus leží na jiném chromozomu. Geny kódující těžké řetězce imunoglobulinů se nacházejí v genovém komplexu na chromozomu 14, geny pro lehké řetězce se nacházejí na chromozomu 2 (kappa) a 22 (lambda) (Obrázek č. 2).



**Obrázek č. 2.:** Organizace zárodečné linie lidských imunoglobulinových lokusů těžkého řetězce a dvou variant lehkého řetězce (převzato a upraveno podle Abbas *et al.*, 2012).

Zobrazeny jsou pouze funkční geny. Konstantní oblasti H řetězce jsou pro zjednodušení zobrazeny jako celek, ačkoliv jsou složeny z jednotlivých exonů (C<sub>μ</sub>). L – signální sekvence (leader), V – variabilní oblast, D – diverzita, J – *joining*, enh – enhancer (zesilovač), κ – kapa; λ – lambda

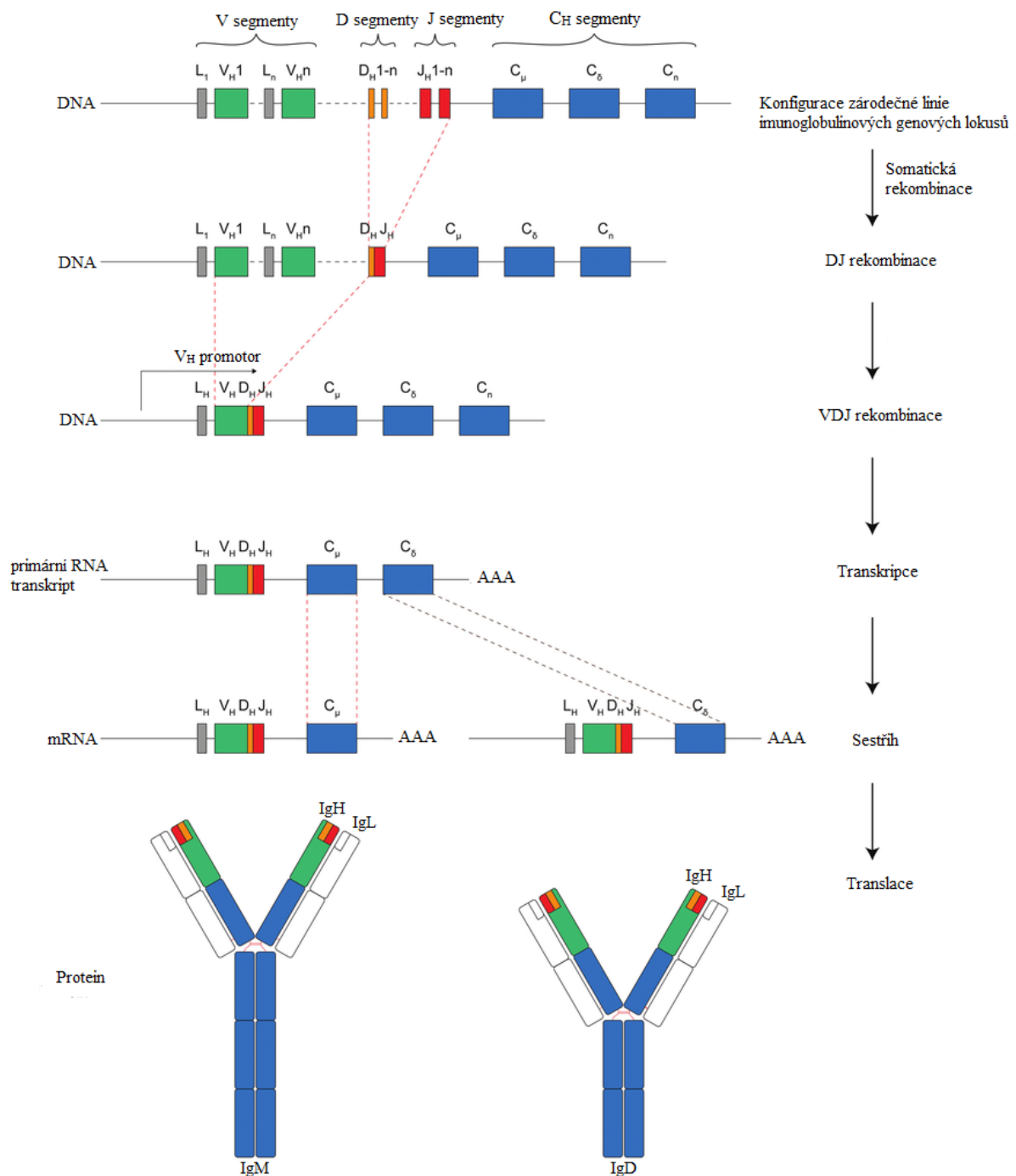
### 3.2.3 VDJ rekombinace

Genový komplex H řetězce obsahuje na 5' konci skupinu několika set sekvenčně podobných úseků V (variabilita), asi 50 úseků D (diverzita) a 9 úseků J (*joining*). Na 3' konci se nacházejí geny kódující konstantní oblast těžkého řetězce (C) uspořádané v tandemu, po jeho

stranách se nacházejí tzv. přesmykové sekvence, které rozeznávají enzymy, které provádějí izotypový přesmyk. Konce V, D, J úseků obsahují krátké sekvence, které jsou rozeznávány enzymy zodpovědnými za přeskupování genů. Genový komplex L řetězce neobsahuje úseky D.

Proces přeskupování genových segmentů při diferenciaci B-lymfocytů souvisí se vznikem klonálně specifických povrchových imunoglobulinů. Jako první dochází v progenitorech B-lymfocytů k tzv. D-J přeskupení, při kterém dochází k vyštěpení úseku *IgH* genového komplexu mezi náhodným D segmentem a některým J segmentem. Tento děj probíhá paralelně na obou chromozomech a může k němu docházet opakovaně dokud jsou k dispozici nevyštěpené D-J segmenty. Následuje vyštěpení rozsáhlého úseku mezi segmenty V a D-J (V-D přeskupení) (Obrázek č. 3).

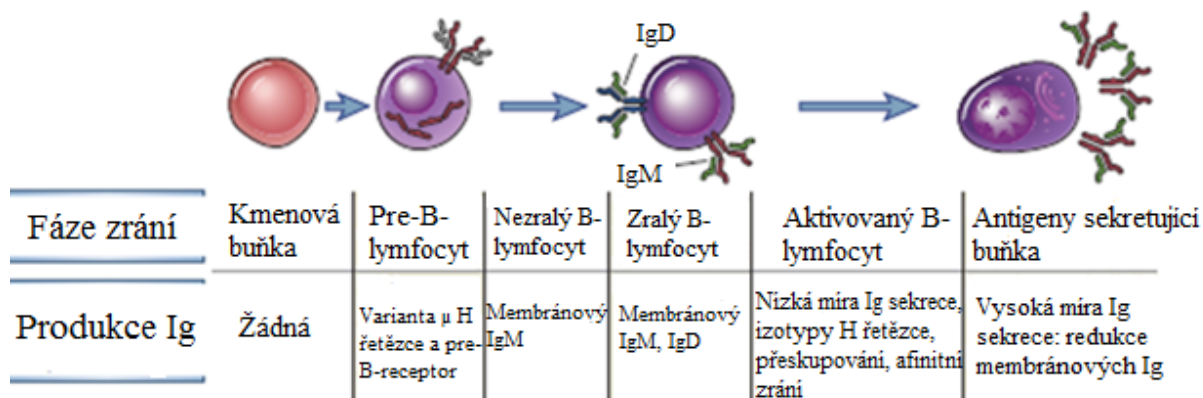
Poté dochází k tzv. alelické exkluzi, kdy z příslušné mRNA kódující VDJ produkt vzniká H polypeptid, přičemž je zastaven proces přeskupování na druhém homologním chromozomu – tedy H řetězec je kódován pouze jedním chromozomem a každý B-lymfocyt produkuje pouze jeden H řetězec. V této fázi vzniká pre-B-lymfocyt (Obrázek č. 4). Geny pro L řetězce podléhají stejnému mechanismu – dochází k přeskupování genů kappa (vyštěpení úseku mezi V a J segmentem), pokud je neúspěšné, začínají se přeskupovat geny lambda. V případě, že ani toto přeskupení není úspěšné, pre-B-lymfocyt zaniká. K tomuto mechanismu dochází opakovaně dokud nevznikne produkt poskytující funkční L řetězec, který je schopen s H řetězcem utvořit kompletní povrchový antigen IgM, čímž se buňka stává nezralým B-lymfocytem. V dalším vývojovém stádiu současně probíhá exprese IgM a IgD, čímž se B-lymfocyt stává zralým a po jeho střetu s antigenem dochází k intenzivním mutacím V segmentů, což dále zvyšuje variabilitu – tzv. somatické mutace (Hořejší *et al.*, 2017; Abbas *et al.*, 2012).



**Obrázek č. 3.:** Schématicky znázorněné procesy probíhající při přeskupování genových komplexů pro těžké řetězce imunoglobulinů (převzato a upraveno podle Backhaus, 2018).

L – signální sekvence (leader), V – variabilní oblast, D – diverzita, J – *joining*





**Obrázek č. 4.:** Expres Ig v průběhu zrání B-lymfocytů (převzato a upraveno podle Abbas *et al.*, 2012).

Jednotlivá stádia zrání jsou doprovázena změnami v produkci imunoglobulinů pro H a L řetězce. IgM těžký řetězec je zobrazen v červené barvě, IgD těžký řetězec je zobrazen modře, lehké řetězce jsou zelené.

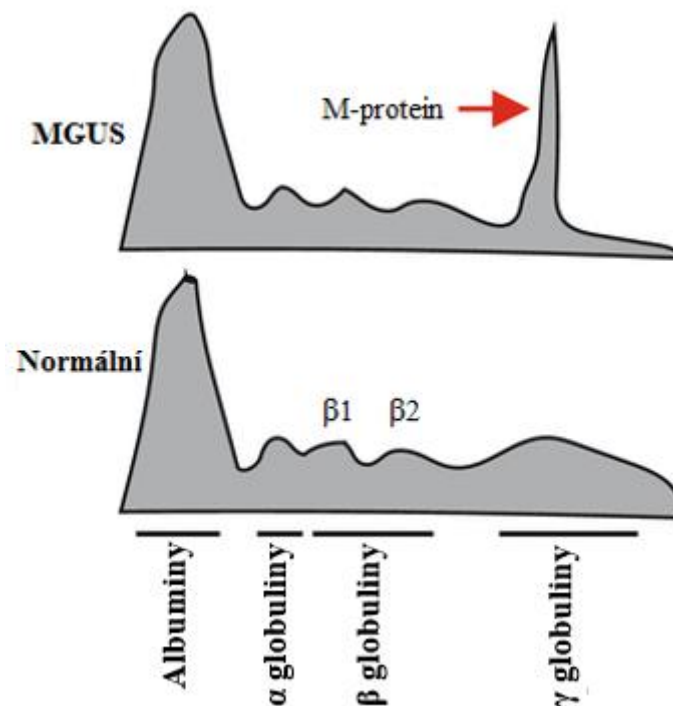
### 3.3 Monoklonální gamapatie

Jedná se o heterogenní skupinu onemocnění, spojenou s nálezem monoklonálního Ig, který je výsledkem klonální proliferace terminálních stádií B-lymfocytů – plazmatických buněk. Monoklonální proteiny se mohou skládat z intaktních molekul Ig, těžkých (vzácné) nebo lehkých řetězců.

Základem diagnostiky a monitorování těchto poruch je hodnocení patologického monoklonálního Ig (paraprotein, M-protein) v séru a/nebo moči pomocí metod imunofixace a elektroforézy (Obrázek č. 5). Díky těmto metodám je možné určit přítomnost monoklonálního Ig, kvantifikovat jeho hladinu v moči a krvi a identifikovat variantu L a H řetězce Ig. Novější metodou zavedenou do rutinní laboratorní praxe je stanovení volných lehkých řetězců v séru (Adam *et al.*, 2008; Maniatis, 2009). FLC mají poločas v séru 2–6 hodin, protože jsou rychle vylučovány glomeruly a metabolizovány v proximálních tubulech ledvin. Když jsou FLC produkovány v přebytku, může být reabsorpční kapacita tubulů ochromena, což vede k akumulaci FLC v séru (Bradwell *et al.*, 2003). K tomu může dojít u řady klinických stavů, včetně zánětu, imunologických poruch (abnormální poměr lehkých řetězců kappa/lambda), selhání ledvin a novotvarů PB (Davids *et al.*, 2010).

Profesor Kyle z Mayo Clinic navrhl rozdělení monoklonálních gamapatií (MG) na MGUS (monoklonální gamapatie nejasného významu) a maligní MG, kde mimo další

onemocnění patří solitární plazmocytom, doutnající mnohočetný myelom, mnohočetný myelom, AL amyloidóza, Waldenströмова makroglobulinemie (Šolcová *et al.*, 2016).

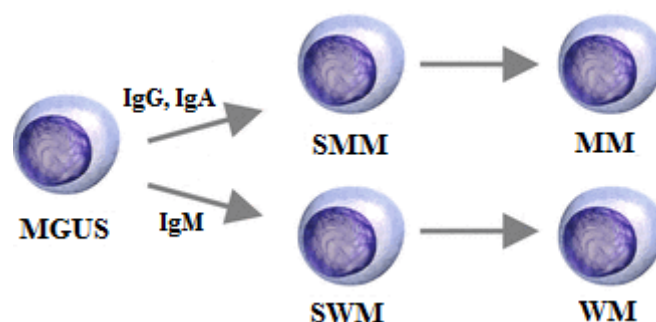


**Obrázek č. 5.:** Elektroforetické profily sérových proteinů pacienta s MGUS a pacienta s normálními hodnotami (převzato a upraveno podle Janz, 2017).

### 3.3.1 MGUS

Je premaligní asymptomatická porucha PB, která je spojena s celoživotním rizikem přechodu do MM (Tabulka č. 1), charakterizovaná proliferací monoklonálních PB v KD bez poškození orgánů (Rajkumar, 2005). Progrese MGUS do MM je asi 1 % ročně. Toto riziko se nesnižuje ani u pacientů, jejichž zdravotní stav zůstává stabilní po celá desetiletí (Kyle *et al.*, 2004; Kyle *et al.*, 2002). Primárními rizikovými faktory progrese jsou velikost a typ M-proteinu a přítomnost patologického poměru FLC v séru pacienta (Rajkumar *et al.*, 2005). MGUS představuje dvě třetiny všech dysplázií PB a její výskyt roste úměrně s věkem (Therneau *et al.*, 2012). Pacienti starší 50 let mají prevalenci k této chorobě 3 %, nad 70 let pak více než 5 %, přičemž častěji se tato porucha vyskytuje u mužů. Zvýšené riziko přechodu do MM spočívá v přítomnosti monoklonálního Ig jiného typu než IgD a toto riziko se s koncentrací daného typu monoklonálního Ig zvyšuje (Obrázek č. 6). Pacienti s touto diagnózou by měli být sledováni

v šesti až dvanácti měsíčních intervalech s cílem zachytit přechod do malignity (Adam *et al.*, 2008).



**Obrázek č. 6.:** Možnosti přechodu MGUS do dalších typů monoklonálních gamapatií (převzato a upraveno podle Janz, 2017).

MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu; SMM – doutňající mnohočetný myelom; SWM – doutňající Waldenströmova makroglobulinemie; MM – mnohočetný myelom; WM – Waldenströmova makroglobulinemie

**Tabulka č. 1.:** Porovnání diagnostických kritérií pro MGUS a MM (inspirováno podle Wadhera *et Rajkumar*, 2010).

Kritérium	MGUS	MM
<b>M-protein</b>	Hladina M-proteinu v séru < 30 g/l s expresí intaktního Ig (např. IgG, IgA či IgM)	Nález M-proteinu v séru a/nebo moči (mimo pacienty s „pravým“ nesekretorickým myelomem)
<b>Kostní dřeň</b>	Klonalita PB < 10 % (pokud je přítomna), žádné přidružené B-lymfoproliferativní nemoci	Klonalita PB > 10 %
<b>Klinický obraz</b>	Bez CRAB	Přítomnost CRAB

CRAB – hyperkalcemie, selhání ledvin, anemie, postižení kostí; MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu, MM – mnohočetný myelom

### 3.3.2 Solitární plazmocytom

Jedná se o vzácné onemocnění charakterizované lokalizovanou proliferací novotvarů monoklonálních PB v KD bez známek systémového onemocnění typického pro myelom (Saksena *et al.*, 2014). Dělí se podle místa výskytu na solitární kostní plazmocytom (kostní léze) a extramedulární plazmocytom (léze měkkých tkání). Incidence kostního plazmocyтому je o 40 % častější a má výrazně vyšší riziko přechodu do MM. Medián přežití je 5 let, přičemž lepší prognóza je spojena s ženským pohlavím, nižším věkem a extramedulárním typem plazmocyтому (Dores *et al.*, 2009; Saksena *et al.*, 2014).

### 3.3.3 Doutnající mnohočetný myelom (SMM)

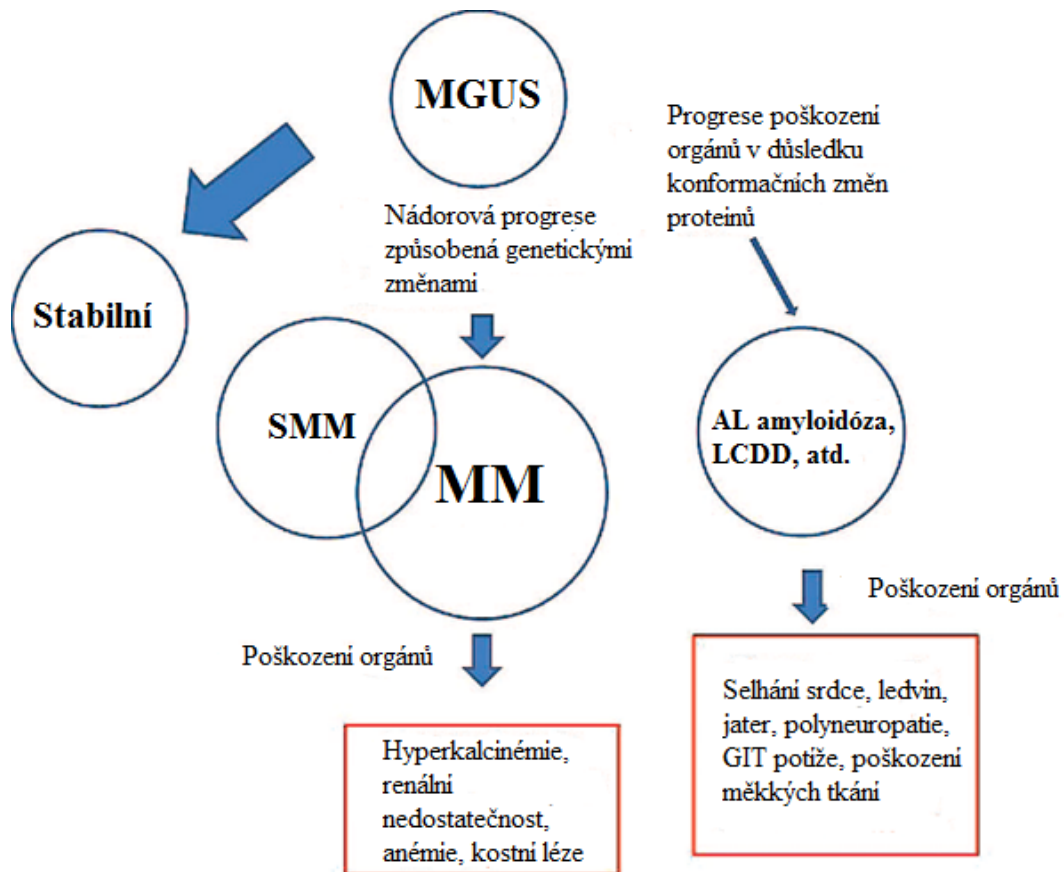
Asymptomatická porucha PB, která se liší od MGUS mnohem vyšším rizikem progresu do MM (10 % oproti 1 % v prvních 5 letech po stanovení diagnózy) a představuje tedy mezistupeň mezi těmito dvěma nemocemi. SMM se zatím neléčí, protože existuje obava, že časná léčba může zvýšit riziko výběru rezistentních klonů a je tedy předmětem dalších studií optimalizovat laboratorní metody a hledat nové biomarkery, které umožní spolehlivé rozlišení a identifikaci pacientů s doutnajícím myelomem, u kterých je největší riziko progresu (Rajkumar *et al.*, 2015; Madhira *et al.*, 2020). Poškození orgánů CRAB (hyperkalcinémie, renální selhání, anémie a kostní léze) není přítomno a koncentrace PB je více než 10 % oproti MGUS. Pacienti s tímto onemocněním jsou léčeni až po přechodu do symptomatického stádia (Machálková *et Maisnar*, 2014).

### 3.3.4 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom je druhým nejčastějším hematologickým onemocněním, které tvoří 10 % všech hematologických malignit (1 % všech onkologických nemocí). Většina pacientů je v době diagnózy starší 65 let (pouze 2 % jsou mladší 40 let), přičemž prognóza pacientů závisí na včasné diagnóze. Toto onemocnění je nevléčitelné, avšak poměrně dobře reaguje na léčbu, čímž je možné dosáhnout až roky trvající remisi. Pravděpodobnost přechodu asymptomatického MGUS do symptomatického MM je ovlivněno mutační diverzitou, klonalitou populací MM buněk a lokálními změnami v KD (Obrázek č. 7).

Podstatou onemocnění je malignita B-lymfocytů, která je přímým důsledkem klonální proliferace dlouhověkých PB produkujících monoklonální Ig (M-protein), což vede

k osteolytickým lézím a zlomeninám, poruchám krvevotvorby a imunitního systému. Jelikož je toto onemocnění poměrně vzácné a má četnějšími projevy, byl vytvořen Českou myelomovou skupinou program CRAB, který cílí na včasné stanovení diagnózy u těchto pacientů (Straub *et al.*, 2009; Fairfield *et al.*, 2016). MM patří do skupiny agresivních lymfomů vycházejících z lymfatické tkáně. Patologické PB sekretují monoklonální Ig kompletní nebo jen lehké řetězce (20 % pacientů). Lehké řetězce se mohou následně ukládat ve formě amyloidních depozit, což způsobuje MM se sekundární AL amyloidózou (Adam *et al.*, 2008).



**Obrázek č. 7.:** Podmínky přechodu MGUS do dalších typů monoklonálních gamapatií s charakteristickými klinickými projevy (převzato a upraveno podle Merlini *et Palladini*, 2012).

### 3.3.5 Waldenströмова makroglobulinemie

Klonální porucha B-lymfocytů charakterizována lymfoplazmatickou populací v KD nebo lymfatické tkáně s přítomností IgM v séru. Toto maligní onemocnění představuje 1–2 % všech hematologických nádorů. Incidence je nejvyšší u mužů bělochů mezi 60–70 lety. Střední doba přežití činí 5 let (Ansell *et al.*, 2010; Swerdlow *et al.*, 2016; Treon *et al.*, 2012). Podstatou přeměny B-lymfocytu na lymfoplazmatickou buňku jsou somatické mutace v genech *MYD88*

(mutace primární myeloidní diferenciaci) a *CXCR4* (mutace chemokinového receptoru) (Swerdlow *et al.*, 2016). Tyto mutace jsou přítomny u více než 90 % pacientů s Waldenströmovou makroglobulinémií (WM), přičemž u 30–35 % je prokázána přímá kauzalita s tumorogenezí. Nejčastější somatická varianta (91 %) v genu *MYD88* (záměna aminokyseliny leucin za prolin) je potenciálně použitelná jako biomarker k rozlišení WM od jiných patologií, které mají společné morfologicko-klinické rysy (Ngo *et al.*, 2011). Lymfatické buňky v KD rostou a blokují normální buňky, což znesnadňuje produkci normálního množství červených a bílých krvinek. Výsledkem může být anemie, neutropenie a trombocytopenie. Pacienti mají díky vysoké hladině IgM zvýšenou viskozitu krve (Lymphoma Research Foundation, 2021).

### **3.3.6 AL amyloidóza**

Pro tuto skupinu vzácných onemocnění je typické extracelulární ukládání nerozpustných amyloidních proteinů do tkání, které lze vizualizovat barvením konžskou červení. Nahromaděním těchto proteinů dochází k postupnému selhávání orgánů, což způsobuje smrt. AL amyloidóza je nejčastějším typem systémových amyloidóz s odhadovanou incidencí 8,9 na 1 milion obyvatel. Toto onemocnění se vyskytuje kolem 70. roku života, přičemž u lidí mladších 40 let je velmi vzácné. Častěji se vyskytuje u mužů. Příčinou je nadměrná produkce lehkých řetězců Ig, které jsou produkovány patologickými klony PB. Výsledkem je nejčastěji poškození ledvin (70 % případů) a myokardu (až 60 % případů) (Ryšavá, 2013).

## **3.4 Systémové amyloidózy**

### **3.4.1 Patogeneze**

Agregace amyloidních fibril tvořených volnými lehkými řetězci (FLC) vlivem proliferace monoklonálních PB CD<sub>38+</sub> a CD<sub>138+</sub> je základní příčinou vzniku onemocnění (Ščudla *et al.*, 2014). Amyloidní depozity jsou uspořádány do  $\beta$ -struktury skládaného listu, což zajišťuje vyšší konformační stabilitu a jsou tak rezistentní k degradaci. Během narušeného prostorového uspořádání proteinu dochází ke vzniku konformace s  $\beta$ -strukturou, která podmiňuje vznik amyloidu. Ukládání depozit může být urychleno mutacemi v genech proteinových prekurzorů. Pro většinu amyloidóz je charakteristická zvýšená tvorba prekurzorů, díky nimž se amyloidní

fibrily rychle kumulují ve tkáních. Nedostatečná činnost makrofágů, které zodpovídají za degradaci amyloidu, může přispívat k jeho hromadění (Ryšavá, 2013).

### **3.4.2 AA amyloidóza**

Zatímco AL amyloidóza se nejčastěji vyskytuje ve vyspělých zemích, amyloidóza amyloid A (AA) je častější v rozvojových zemích a v některých evropských regionech. Je obvykle spojena s dlouhodobým působením chronických infekčních procesů (vzniká sekundárně). Nejčastější zánětlivé onemocnění, které se mohou zhoršit vlivem AA amyloidózy jsou například revmatická onemocnění. Amyloidová ložiska v myokardu jsou oproti AL amyloidóze méně častá (Ryšavá, 2013). Amyloidní depozity AA amyloidózy se převážně skládají ze sérového amyloidu A (SAA). Existují dvě izoformy SAA a SAA1, které zodpovídají za zvýšení sérové hladiny během akutní fáze, kdy nedochází k degradaci SAA v monocytech, což vede ke kumulaci a pozdější infiltraci do okolních tkání. Trvale abnormálně vysoké hladiny SAA jsou nezbytné pro rozvoj amyloidózy (Real de Ausa *et al.*, 2014).

### **3.4.3 Hereditární amyloidóza**

Dědičná amyloidóza je systémový stav související s poškozením více orgánových soustav v důsledku ukládání patologických proteinů s  $\beta$ -struktúrou, kde dochází k mutaci v genu pro amyloidový prekurzor. Přesná diagnóza daného typu je nezbytná pro správnou terapii a genetické poradenství (Benson, 2003). Nejčastější je transthyretinová amyloidóza (ATTR), kde je fibrilárním prekurzorem transthyretin (prealbumin) s modifikovanou primární strukturou způsobenou bodovými mutacemi v genu pro transthyretin, což vede k destabilizaci a agregaci fibril ve tkáních. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění s variabilní penetrací vázané na konkrétní geografické oblasti (Jercan *et al.*, 2020). U homozygotních stavů se jedná většinou o závažnější průběh (Ryšavá, 2013).

### **3.4.4 AL amyloidóza**

Imunoglobulinová amyloidóza lehkého řetězce (AL) je nejčastějším typem amyloidózy. Je způsobená patologickými PB, ve kterých se klonální lehké řetězce Ig (kappa nebo lambda), chybně skládají do nerozpustných amyloidních fibril a ty se následně ukládají ve tkáních, kde působí orgánovou toxicitu. Patogeneze AL amyloidózy se odvíjí od míry systémové depozice

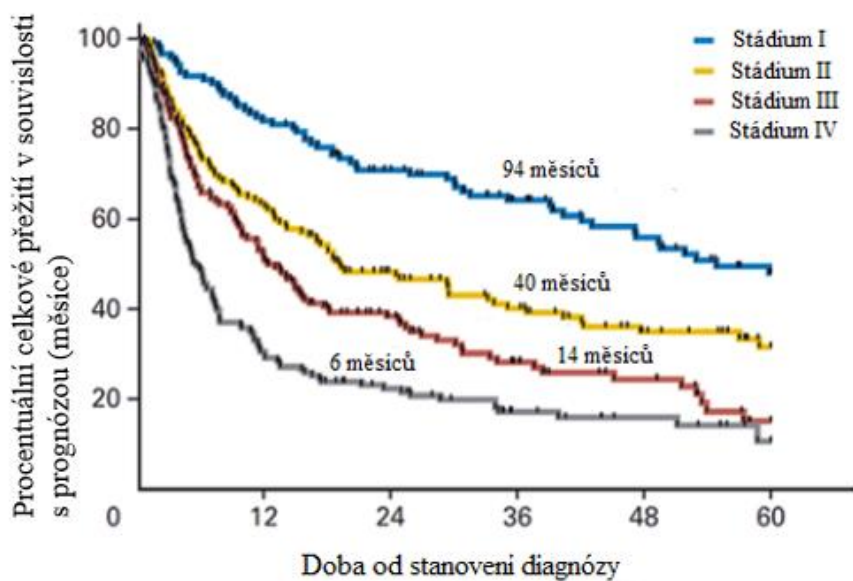
do orgánů, kdy je narušena jejich přirozená funkce. Pacienti, kteří jsou diagnostikováni v pokročilejších stádiích, obzvláště se srdečním postižením, mají vysokou úmrtnost v řádu několika měsíců (Hammons *et al.*, 2018, Palladini *et al.*, 2020). AL amyloidóza může být v 10–20 % případů asociována s dalším hematologickým onemocněním (MM, WM, MGUS) (Zahrádková, 2016).

V rámci této diagnózy se vyskytují dvě formy. Lokalizovaná AL amyloidóza je méně častá (7–8 % všech případů). K ukládání amyloidních depozit dochází výhradně v místě produkce – tzv. jeden orgán. U systémové AL amyloidózy jsou lehké řetězce (převážně izotypu lambda) produkovány klonálními PB v KD. Cirkulující lehké řetězce způsobují orgánové dysfunkce vlivem jejich ukládání v různých orgánech, ale také mohou být cytotoxické samy o sobě indukcí signální dráhy p38 MAP kinázy (mitogeny aktivovaná proteinkináza), což vyvolá kaskádu oxidačního stresu, která vede k apoptóze (Cook *et al.*, 2020).

### **3.4.5 Klinické projevy a diagnostika**

Příznaky amyloidózy jsou obtížně definovatelné, jelikož může postihovat kterýkoliv orgán. Nejčastěji se však jedná o ledviny, srdce, játra a nervový systém, může však poškozovat i trávicí soustavu a měkké tkáně. Onemocnění dále mohou provázet nespecifické příznaky jako únava, úbytek na váze, dušnost nebo kožní purpura, což významně komplikuje diagnostiku. Postižení ledvin (charakter nefrotického syndromu) a srdce jsou velmi časté, přičemž poškození myokardu má významný vliv na prognózu pacienta (Obrázek č. 8), jelikož ložiska amyloidu vedou k tloušťnutí stěn srdečních komor a následně poruchám diastoly. Postižení nervového systému se může manifestovat již několik let před stanovením diagnózy (periferní neuropatie, syndrom karpálního tunelu). Z dalších projevů jsou to zvětšená játra s pozitivními jaterními testy či zvětšený jazyk (makroglosie) v důsledku infiltrace amyloidem. Pacienti, kteří již byli diagnostikováni s MG mohou mít zvýšené riziko propuknutí amyloidózy a měli by být více hlídáni (Zahrádková, 2016). Pacienti s poškozením jednoho orgánu se vyskytují v 25 %, dva orgány bývají poškozené v 36 %, tři a více v 39 % všech případů (Ščudla *et al.*, 2014).





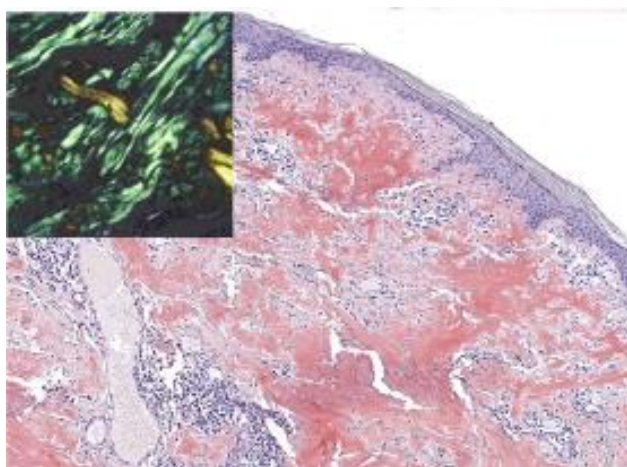
**Obrázek č. 8.:** Křivky celkového přežití od stanovení diagnózy (převzato a upraveno podle Kumar *et al.*, 2012).

Současná prognostická klasifikace je založena na srdečních biomarkerech troponin-T (cTnT) a N-terminálním natriuretickému peptidu pro-B-typu (NT-ProBNP).

Amyloid se ve tkáni prokazuje nejčastěji pomocí imunohistologických metod, z nichž nejprůkaznější je pozitivní barvení vzorku Kongo červení, kde jsou viditelné oranžovo-červené okrsky na řezu, které v polarizovaném světle vykazují zeleno-žlutý dichroismus (Obrázek č. 9). Toto vyšetření však nemusí být dostatečné pro průkaz AL amyloidózy, která vykazuje vysokou variabilitu lehkých řetězců Ig, a tudíž i odlišnou afinitu pro navázání barviva. Imunofluorescenční vyšetření představuje specifickou metodu, při které je možné rozlišit jednotlivé typy amyloidu. Využívají se nativně zmražené vzorky se specifickými protilátkami proti daným komponentám (FLC kappa i lambda, daný typ amyloidu) nebo celým molekulám Ig či složkám komplementu. Pro spolehlivý průkaz AL amyloidózy je možné kombinovat tyto metody, případně dále využít hmotnostní spektrometrii. Také je nutné provést trepanobiopsii pro vyloučení infiltrace KD amyloidem a vyloučit koincidenci s MM, která se obvykle vyskytuje v 12–20 % případů. Dále se provádí průkaz M-proteinu v séru či moči a stanovení hladiny FLC nebo klonální populace PB. Kvantitativní stanovení sérové hladiny FLC (včetně patologického poměru kappa/lambda) spolu s metodou imunofixační elektroforózy vykazují senzitivitu až 99 % a podává informace o množství prekurzorového proteinu a tím i množství amyloidu. Tento údaj je důležitým prognostickým faktorem. Freelite™ test je nejpoužívanější

metoda využívající polyklonální protilátky proti FLC kappa/lambda pro stanovení hladiny FLC, které cílí na jejich epitopy.

Vzorky pro tato vyšetření jsou nejčastěji získána biopsií poškozených orgánů (odebrání menšího tkáňového okrsku), přičemž průkaznější jsou odběry z ledvin, jater nebo endomyokardiální biopsie, kde je vyšší pravděpodobnost záchytu amyloidu. Biopsie postižených orgánů není vždy nutná – preferovanou méně invazivní náhradou je biopsie podkožního tuku či KD, která se mimo jiné také provádí za účelem stanovení koncentrace klonálních PB (Ryšavá, 2013; Cook *et al.*, 2020; Ščudla *et al.*, 2014).



**Obrázek č. 9.:** Amyloidová depozita v kůži barvená Kongo červení vykazující dichroismus (Stuhlmann-Laeisz *et al.*, 2019).

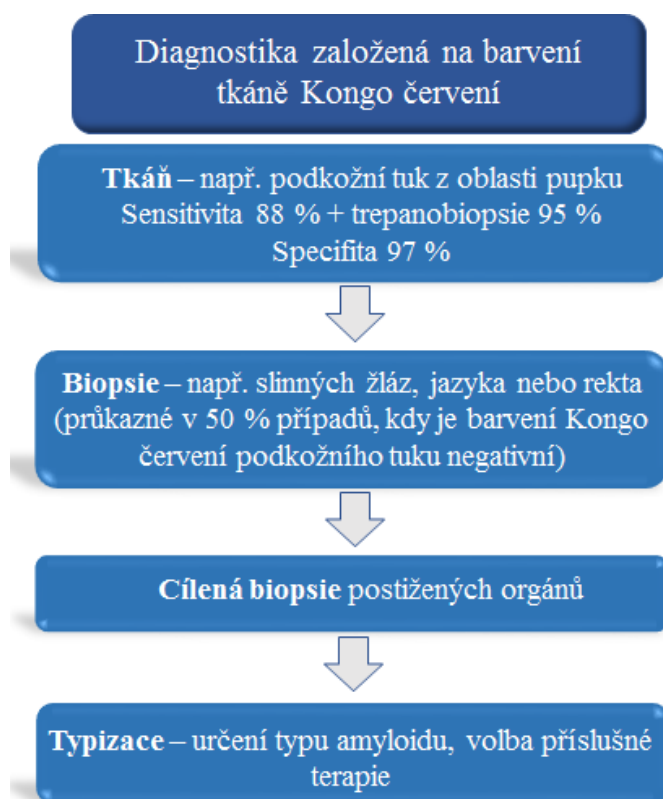
### 3.4.6 Kritéria stanovení diagnózy

Primárním diagnostickým kritériem je histologický průkaz amyloidu (Obrázek č. 10), který nemusí být vždy průkazný zejména jedná-li se o časnější stádia. Pozitivní nález amyloidu v nervových tkáních signalizuje pokročilejší stádium nemoci. Počáteční stádia jsou často detekována v orgánech s větší mírou prokrvení (typicky ledviny a játra). Průkaz amyloidu u systémových amyloidóz v jednom orgánu často indikuje jeho přítomnost i v dalších orgánech (Ryšavá, 2013). Presymptomatická diagnóza detekuje MG, které předcházejí prvním symptomům, a zvýšené hladiny biomarkerů typické pro orgánová postižení u amyloidóz (Tabulka č. 2) (Palladini *et al.*, 2020).

**Tabulka č. 2.:** Klinické a laboratorní varovné příznaky (tzv. *red flags*) indukující možný výskyt AL amyloidózy (Zahrádková, 2016).

Postižený orgán	Výskyt příznaků (%)	Časné „red flags“
<b>Srdce</b>	70	NT-proBNP > 332 ng/l BNP > 73 ng/l
<b>Ledviny</b>	70	Albuminurie > 0,5g/24 hod eGF < 50 ml/min na 1,73 m <sup>2</sup>
<b>Játra</b>	22	Zvýšení ALP a/nebo GMT při vyloučení jiných příčin
<b>Periferní a autonomní neuropatie</b>	14	Neuropatická bolest a ztráta teplotní senzitivity Erektylní dysfunkce
<b>Měkké tkáně</b>	13	Syndrom karpálního tunelu

ALP – alkalická fosfatáza, BNP – mozkový natriuretický peptid, GF – glomerulární filtrace, GMT – gama-glutamyltransferáza, NT-proBNP – propeptid mozkového natriuretického peptidu



**Obrázek č. 10.:** Diagnostický postup při biopsii systémových amyloidóz (inspirováno podle Zahrádková, 2016).

### 3.4.7 Terapie

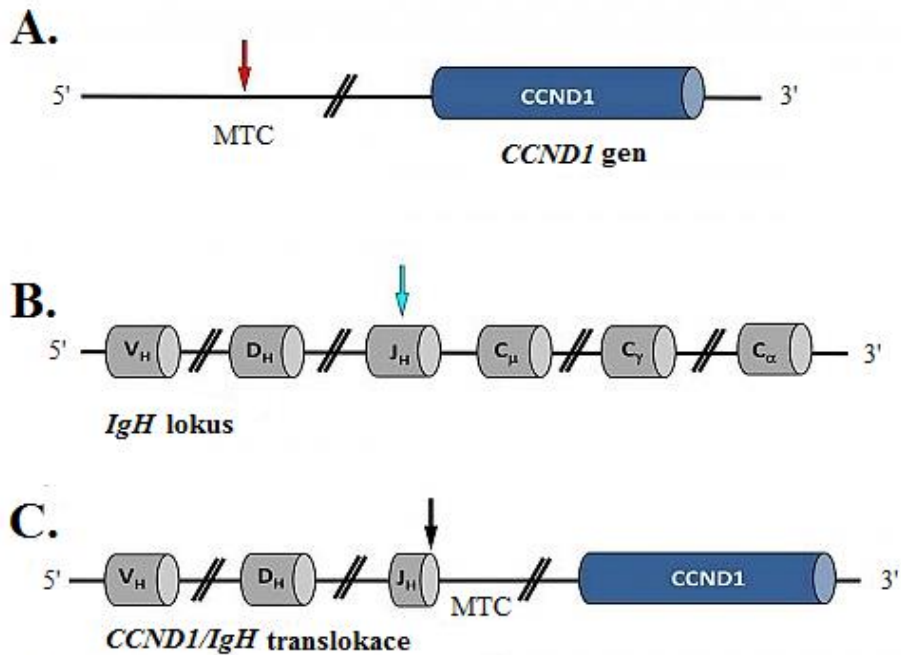
Cílem léčby AL amyloidózy je funkční zotavení postiženého orgánu. Vzhledem k patofyziologii této nemoci je vymýcení maligních B-lymfocytů nutným předpokladem pro obnovení funkce orgánu. Léčba se odvíjí od včasné stanovené diagnózy, je zaměřena na konkrétní klon a měla by být co nejúčinnější, aby ji daný pacient byl schopen tolerovat. Vhodní pacienti mohou podstoupit autologní transplantaci kmenových buněk. Ostatní pacienti, kteří tato kritéria nesplňují bývají léčeni borteomibem v kombinaci s dalšími léčivými látkami jako jsou cyklofosfamid, dexametazon a melfalan (Koh, 2020). Borteomib může zlepšit intenzitu odpovědi pacientů, kteří nejsou vhodní k transplantaci (Palladini *et al.*, 2020). Vysoce riziková pacienta představují až 20 % všech případů AL amyloidózy. Vzhledem k pokročilé srdeční dysfunkci či závažnému srdečnímu selhání nemůže žádný léčebný režim podstatně změnit progresivní průběh nemoci. Tyto případy mají velmi krátký medián přežití (přibližně 6 měsíců) a primárním cílem léčby je odstranění amyloidních ložisek. V tomto směru se vyvíjejí monoklonální protilátky, které by cílily na existující amyloidní depozita včetně sérového amyloidového P komponentu, který je významně zvýšený u pacientů s AL amyloidózou (Koh, 2020). Bez terapie mají pacienti průměrnou délku přežití 1–2 roky, jen 20 % přežívá 5 let od stanovení diagnózy. Prognóza závisí podle orgánového poškození a je výrazně závislá od míry poškození srdce (Adam *et al.*, 2008).

### 3.5 Cytogenetické abnormality

AL amyloidóza sdílí s MM velké množství chromozomálních abnormalit. U obou nemocí se vyskytují podobné translokace zahrnující *IgH* gen, delece: zejména del(13q), del(17p) a aneuploidie. Bylo také zjištěno, že prognosticky nepříznivé genetické změny známé u MM – t(4;14), del(17p) a del(1p), se mohou vyskytovat i u AL amyloidózy a jsou obvykle spojené se špatnou prognózou (Hammons *et al.*, 2018). U AL amyloidózy je nejčastější abnormalitou translokace t(11;14), která se také vyskytuje u pacientů s MM. Přibližně 10–15 % pacientů s AL amyloidózou může mít také MM. Chromozomové abnormality detekované iFISH jsou klíčovým prvkem k definování biologických vlastností MM, dělí se do dvou hlavních skupin: hyperdiploidie spojené zejména s trizomiemi lichých chromozomů a nonhyperdiploidie spojené s přestavbou *IgH* lokusu. Přestavby *IgH* jsou považovány za iniciující událost ve vývoji malignit B-lymfocytů včetně MGUS a MM.

Translokace genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (*IgH*), který se nachází v oblasti 14q32, jsou častými genetickými změnami u pacientů s AL amyloidózou a vyskytují se až u 52 % pacientů (Bryce *et al.*, 2009). Nejčastěji k translokacím dochází v době rekombinace izotypového přesmyku na neproduktivní alele. Výsledkem těchto translokací je deregulace exprese onkogenů (*CCND1*, *MYEOV*, *FGFR3* a *MMSET*, *c-MAF*), díky jejich přesunu do blízkosti zesilovačů transkripce *IgH* genu. Buňky před expanzí do KD pravděpodobně prochází somatickými hypermutacemi a další mutace pak vedou k úniku buněk z mikroprostředí KD (Bergsagel *et al.*, 1998; Balcárková *et al.*, 2016).

Translokace t(11;14)(q13;q32) je nejběžnější translokací u pacientů s AL amyloidózou. Prevalence k této translokaci je významně vyšší u pacientů pouze s AL amyloidózou (56,5 %), na rozdíl od pacientů se souběžným MM (17,6 %). Přítomnost t(11;14) je spojena se špatnou prognózou bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost MM. U pacientů pouze s MM je přítomnost této translokace spojena s dobrou prognózou (Kobayashi *et al.*, 2019). Při této translokaci dochází k fúzi spojovací oblasti ( $J_H$ ) genu pro *IgH* na chromozomu 14 a oblasti genu *CCND1* (dříve *BCL-1*) na chromozomu 11. Díky tomu dochází k vysoké expresi cyklinu D1 (kódován genem *CCND1* nacházejícím se v lokusu 11q13), který je přítomen pouze u prolifерujících progenitorů B-lymfocytů a umožňuje progresi buněčného cyklu z G1 do S fáze fosforylací proteinu Rb (nádorový supresor retinoblastoma proteinu). Deregulace tohoto cyklinu vede ke zvýšené proliferaci myelomových buněk v důsledku přemístění genu do blízkosti zesilovače transkripce *IgH* genu (Obrázek č. 11) (Kubiczková *et al.*, 2013). Gen *MYEOV* se vyskytuje poblíž genu *CCND1* v oblasti 11q13, což vede k jejich společné deregulaci díky dalšímu zesilovači transkripce. Jeho aktivace je však nekonzistentní z důvodu inhibice epigenetickým mechanismem (Janssen *et al.*, 2002).



**Obrázek č. 11.:** Schématické znázornění translokace t(11;14)(q13;q32) (převzato a upraveno podle Portál české leukemické skupiny, 2021).

A – organizace genového lokusu *CCND1*, MTC (*major translocation cluster*) je bod zlomu v hlavním translokačním klastru (lokalizován přibližně 120 kb od genu *CCND1*); B – organizace lokusu *IgH*, modrá šipka znázorňuje místo zlomu uvnitř oblasti *J<sub>H</sub>*; C – translokace *CCND1/IgH*, černá šipka označuje místo spoje MTC s oblastí *J<sub>H</sub>* uvnitř *IgH* genu

Translokace t(4;14)(p16;q32) dereguluje gen *FGFR3* (gen pro receptor fibroblastového růstového faktoru 3) na chromozomu 14 a gen *MMSET* (*multiple myeloma SET domain*) na chromozomu 4. Gen *FGFR3* se podílí na regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a aktivaci příslušných signálních drah. Gen *MMSET* je regulátorem transkripce a je hojně exprimován zejména v rychle rostoucích tkáních (Malgeri *et al.*, 2000).

Translokace t(14;16)(q32;q23) vede k deregulaci genu *c-MAF* (c-muskuloaponeurotický fibrosarkom) ležícím na chromozomu 16 (oblast 16q23). Jedná se o transkripční faktor, který reguluje transkripci pomocí cyklického adenosinmonofosfátu (c-AMP), který byl identifikován jako důležitý onkogen při vývoji lymfoidních malignit. Vysoká hladina proteinu MAF je u pacientů MM léčených bortezomibem spojena s rezistencí (Qiang *et al.*, 2016; Narita *et al.*, 2015).

Translokace t(4;14) a t(14;16) se vyskytují pouze v 2–3 % případů pacientů s AL amyloidózou (Warsame *et al.*, 2015). Translokace t(11;14) a další translokace zahrnující gen *IgH* se neobjevují společně (Rajan *et Rajkumar*, 2015). Translokace t(6;14)(p21;q32) způsobuje deregulaci genu *CCND3* (6p21), který plní obdobnou funkci v buněčném cyklu jako gen *CCND1* (Sonoki *et al.*, 2001). K nadměrné expresi genu *MAFb* (20q12) dochází při translokaci t(14;20)(q32;q12). Tento gen náleží do rodiny MAF transkripčních faktorů, které vyvolávají onkogenní aktivitu (Qiang *et al.*, 2018).

### 3.5.1 Delece *RBI* genu

Delece či monozomie chromozomu 13 jsou časté jak u MM, tak i AL amyloidózy a výrazně ovlivňují jejich patogenezi. Kandidátní tumor supresorový gen pro retinoblastom (*RBI*) se nachází v oblasti 13q14 a hraje roli při tvorbě novotvarů B-lymfocytů. Delece genu *RBI* je markerem monozomie chromozomu 13 – až 90 % pacientů s touto delecí má potvrzenou také monozomii chromozomu 13 (Brito-Babapulle *et al.*, 2001). Mutace v genu *RBI* má vliv na funkci buněčného cyklu díky jeho negativní regulaci přes protein RB1, který hraje v buněčném cyklu klíčovou roli díky jeho interakcím s ostatními proteiny a geny skrz fosforylaci. Ztráta jeho funkce má vliv na diferenciaci, délku přežití, senescenci a stabilitu genomu (Dyson, 2016).

### 3.5.2 Abnormality chromozomu 1

Patří zde delece krátkého ramene (1p) a zmnožení dlouhého ramene (1q). Obě tyto změny jsou spojeny se špatnou prognózou. Studie uvádí, že příčinou zmnožení oblasti 1q21 bylo téměř vždy duplikace celého dlouhého ramene chromozomu 1, ale nikoli v důsledku trizomie chromozomu 1. Zmnožení oblasti má nepříznivý prognostický dopad na pacienty s AL amyloidózou léčených melfalanem/dexametazonem a některými autory je dokonce tato aberace považována za indikátor progresu AL amyloidózy stejně jako u MM. Tato studie také zjistila potenciální nepříznivý prognostický účinek souběžného výskytu zmnožení 1q, delece 14q a delece 1p (Granzlow *et al.*, 2017). V oblasti 1q21 se nachází gen *CKS1B*, jehož nadměrná exprese napomáhá progresi buněčného cyklu podporou degradace proteinu p27 uvolněním CDK a vstupem do mitózy což vede k více proliferativní maligní PB, která souvisí s nepříznivým klinickým průběhem a špatnou prognózou. Gen *CDKN2C* nacházející se v oblasti 1p32 (protein p18) je tumor supresorový gen, který zodpovídá za podporu apoptické

buněčné smrti a DNA. Delece tohoto genu je spojena s více proliferativním onemocněním. (Abd El-Naby *et al.*, 2016).

### **3.5.3 Delece genu *TP53***

Deregulace tumor supresoru *TP53* (oblast 17p13) hraje klíčovou roli v patogenezi mnoha druhů onkologických nemocí. U mnoha nádorů byla pozorována inaktivace proteinu p53, který kontroluje buněčnou proliferaci, apoptózu a diferenciaci. Nejčastěji dochází k mutacím či delecím genu, což naznačuje souvislost s progresí nádoru. Monoalelická delece krátkého ramene chromozomu 17 (17p) je nejčastějším typem, který je spojen se špatnou prognózou a je detekována u zhruba 10 % pacientů nově diagnostikovaných MM. Bialelická delece je vzácná a inaktivace druhé kopie genu *TP53* bývá způsobena bodovou mutací. Duplikace genu *TP53* může naznačovat trizomii chromozomu 17 (Drach *et al.*, 1998; Lakshman *et al.*, 2019).

### **3.5.4 Hyperdiploidie**

Zatímco v patogenezi MM jsou hyperdiploidie a nonhyperdiploidie považovány za dvě hlavní cytogenetické dráhy, frekvence hyperdiploidie u pacientů s AL amyloidózou je zhruba 11 % (MGUS 30 %, MM 46 %). Na základě onkogenetického modelu zahrnujícího 6 hlavních cytogenetických aberací u AL amyloidózy se zjistilo, že hyperdiploidie a translokace t(11;14) se téměř vzájemně vylučují, zatímco zmnožení 1q21 zvýhodňuje hyperdiploidii (Bochtler *et al.*, 2011).

## **3.6 Možnosti detekce změn u AL amyloidóz**

### **3.6.1 FISH**

Fluorescenční *in situ* hybridizace je molekulárně cytogenetická technika, která se využívá k detekci genetických abnormalit jako jsou genové fúze, aneuploidie, ztráta nebo duplikace části či celého chromozomu. Základem metody FISH je jednořetězcová sonda hybridizující ke komplementární DNA sledovaného genu, chromozomu nebo jeho části. Sonda bývá značená přímo prostřednictvím fluorescenčních nukleotidů (fluorofor) nebo nepřímo za pomoci reportérových molekul, které jsou inkorporovány do sledované DNA a následně vizualizovány díky fluorescenčně značeným protilátkám či jiným afinitním molekulám (Ratan *et al.*, 2017).



Metoda FISH se standardně využívá i na interfázních buňkách, proto není nutná mitotická aktivita patologických buněk potřebná při sestavení karyotypu. U AL amyloidózy však není příliš vhodná kvůli nízkému zastoupení patologických buněk (Warsame *et al.*, 2015). Proto se při studiu specifických abnormalit používá varianta FISH na selektovaných interfázních jádrech (Muchtar *et al.*, 2017).

### 3.6.2 Metody detekce plazmatických buněk

Při vyšetřování novotvarů je možné identifikovat požadovanou buněčnou populaci metodou FICTION (cIg-FISH), která kombinuje FISH s imunofenotypizací (Giefing *et Siebert*, 2019). Tato kombinace zajišťuje simultánní detekci imunofenotypových markerů i genetických aberací, což je důležité pro pochopení patogeneze onemocnění i klasifikaci malignit (Martínez-Ramírez *et al.*, 2004). Při vyšetřování abnormalit PB se využívá fluorescenčního značení cytoplazmatických lehkých řetězců monoklonálního Ig (kappa nebo lambda), což vede k analýze abnormalit pouze v patologické populaci (Kim *et al.*, 2016). Existuje také varianta vícebarevné FICTION (M-FICTION), která umožňuje simultánní detekci morfologických, imunofenotypových a genetických charakteristik jednotlivých buněk (Martín-Subero *et al.*, 2002).

### 3.6.3 MACS a FACS

Technika MACS (magneticky aktivovaná separace buněk) je široce využívaná pro separaci buněk jednoho typu buněk od ostatních buněčných populací (Pan *et Wan*, 2020). Funguje na principu magnetických kuliček umístěných v magnetickém poli, na které jsou navázány protilátky (případně enzymy, lektiny či streptavidiny), které se vážou na specifické buněčné proteiny. Magnetické pole polarizuje značené buňky, které se zachytávají na koloně a následně jsou eluovány. Takto je možno obohatit danou frakci buněk v různých fázích zrání či velikosti (ploidie) s čistotou až 90 % (Barh *et Azevedo*, 2019). U AL amyloidózy se využívá povrchového antigenu PB CD<sub>138+</sub> proti němuž je použita protilátka anti-CD<sub>138+</sub> navázaná na povrchu magnetické kuličky (Bochtler *et al.*, 2008).

Další variantou je technika FACS (třídění buněk aktivovaných fluorescenčně), která je založena na značení buněk fluorescenčně značenými protilátkami, díky čemuž buňky mohou být izolovány v různých parametrech (využívá více povrchových značek) a izolovat více

subpopulací o vysoké čistotě najednou. Metoda je relativně časově náročná a při velkých počtech buněk vyžaduje nákladné vybavení (Pan *et* Wan, 2020).

### **3.6.4 Array komparativní genomová hybridizace (aCGH)**

Tato technika umožňuje analýzu genomu s vysokým rozlišením včetně detekce abnormalit v počtu kopií genů (*copy number variation*, CNV), které zodpovídají za daný fenotyp. Detekuje abnormality ve známých genech, ale může také identifikovat nové kandidátní geny pro dané onemocnění. Většina těchto platform je navržena k detekci aneuploidií, mikroleccí nebo mikroduplikací, subtelomerických a podobných chromozomových přestaveb, které jsou klasickými cytogenetickými technikami obtížně rozpoznatelné (Raca *et al.*, 2011). Princip spočívá v odlišně značených vzorcích genomové DNA (testovaná a referenční – odlišné fluorochromy), které jsou hybridizovány na čip, kde jsou imobilizovány oligonukleotidy skládající se z fragmentů DNA daného genomu (Bejjani *et* Shaffer, 2006). Citlivost pro detekci změn představuje délka DNA kolem 1 kb (La Cognata *et al.*, 2018).

### **3.6.5 Sekvenování nové generace**

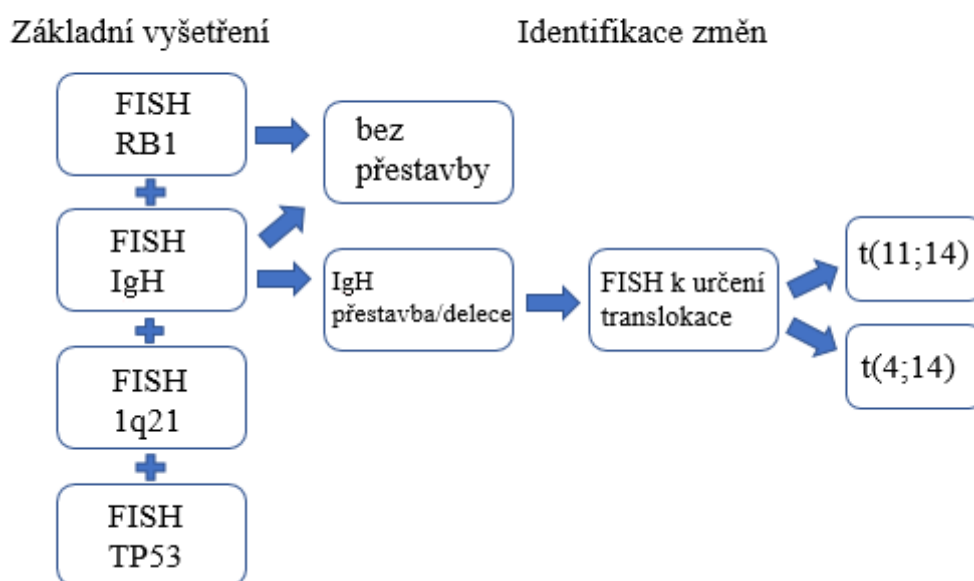
Sekvenační technologie jsou další metodou pro detailnější identifikaci pacientů s AL amyloidózou, a to na úrovni sekvence DNA. Cílí především na potenciální rozdíly mezi genomickými profily pacientů s AL amyloidózou a MM. Napomáhají tak přesnější identifikaci pacientů s monoklonální gamapatií s vyšším rizikem vzniku AL amyloidózy na základě presymptomatického poškození orgánů. Provádí se například celoxomové sekvenování (soubor všech exonů v genomu) vysoce purifikovaných PB v KD s cílem hledat jednonukleotidové polymorfismy a inserční a deleční změny (Cuenca *et al.*, 2021).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

K vyšetření pacientů byla použita KD od pacientů diagnostikovaných a léčených na Hemato-onkologické klinice (HOK) a III. interní klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UP Olomouc v období od května 2005 do října 2020. Jedná se o retrospektivní a prospektivní analýzu. Postup při vyšetření KD je uveden na Obrázku č. 12.

#### SCHEMA VYŠETŘENÍ FICTION



**Obrázek č. 12.:** Schématický postup vyšetření vzorků pacientů s AL amyloidózou s využitím základních FISH sond.

### 4.2 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

#### Kultivace buněk KD pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření:

- 1-3 ml KD jsou odebrány do odběrové zkumavky s protisrážlivým činidlem heparinem lithným.
- KD přelit do centrifugačních zkumavek o objemu 15 ml a doplnit 10 ml media RPMI-1640 (odstranění heparinu)
- Opatrně promíchat a stočit 10 minut při 1 000 g.
- Slít supernatant, jemně promíchat pipetou a přenést do kultivační nádoby s BM médiem.

5. Přidat 2 kapky kolcemidu.
6. Inkubovat v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin.

### **Zpracování biologického materiálu pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření:**

1. Připravit fixační roztok Carnoye smícháním methanolu s kyselinou octovou v poměru 3 : 1.
2. Obsah kultivačních nádob slít do označených 15ml centrifugačních zkumavek.
3. Centrifugovat 10 minut při 1 000 g při 37 °C.
4. Slít supernatant a přidat 10 ml 0,075 mol·l<sup>-1</sup> roztoku KCl vytemperovaného na 37 °C (lýza buněk).
5. Inkubovat 20 minut v termostatu při 37 °C.
6. Přidat 1 kapku vychlazeného fixačního roztoku Carnoye a promíchat (pročištění od kusů cytoplazmy).
7. Centrifugovat 10 minut při 1 000 g při 37 °C.
8. Slít supernatant a přidat 10 ml vychlazeného fixačního roztoku Carnoye. První mililitr přidat pomalu po kapkách. Obsah zkumavky promíchat pomocí vortexu.
9. Inkubovat 30 minut při pokojové teplotě.
10. Centrifugovat 10 minut při 1 000 g při 4 °C.
11. Slít supernatant a přidat 10 ml fixačního roztoku Carnoye. Obsah zkumavky promíchat pomocí vortexu.
12. Opakovat kroky 10 a 11 dokud nemá buněčná suspenze mléčné opaleskující zbarvení (zhruba 3x–4x).
13. Buněčnou suspenzi lze skladovat v lednici k vyšetření po dobu až několika týdnů.
14. Archivace materiálu u starších vzorků probíhá zamražením 2 ml buněčné suspenze ve fixačním roztoku v řádně označených mikrozkuškách při -20 °C. Nově příchozí vzorky jsou řádně zpracovány a následně také uchovávány ve fixačním roztoku při -20 °C.

## **FICTION**

### **Příprava biologického materiálu:**

1. Buněčnou suspenzi ve fixačním roztoku centrifugovat 10 minut při 1 000 g.
2. Supernatant slít a převrstvit cca 10 ml 96% ethanolu, protřepat a inkubovat 10 min při pokojové teplotě.
3. Centrifugovat 10 min při 1 000 g, opakovat krok č. 2.
4. Centrifugovat 10 min při 1 000 g, naředit cca 1 ml 96% ethanolu.

### **Příprava preparátu pro FICTION:**

1. Dýchnout na podložní sklo a nakapat 2–3 kapky buněčné suspenze z výšky cca 30 cm, pod mikroskopem (obj. 10 nebo 20, snížený kondenzor) zkontrolovat počet buněk (v případě potřeby přikapat suspenzi, případně naředit) a nechat volně uschnout.
2. Do vodní lázně vložit koplínu s roztokem 10 mmol·l<sup>-1</sup> citrátového pufru a vyhřát lázeň na 95 °C Po vytemperování vložit připravený preparát a inkubovat 10 min.
3. Vyjmout koplínu z vodní lázně a volně nechat chladnout při pokojové teplotě 30 min.
4. Preparát opláchnout v 1x PBS pufru 2x po dobu 2 minut.
5. Na parafilm napipetovat 60 µl naředěné protilátky Amca Anti-Human kappa/lambda-chain podle typu lehkého řetězce u vyšetřovaného pacienta. Překrýt parafilmem a inkubovat 1 hodinu při 37 °C ve vlhké komůrce.
6. Odstranit parafilm a opláchnout preparát v 1x PBS pufru 2x po dobu 2 minut.
7. Na parafilm napipetovat 60 µl naředěné Amca Anti-goat IgG protilátky. Překrýt parafilmem a inkubovat cca 1 hodinu při 37 °C ve vlhké komůrce.
8. Opatrně odstranit parafilm a opláchnout preparát opět v 1x PBS pufru 2x po dobu 2 minut.
9. Provést odvodnění preparátu postupným promýváním ve vzestupné řadě ledových alkoholů (uskladněny při -20 °C). Inkubovat po dobu 2 min v 70%, 80% a 96% ethanolu.
10. Preparát přenést na vytemperovanou plotýnku na 45 °C a nechat uschnout.

### **Příprava sondy (podle příbalového letáku):**

1. Napipetovat 8  $\mu\text{l}$  sondy do 0,5ml mikrozkušavky a denaturovat ve vodní lázni podle návodu od výrobce.
2. Denaturovanou sondu pipetovat na krycí sklo (22 x 22 mm) a překrýt podložním sklem s již připraveným preparátem.
3. Okraje krycího skla převrstvit Rubber cementem.
4. Hybridizovat ve vlhké komůrce přes noc.

### **Příprava preparátu u pacientů s nedostatkem materiálu:**

#### Zpracování nátěru KD:

1. Skla převrstvit fixací z methanolu a octové kyseliny v poměru 3 : 1 a inkubovat 10 minut.
2. Slít zbytek fixace a převrstvit novou fixací ve stejném poměru, inkubovat 10 minut.
3. Slít zbytek fixace a nechat skla uschnout.
4. Ve skleněné kopolině smíchat 99 ml vody s 1 ml HCl a vyhřát na 37 °C.
5. Do vyhřáté kopoliny přidat 500  $\mu\text{l}$  rozpuštěného pepsinu (odstranění cytoplazmy) a ihned vložit skla a inkubovat 7 minut.
6. Skla opláchnout v 1% PBS 3 minuty.
7. Přidat 50  $\mu\text{l}$  postfixačního roztoku (1% formaldehyd v PBS a 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ), přikrýt parafilmem a nechat inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
8. Odstranit parafilm a skla opláchnout v 1% PBS 3 minuty.
9. Skla odvodnit postupným promýváním ve vzestupné řadě ledových alkoholů (uskladněny při -20 °C). Inkubovat po dobu 2 min v 70%, 80% a 96% ethanolu.
10. Nechat skla uschnout.

#### Rehybridizace odečteného skla:

1. Odstranit krycí skla, podložní skla s biologickým materiálem a navázanou sondou inkubovat 10 minut v 96% ethanolu.
2. Nechat skla uschnout na plotýnce vytemperované na 45 °C.
3. Na nové krycí sklo pipetovat 8  $\mu\text{l}$  příslušné sondy a okraje krycího skla převrstvit Rubber cementem.

4. Provést kodenaturaci a sondy v termobritu podle návodu od výrobce.
5. Umístit skla do vlhké komůrky a nechat inkubovat přes noc.

### **Odmývání:**

1. Druhý den odstranit Rubber cement a krycí sklíčko.
2. Podložní sklo s preparátem odmyt ve vodní lázni vyhřáté na 73 °C v kopolině s 0,4x SSC + 0,3% NP40 2 minuty.
3. Poté inkubovat při pokojové teplotě v kopolině s 2x SSC + 0,1% NP40 2 minuty.
4. Nechat schnout na plotýnce vytemperované na 45 °C.
5. Na nové krycí sklo (24 x 24 mm) napipetovat 10 µl antifade (bez *dapi-counterstrain diluent*) pro vizualizaci buněk překrýt podložním sklem se zaschnutým preparátem.

Hodnocení preparátu probíhá pomocí fluorescenčního mikroskopu BX-60 (Olympus) Preparát se hodnotí s využitím příslušných fluorescenčních filtrů. Hodnotí se 50–100 PB, které jsou obarveny modře díky specifickým protilátkám Amca Anti-Human-kappa/lambda-chain. Obraz se snímá CCD kamerou a ukládá do systému ISIS (MetaSystems). Výsledek je zapsán podle platných pravidel cytogenetické nomenklatury ISCN (*An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*) (McGowan-Jordan *et al.*, 2020). Pro určení diagnózy a hodnocení AL amyloidózy se standardně využívají komerčně dostupné genové sondy, které jsou uvedené v Tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3.:** Seznam a charakteristika použitých genových sond.

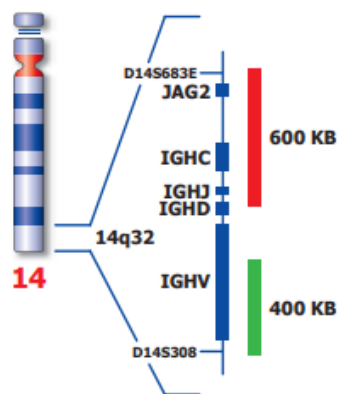
Název sondy	Lokalizace	Značení sondy	Výrobce	Katalogové číslo
IgH (14q32) Break	14q32	5' konec zeleně, 3' konec červeně	Kreatech	KBI-10601
ZytoLight SPEC IgH Dual Color Break Apart Probe	14q32	5' konec zeleně, 3' konec červeně	Zytovision	Z-2110-200
CCND1/IgH t(11;14) Fusion	18q21/14q32	<i>IgH</i> červeně, <i>CCND1</i> zeleně	Kreatech	KBI-10604
ZytoLight FGFR3/IgH t(4;14) Dual Color Dual Fusion Probe	4p16/14q32	<i>IgH</i> zeleně, <i>FGFR3</i> červeně	Zytovision	Z-2282-50
RB1 (13q14)/RCAN1 (21q22)	13q14/21q22	13q14 zeleně, 21q22 červeně	Kreatech	KBI-40003
Cytotest RB1/CCP15 FISH Probe Kit	13q14.2	<i>RB1</i> červeně, <i>CCP15</i> zeleně	Cytotest	CT-PAC391-10-OG
1q21/SRD (1p36)	1q21/1p36	1q21 zeleně, 1p36 červeně	Kreatech	KBI-10507
ZytoLight SPEC CKS1B/CDKN2C Dual Color Probe	1q21/1p32	1q21 červeně, 1p32 zeleně	Zytovision	Z-2276-200
DLEU1 (13q14)/TP53 (17p13)	13q14/17p13	<i>TP53</i> zeleně, <i>DLEU1</i> červeně	Kreatech	KBI-10113
TP53 (17p13)/MPO (17q22) "ISO 17q"	17p13/17q22	<i>TP53</i> zeleně, <i>MPO</i> červeně	Kreatech	KBI-10011
ZytoLight SPEC TP53/CEN 17 Dual Color Probe	17p13/17q22	<i>TP53</i> červeně, <i>CEN17</i> zeleně	Zytovision	Z-2153-200

### 4.3 Použité sondy

- **IgH (14q32) Break**

Sonda je navržena k detekci translokací zahrnujících *IgH* gen (14q32). Zeleně je značen 5', červeně 3' konec *IgH* genu. Normální nález je v mikroskopu zobrazen jako 2 fúzní signály žluté barvy. V případě translokace je vidět jeden fúzní signál, jeden červený a jeden zelený. Delece 5' konce *IgH* je zobrazena jako 1 fúzní žlutý signál a 1 červený signál. Delece 3' konce *IgH* je zobrazena jako 1 fúzní žlutý signál a 1 zelený signál.

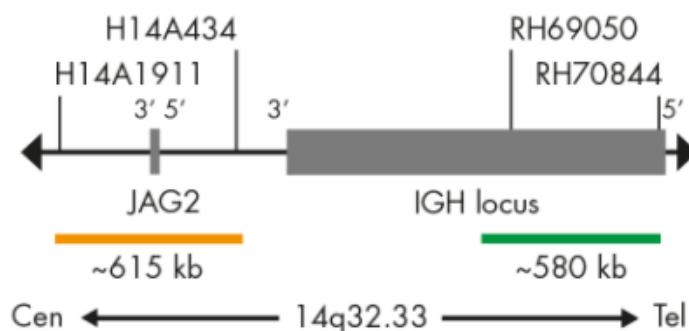




Obrázek č. 13.: Mapa sondy IgH (14q32) Break.

- **ZytoLight SPEC IgH Dual Color Break Apart Probe**

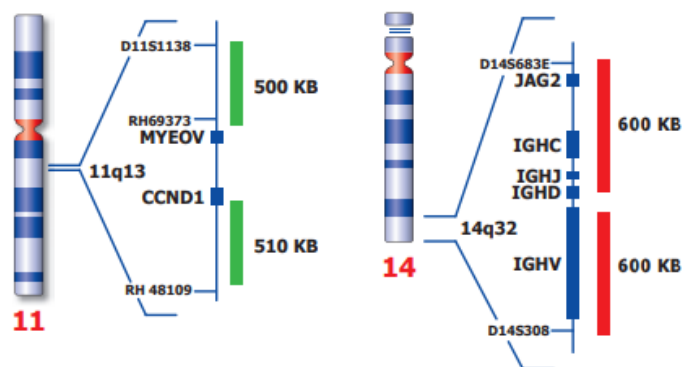
Sonda je navržena ke kvantitativní detekci translokací zahrnujících *IgH* oblast v 14q32 lokusu. Vzorec signálů je shodný jako u sondy IgH (14q32) Break.



Obrázek č. 14.: Mapa sondy ZytoLight SPEC IgH Dual Color Break Apart Probe.

- **CCND1/IgH t(11;14) Fusion**

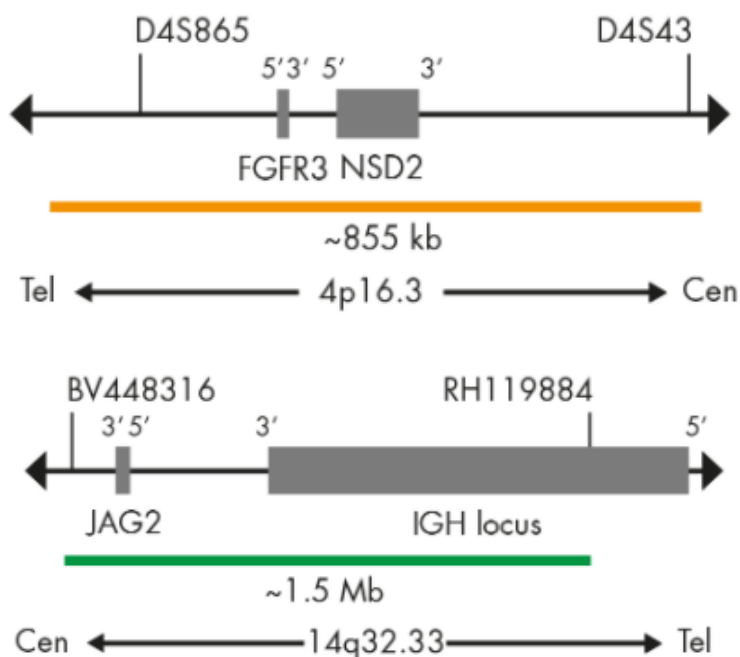
Sonda je navržena k detekci translokací genů *CCND1/IgH* pro přestavby na chromozomech 11 a 14. Normální nález je v mikroskopu je zobrazen jako 2 zelené a 2 červené signály. Reciproká translokace t(11;14) je zobrazena jako 2 fúzní žluté signály, 1 zelený a 1 červený signál. Variantní translokace při delecí 5' konce *IgH* je zobrazena jako 1 fúzní žlutý signál, 2 zelené signály a 1 červený signál. Pokud se jedná o jinou translokaci zobrazí se 2 zelené a 3 červené signály.



Obrázek č. 15.: Mapa sondy CCND1/IgH t(11;14) Fusion.

- **ZytoLight FGFR3/IgH t(4;14) Dual Color Dual Fusion Probe**

Sonda je navržena k detekci translokací genů *FGFR3/IgH* pro přestavby na chromozomech 4 a 14. Normální nález je zobrazen jako 2 zelené a 2 červené signály. Reciproká translokace je zobrazena jako 2 fúzní signály, 1 zelený a 1 červený.

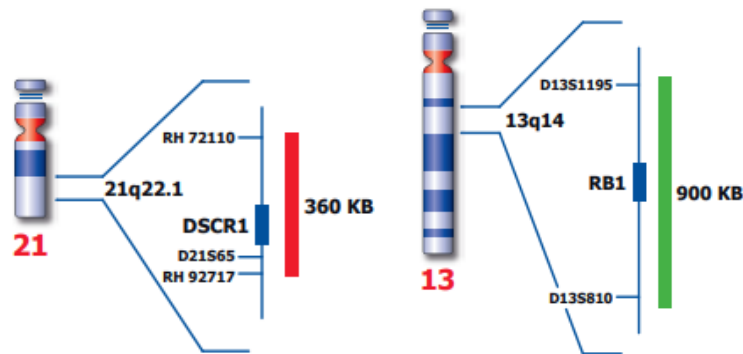


Obrázek č. 16: Mapa sondy ZytoLight FGFR3/IgH t(4;14) Dual Color Dual Fusion Probe.

Stejně jsou naznačeny i sondy pro ostatní translokace, které jsou použity u prospektivního souboru: t(14;16), t(14;20) a t(6;14).

- **RB1 (13q14)/RCAN1 (21q22)**

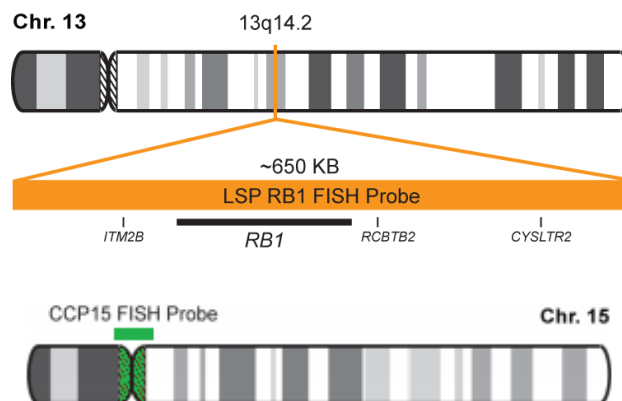
Sonda je navržena k detekci zmnožení oblasti 21q22 a delecii 13q14. Normální nález je v mikroskopu zobrazen jako 2 zelené a 2 červené signály a delece *RB1* 1 zeleným a 2 červenými signály. Duplikace v oblasti 21q22 (předpokládaná trizomie chromozomu 21) je zobrazena jako 2 zelené a 3 červené signály. Další možná kombinace je duplikace oblasti 21q22 a delece *RB1* genu, tj. 3 červené a 1 zelený signál.



Obrázek č. 17.: Mapa sondy RB1 (13q14)/RCAN1 (21q22).

- **Cytotest RB1/CCP15 FISH Probe Kit**

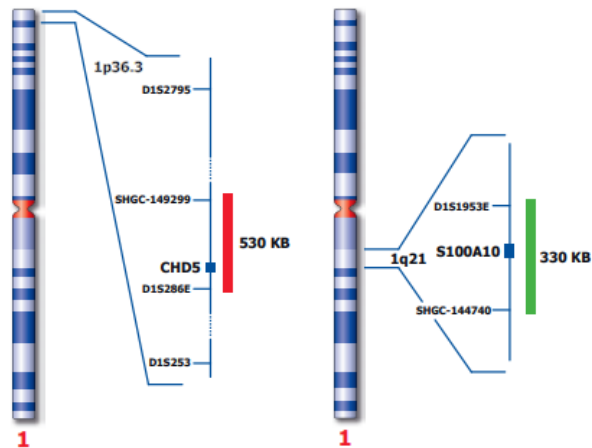
Sonda je navržena k detekci delecce *RB1* genu (13q14.2) a současně detekuje počet kopií chromozomu 15 v buňce. Normální nález je zobrazen jako 2 zelené a 2 červené signály. Delece *RB1* je zobrazena jako 2 zelené a 1 červený signál, trizomie chromozomu 15 jako 3 zelené a 2 červené signály. Obě změny současně jsou zobrazeny jako 3 zelené a 1 červený signál.



Obrázek č. 18.: Mapa sondy Cytotest RB1/CCP15 FISH Probe Kit.

- **1q21/SRD (1p36) (Kreatech)**

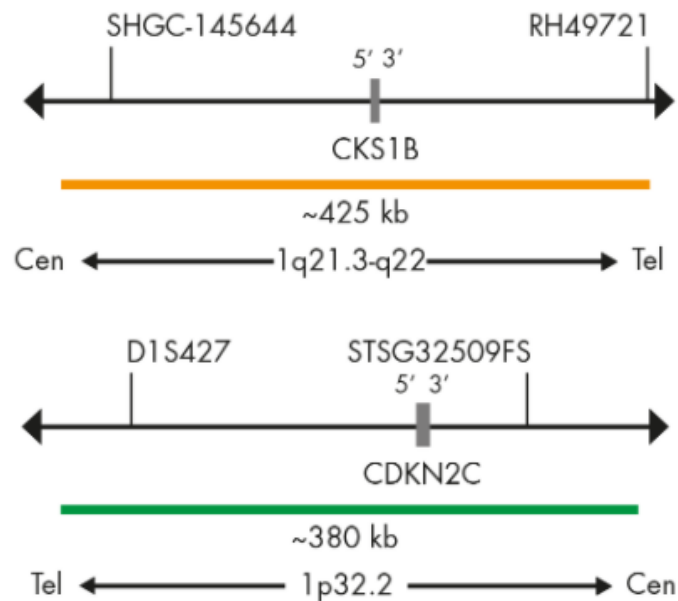
Sonda je navržena k detekci počtu kopií v oblastech 1q21 a 1p36. Normální nález je v mikroskopu zobrazen jako 2 zelené a 2 červené signály. Duplikace oblasti 1q21 je 3 zelené a 2 červené signály, delece 1p36 jako 2 zelené a 1 červený signál.



Obrázek č. 19.: Mapa sondy 1q21/SRD (1p36).

- **ZytoLight SPEC CKS1B/CDKN2C Dual Color Probe**

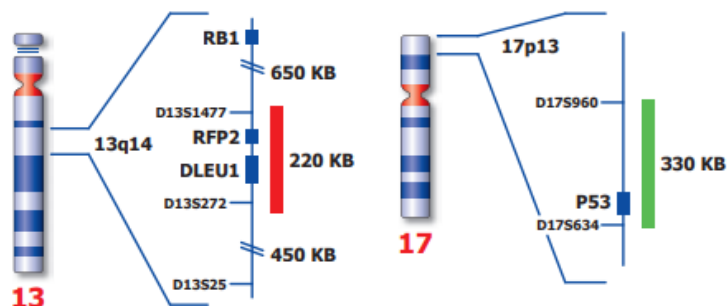
Sonda je navržena ke kvantitativní detekci zmnožení zahrnující *CKS1B* gen (1q21.3-q22) a delece zahrnující gen *CDKN2C* (1p32.2). Vzorec u normálního nálezu je shodný jako u sondy 1q21/SRD (1p36), duplikace 1q21 oblasti je zobrazen jako 2 zelené a 3 červené signály.



Obrázek č. 20.: Mapa sondy ZytoLight SPEC CKS1B/CDKN2C Dual Color Probe.

- **DLEU1 (13q14)/TP53 (17p13)**

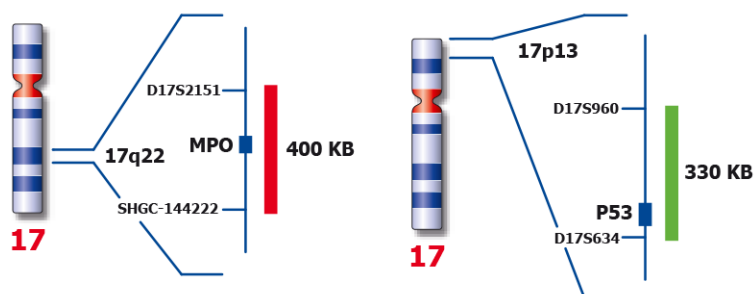
Sonda je navržena k detekci delece genu *DLEU1* (13q14) oblasti a deleci genu *TP53* (17p13). Normální nález je v mikroskopu zobrazen jako 2 zelené a 2 červené signály. Delece *TP53* je zobrazena 1 zeleným a 2 červenými signály a delece *DLEU1* 2 zelenými a 1 červeným signálem. Duplikace *TP53* (předpokládaná trizomie chromozomu 17) je zobrazena jako 3 zelené a 2 červené signály.



Obrázek č. 21.: Mapa sondy DLEU1 (13q14)/TP53 (17p13).

- **TP53 (17p13)/MPO (17q22) “ISO 17q”**

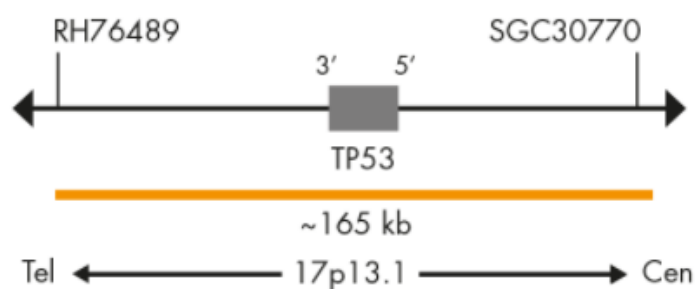
Sonda je navržena k detekci početních změn oblastí 17p13 a 17q22. Normální nález je v mikroskopu zobrazen jako 2 zelené a 2 červené signály. Delece *TP53* je zobrazena 1 zeleným a 2 červenými signály a delece *MPO* 2 zelenými a 1 červeným signálem. Duplikace *TP53* (předpokládaná trizomie chromozomu 17) je zobrazena jako 3 zelené a 3 červené signály.



Obrázek č. 22.: Mapa sondy TP53 (17p13)/MPO (17q22) “ISO 17q”.

- **ZytoLight SPEC TP53/CEN 17 Dual Color Probe**

Sonda je navržena ke kvantitativní detekci delecí genu *TP53* a tandemových repetic v centromerické oblasti chromozomu 17. Normální nález je v mikroskopu zobrazen jako 2 zelené a 2 červené signály. Delece *TP53* je zobrazena jako 2 zelené a 1 červený signál. Trizomie chromozomu 17 je zobrazena jako 3 zelené a 3 červené signály.



**Obrázek č. 23.:** Mapa sondy ZytoLight SPEC TP53/CEN 17 Dual Color Probe.

- **Vysis CEP 7 (D7Z1) SpectrumOrange Probe, Vysis CEP 9 SpectrumOrange Probe, Vysis CEP 11 (D11Z1) SpectrumOrange Probe, Vysis CEP 15 (D15Z1) SpectrumGreen Probe**

Sondy jsou navrženy ke kvantitativní detekci počtu chromozomů, normální nález jsou 2 signály, abnormální jiný počet. V případě sondy Vysis CEP 7 (D7Z1) SpectrumOrange Probe a Vysis CEP 9 SpectrumOrange Probe je normální nález zobrazen 2 červenými signály. Sondy Vysis CEP 11 (D11Z1) SpectrumOrange Probe a Vysis CEP 15 (D15Z1) SpectrumGreen Probe mají normální nález zobrazen 2 zelenými signály.

#### **4.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

CCD kamera (MetaSystems)

Fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus)

Hybridizační inkubátor ISO20 (Boekel Scientific)

Inkubační vodní lázeň (Julabo)

Inkubátor ThermoBrite (Abbott Molecular)

Laboratorní centrifuga (Trigon-plus)

Laboratorní digestoř (Merci, s. r. o.)

Lednička (Labnet International)

Mrazák (Labnet International)

Počítač

Software ISIS (MetaSystems)

Stolní minicentrifuga CD1008 (Phoenix Instrument)

Světelný mikroskop BX-60 (Olympus)

Topná a sušící deska Medax (Nagel)

Třepačka Reax top (Heidolph)

Vodní vana BATH 6l (Nüve)

#### **4.5 Laboratorní pomůcky**

Centrifugační zkumavky Falcon 15 ml (Thermo Fisher Scientific)

Centrifugační zkumavky Falcon 50 ml (TPP®)

Fixogum Rubber Cement (Marabu)

Imerzní olej (Olympus)

Krycí skla 22 x 22 mm, 24 x 24 mm (MarienFeld)

Parafilm (Sigma-Aldrich)

Pasteurovy pipety 10 ml (Biosigma)

Plastové mikrozukumavky 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf)

Podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific)

Pinzeta

Pipety

Skleněné koplíny

Špičky (Gilson)

#### **4.6 Použité chemikálie a roztoky**

Amca Anti-goat IgG (Vector Laboratories, kat. č. CI-5000)

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 (Leica, kat. č. LK-097A)

BM médium (Biological Industries, kat. č. 01-199-1B)

Citronan sodný (Lach-Ner, kat. č. 30095)

Deionizovaná H<sub>2</sub>O (HOK)

96% ethanol (Fagron, kat. č. 605455)

Fluorescenčně značené sondy (Kreatech, kat. č. Tabulka č. 3)

Fluorescenčně značené sondy (Zytovision, kat. č. Tabulka č. 3)

Fluorescenčně značené sondy (Cytotest, kat. č. Tabulka č. 3)

KCl (lékárna FNOL)

Karyomax Colcemid (Gibco®, kat. č. 15-210-040)

Kyselina citronová (Lach-Ner, kat. č. 10020-AP0)

Kyselina octová (VWR, kat. č. 64-19-7)

Methanol (Central Chem, kat. č. 67-56-1)

NP40 (Abott Molecular, kat. č. 07J05-001)

10x PBS pufr (Lékárna FNOL)



RPMI-1640 médium (Sigma Aldrich, kat. č. R8758)

20x SSC (Abbott molecular, kat. č. 02J10-032)

Příprava roztoků:

**0,1 mol·l<sup>-1</sup> kyselina citrónová:**

2,101 g kyseliny citrónové

100 ml injekční H<sub>2</sub>O

**0,1 mol·l<sup>-1</sup> citronan sodný:**

4,941 g citronanu sodného

100 ml injekční H<sub>2</sub>O

**10 mmol·l<sup>-1</sup> citrátový pufr:**

9 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> kyseliny citrónové

41 ml 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> citronanu sodného

450 ml injekční H<sub>2</sub>O

**1x PBS pufr:**

5 ml 10x PBS pufru

45 ml injekční H<sub>2</sub>O

**Ředění protilátek pomocí 1x PBS pufru:**

Amca Anti-Human kappa-chain      1 : 10

Amca Anti-Human lambda-chain      1 : 10

Amca Anti-goat IgG                      1 : 20

**20x SSC:**

132 g 20x SSC

500 ml H<sub>2</sub>O

pH 7,0–7,2; uchovávat při laboratorní teplotě

**0,4x SSC/0,3% NP40:**

20 ml 20x SSC

950 ml injekční H<sub>2</sub>O

3 ml NP40

pH 7–7,5

doplnit H<sub>2</sub>O do 1 l, uchovávat při laboratorní teplotě

**2x SSC/0,1% NP40:**

100 ml 20x SSC

850 ml injekční H<sub>2</sub>O

1 ml NP40

pH 7–8

doplnit H<sub>2</sub>O do 1 l, uchovávat při laboratorní teplotě

**80% ethanol:**

83 ml 96% ethanol

17 ml injekční H<sub>2</sub>O

**70% ethanol:**

73 ml 96% ethanol

27 ml injekční H<sub>2</sub>O

#### **4.7 Statistická analýza dat**

Získaná data byla statisticky zpracována pomocí programovacího jazyku R (verze 4.0.5). Takto byly získány Kaplan-Meierovy křivky přežití, kde celkové přežití bylo vypočítáno jako období od stanovení diagnózy do data poslední návštěvy nebo data úmrtí. Jako statisticky významná byla považována hodnota  $P < 0,05$ . Faktorem při analýze dat byla přítomnost nebo nepřítomnost t(11;14). Výsledná křivka přežití je udávána v měsících.

## 5 VÝSLEDKY

Vyšetřovaný soubor tvořilo 42 vzorků KD pacientů diagnostikovaných jako AL amyloidóza. Vyšetřovaný soubor zahrnoval 25 mužů (58 %) a 18 žen (42 %). Retrospektivně bylo vyšetřeno 18 pacientů (43 %), prospektivně 24 pacientů (57 %). Věkový rozsah se pohyboval od 46 do 84 let, medián věku byl 68 let. Nejčastějším imunologickým typem paraproteinu byl Bence Jones protein (imunoglobulinový lehký řetězec přítomný v moči u pacientů s podezřením na MM nebo WM) (19 pacientů; 45,2 %), dále IgG (15 pacientů; 35,7 %), IgA (7 pacientů; 16,7 %) a IgM (1 pacient; 2,4 %). V souboru pacientů převládal typ lehkého řetězce lambda, který se vyskytoval u 32 pacientů (76 %), kappa pouze u 10 pacientů (24 %). Nejčastěji poškozeným orgánem byly ledviny (29 pacientů) a srdce (27 pacientů), méně často byl postižen také nervový systém (8 pacientů), KD (5 pacientů), játra (4 pacienti) nebo GIT (4 pacienti). Postižení dalších orgánů se vyskytovalo minoritně (kůže, svaly, uzliny, měkké tkáně, plíce). Většina pacientů měla poškozeno více orgánů současně. Zastoupení PB v KD bylo v rozmezí 0,8 % až 69 % s mediánem 9,24 %. U 10 pacientů bylo v KD více než 10 % PB a byl jim současně diagnostikován i MM. Ze 42 pacientů žije 23 (55 %), zemřelo 19 pacientů (45 %). Základní charakteristiku souboru přehledně zobrazuje Tabulka č. 4.

**Tabulka č. 4.:** Charakteristika vyšetřovaného souboru pacientů s AL amyloidózou.

Charakteristika souboru		Početní zastoupení
Pohlaví	Muži	25
	Ženy	18
Typ Ig	BJ	19
	IgG	15
	IgA	7
	IgM	1
Typ L řetězce	Lambda	32
	Kappa	10
Postižené orgány	Ledviny	29
	Srdce	27
	NS	8
	KD	5
	Játra	4
	GIT	4
	Žaludek	2
	Kůže	1
	Svaly	1
	Uzliny	1
	Měkké tkáně	1
	Plíce	2

NS – nervový systém, GIT – gastro intestinální trakt, BJ – Bence Jones protein

Pacienti byli rozděleni na základě cytogenetických změn, které jsou podrobně rozepsány v následujících kapitolách. Dále byl soubor rozdělen na pacienty vyšetřované retrospektivní a prospektivní analýzou. Následně byli porovnání pacienti s AL amyloidózou, kteří měli současně i MM a pacienti pouze s AL amyloidózou.

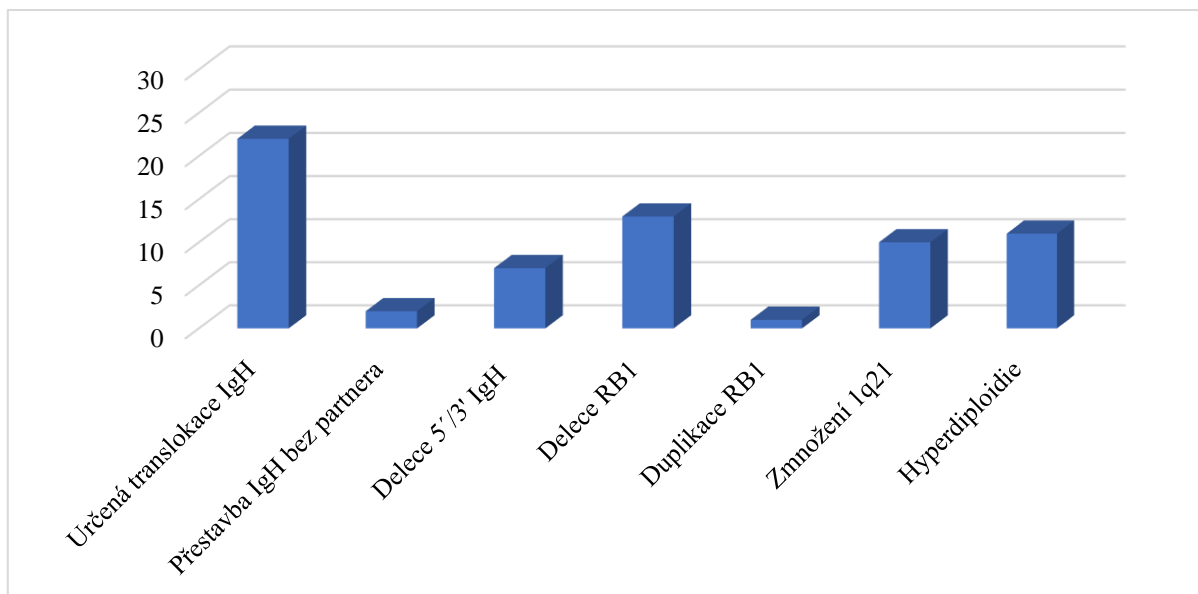
## 5.1 Změny v celkovém souboru pacientů

Analýza souboru 42 pacientů byla zaměřena na výskyt nejčastějších cytogenetických změn u AL amyloidózy (Graf č. 1). Alespoň jedna cytogenetická změna byla detekována u 38 ze 42 (90 %) pacientů. U 4 ze 42 pacientů nebyly detekovány žádné změny, z toho 3 pacienti (7,5 %) byly součástí retrospektivní analýzy a 1 pacient (2,5 %) byl součástí prospektivní analýzy. Hyperdiploidie (trizomie alespoň jednoho z vyšetřovaných chromozomů 7, 9, 11 a 15) byly vyšetřovány pouze u pacientů analyzovaných prospektivně.

U 81 % pacientů se vyskytovaly 1–3 změny, jednu změnu mělo 18 pacientů (43 %), dvě změny 10 pacientů (24 %), tři změny 6 pacientů (14 %) a čtyři změny 4 pacienti (9,5 %). Pacienti se třemi a více změnami mají tzv. komplexní přestavby (10 pacientů, 24 %) (Tabulka č. 5).

**Tabulka č. 5.:** Poměr pacientů podle počtu cytogenetických změn.

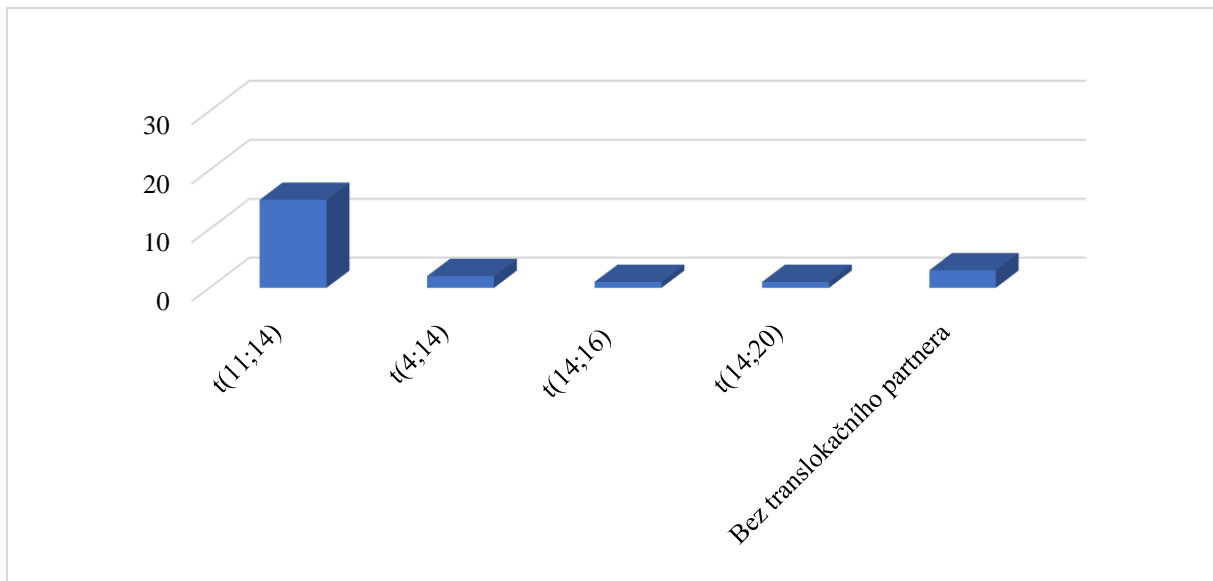
Počet změn	Počet pacientů
0	4
1	18
2	10
3	6
4	4



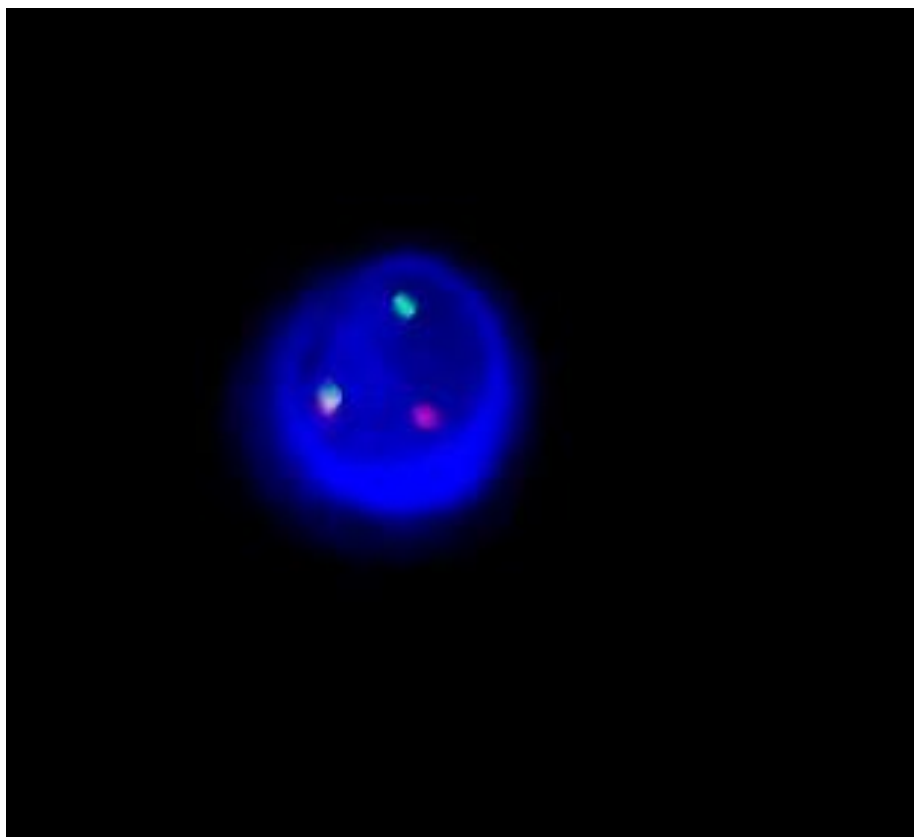
**Graf č. 1.:** Zastoupení jednotlivých cytogenetických změn v souboru 42 pacientů s AL amyloidózou vyšetřovaných metodou FICTION.

### 5.1.1 Změny *IgH* genu

Změny *IgH* genu byly přítomny celkem u 31 ze 42 pacientů (74 %). Přestavba *IgH* se vyskytla u 22 z 31 pacientů (71 %) (Graf č. 2) z toho u 18 pacientů byla klasická přestavba (82 %). Barevné schéma signálů u klasické přestavby *IgH* viditelné pod fluorescenčním mikroskopem zobrazuje Obrázek č. 24. Nejčastěji se vyskytla  $t(11;14)(q13;q32)$  (Obrázek č. 25) – 14 pacientů (77,8 %), 1 pacient měl  $t(14;20)(q32;q12)$  (5,6 %), 1 pacient  $t(14;16)(q32;q23)$  (5,6 %) a u 2 pacientů (11 %) se nepodařilo určit translokačního partnera. Translokace  $t(6;14)(p21;q32)$  se v souboru nevyskytla. Přestavba doprovázená delecí *IgH* byla přítomna u 4 pacientů (18 %), z čehož 1 pacient měl následně potvrzenou  $t(11;14)$ , 2 pacienti měli  $t(4;14)$  a u 1 pacienta se nepodařilo určit translokačního partnera. Parciální delece *IgH* se vyskytla u 7 z 31 pacientů (22,6 %). Z toho 6 pacientů mělo delecí 5' konce *IgH* (85,7 %) a 1 pacient měl delecí 3' konce *IgH* (14,3 %). U 2 ze 6 pacientů s delecí 5' konce *IgH* se potvrdila variantní  $t(11;14)$  (33,3 %). U 2 pacientů (6,5 %) byly přítomny početní změny v *IgH* genu – 1 pacient měl 3 kopie genu *IgH*, 1 pacient měl pouze 1 kopii genu *IgH*.



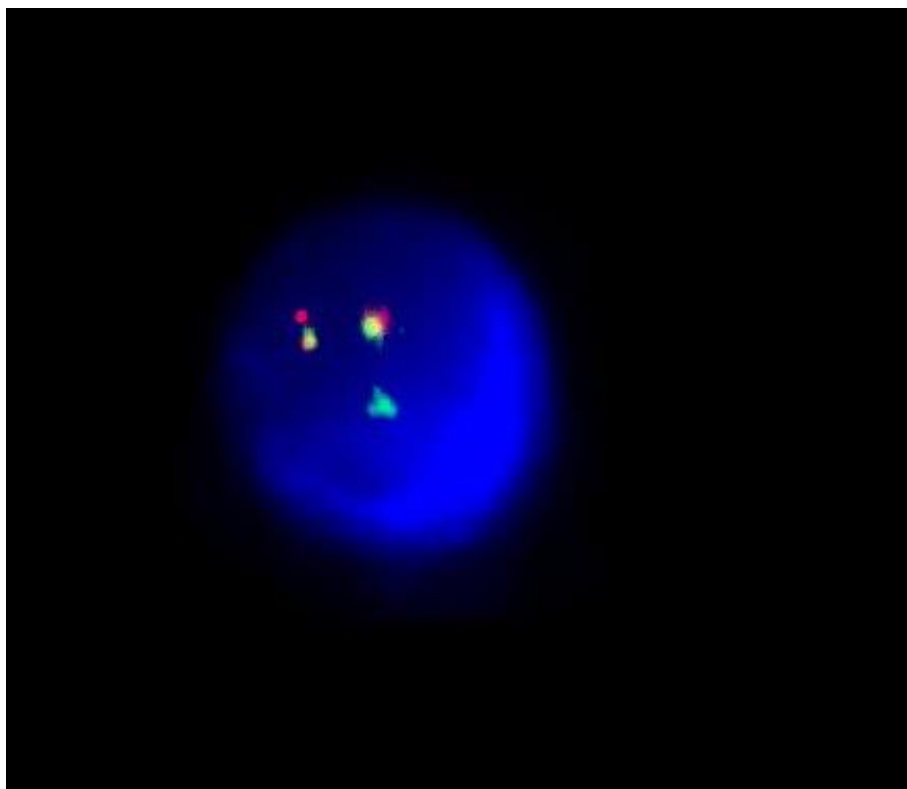
**Graf č. 2:** Zastoupení jednotlivých translokací u přestavby *IgH*.



**Obrázek č. 24.:** Výsledek vyšetření metodou FICTION se sondou IgH (14q32) Break (Kreatech).

Přestavbu *IgH* genu značí 1 fúzní, 1 zelený a 1 červený signál.



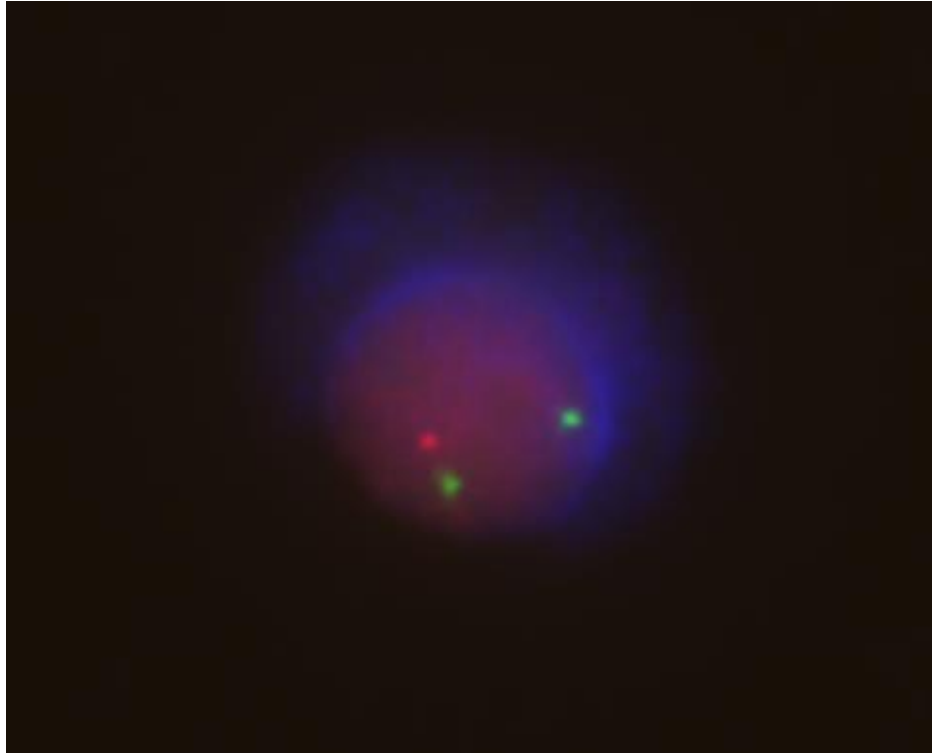


**Obrázek č. 25.:** Výsledek vyšetření metodou FICTION se sondou CCND1/IgH t(11;14) Fusion (Kreatech).

Translokaci t(11;14) značí 2 fúzní, 1 zelený a 1 červený signál.

### 5.1.2 Delece *RB1* genu

U 13 pacientů byla detekována delece genu *RB1* (31 %) (Obrázek č. 26). U všech pacientů s delecí *RB1* genu se vyskytla současně změna v *IgH* genu. Jeden pacient (7,7 %) má současně s delecí *RB1* také trizomii chromozomu 15. U 1 pacienta (7,7 %) se vyskytla duplikace *RB1* genu (3 kopie) společně s duplikací *IgH* a četnými trizomiemi dalších chromozomů. U 5 pacientů (38,5 %) je současně s delecí *RB1* přítomno také zmnožení 1q21.



**Obrázek č. 26.:** Výsledek vyšetření metodou FICTION se sondou RB1/CCP15 FISH Probe Kit (Cytotest).

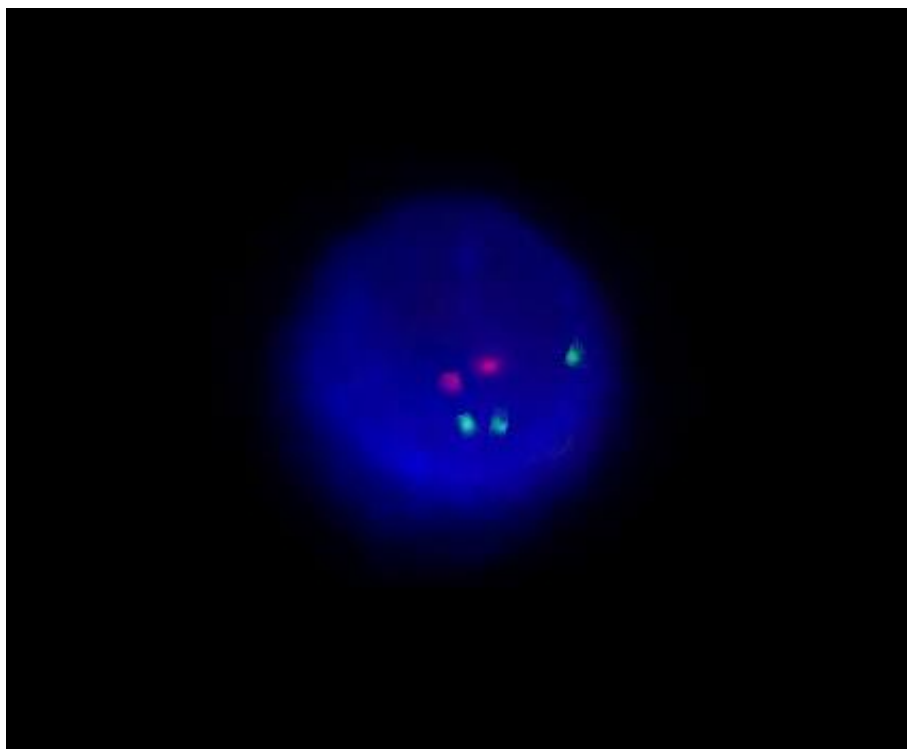
Deleci *RB1* genu značí 1 červený signál.

### 5.1.3 Abnormality chromozomu 1

Celkem u 12 pacientů (28,5 %) bylo přítomno zmnožení oblasti 1q21 (Obrázek č. 27). Většinou se jednalo o 3 nebo 4 kopie (Tabulka č. 6). U 10 pacientů (83,3 %) se zmnožením 1q21 byla přítomna také změna v *IgH*, 2 pacienti (16,7 %) měli trizomie.

**Tabulka č. 6.:** Poměr pacientů s daným počtem kopií 1q21 oblasti.

Zmnožení 1q21	Počet pacientů
3 kopie	4
3–4 kopie	4
3–5 kopií	1
3–6 kopií	1



**Obrázek č. 27.:** Výsledek vyšetření metodou FICTION se sondou 1q21/SRD (1p36) (Kreatech).

Zmnožení oblasti 1q21 značí 3 zelené signály.

#### **5.1.4 Delece *TP53* genu**

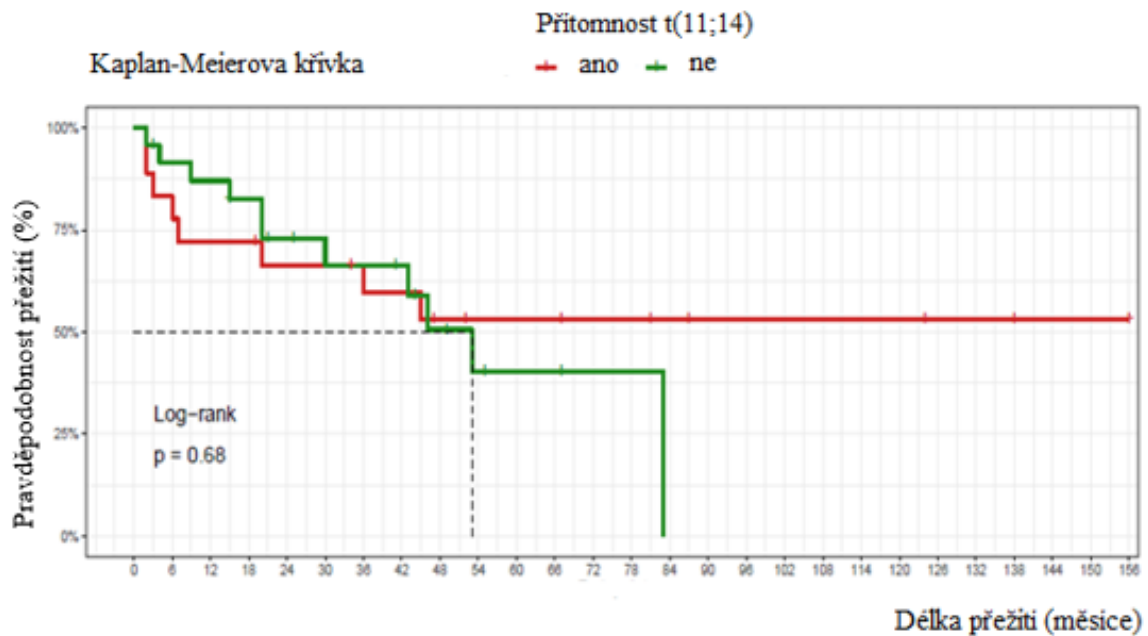
Delece genu *TP53* nebyla prokázána u žádného pacienta. U dvou pacientů (4,8 %) byla zjištěna duplikace tohoto genu a následně prokázána trizomie chromozomu 17. U jednoho pacienta to bylo v kombinaci s delecí 3' konce *IgH* genu a u druhého společně s trizomiemi dalších chromozomů.

#### **5.1.5 Celková doba přežití**

Do analýzy bylo celkem zahrnuto 42 pacientů diagnostikovaných jako AL amyloidóza. Celková doba přežití byla statisticky hodnocena u 18 pacientů s přítomností t(11;14) a 24 pacientů (s jinou změnou nebo beze změn). Doba přežití se počítá od data stanovení diagnózy po datum poslední kontroly nebo data úmrtí.

Pravděpodobnost přežití pacientů s t(11;14) nebo s jinou změnou či beze změn je zobrazen na Obrázku č. 28. Medián přežití pacientů s t(11;14) byl 36 měsíců (3 roky). Medián

pacientů s jinou změnou nebo beze změn byl 32 měsíců (2,7 roku). Rozdíl mezi těmito skupinami byl 4 měsíce. Significance (P hodnota) byla 0,68, což není statisticky významné.



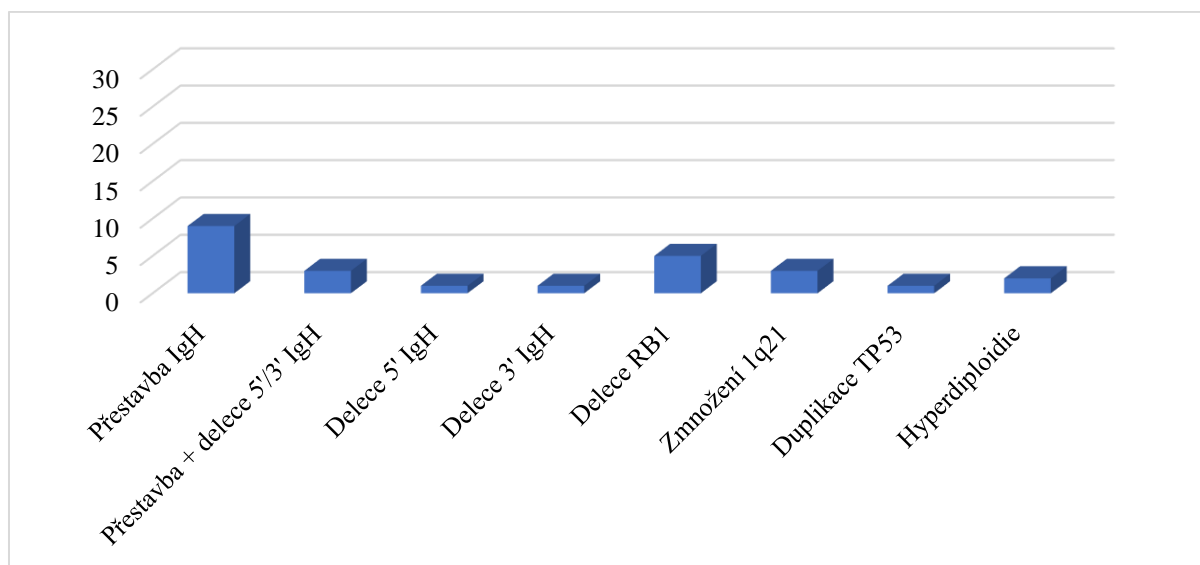
**Obrázek č. 28.:** Celkové přežívání pacientů s t(11;14) a pacientů s jinou změnou nebo beze změn.

### 5.1.6 Retrospektivní analýza

Do této skupiny bylo zahrnuto 18 pacientů (42,9 %), kteří byli vyšetřeni klasickým panelem sond pro geny *IgH*, *RBI*, *TP53* a oblasti 1q21, 21q22. Pacienti se změnou v *IgH* byli dále vyšetřeni na přítomnost t(11;14) nebo t(4;14). Sonda 21q22 byla použita pro detekci trizomie chromozomu 21, která však nebyla prokázána u žádného pacienta. Jeden pacient měl již vyšetřenou trizomii chromozomu 7. U ostatních pacientů nebyly vyšetřeny trizomie chromozomů 7, 9, 11 a 15 (Graf č. 3).

Změny *IgH* genu se vyskytly u 14 z 18 pacientů (83,3 %). Nejčastěji byla v této skupině detekována klasická přestavba *IgH* genu – 9 z 14 pacientů (66,7 %), z čehož 6 jich mělo t(11;14) (66,7 %), 1 pacient měl t(4;14) (11,1 %), u 2 pacientů se nepodařilo určit translokačního partnera (22,2 %). Přestavbu s delecí *IgH* měli 3 z 14 pacientů (21,4 %), z toho 1 pacient měl delecí 5' konce *IgH* a následně prokázanou t(11;14) (7,1 %), zbývající 2 pacienti měli přestavbu bez určení translokačního partnera a delecí *IgH*. Parciální delecí měli 2 pacienti z toho delecí

5' konce *IgH* měl 1 pacient (5,6 %), delecí 3' konce *IgH* také 1 pacient (5,6 %). Delece *RBI* genu byla detekována u 5 pacientů (27,8 %), všech 5 pacientů současně mělo změnu v *IgH* genu. Duplikace *TP53* se vyskytla u 1 pacienta (5,6 %). Delece *TP53* nebyla detekována. Trizomie chromozomu 17 byla detekována u 1 pacienta (5,6 %). Zmnožení 1q21 bylo přítomno u 3 pacientů (16,7 %), jednou v kombinaci se změnou *IgH* a u 2 pacientů současně se změnou *IgH* i *RBI*.



**Graf č. 3.:** Zastoupení jednotlivých cytenetických změn u skupiny 18 pacientů vyšetřovaných retrospektivně.

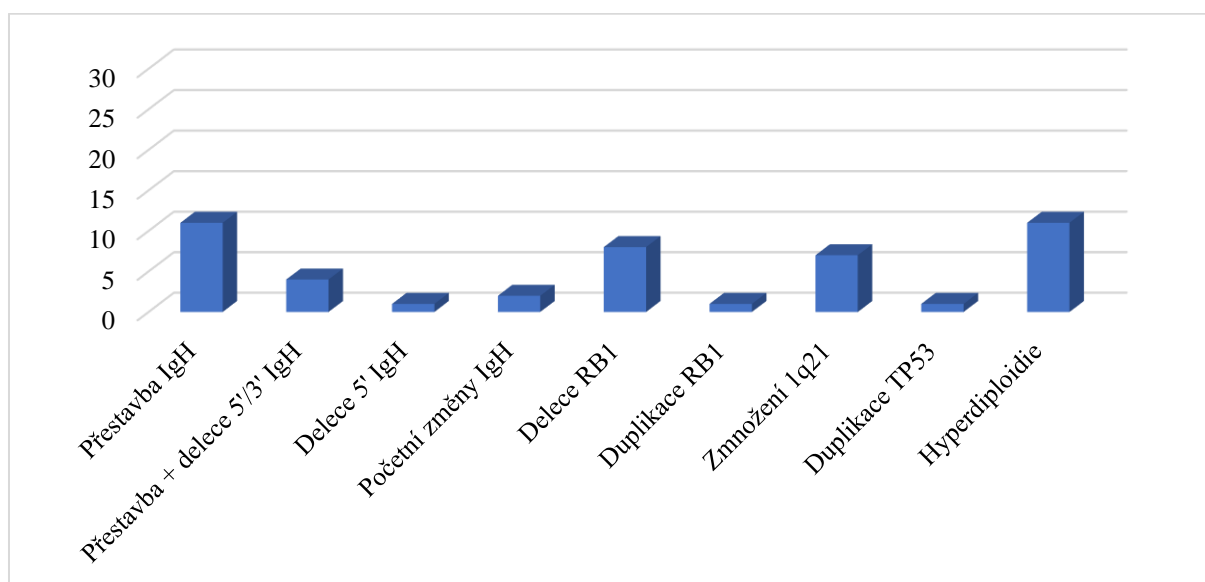
### 5.1.7 Prospektivní analýza

Skupina zahrnovala 24 pacientů (57,1 %), kteří byli kromě základního panelu (*IgH*, *RBI*, *TP53*, 1q21) vyšetřeni buď na přítomnost všech 5 typů translokací: t(11;14), t(4;14), t(6;14), t(14;16), t(14;20) nebo na přítomnost hyperdiploidie (trizomie chromozomů 7, 9, 11, 15 a 17) (Graf č. 4).

Změny *IgH* genu se vyskytly u 18 z 24 pacientů (75 %). Nejčastěji se v této skupině vyskytla přestavba *IgH* – 15 z 18 pacientů (83,3 %), z toho u 11 z 15 pacientů (73,3 %) byla přítomna klasická přestavba. Nejčastěji se vyskytla t(11;14) – 8 pacientů (72,7 %), t(4;14) se vyskytla u 1 pacienta (9,1 %), t(14;16) se vyskytla u 1 pacienta (9,1 %), u 1 pacienta (9,1 %) se nepodařilo určit translokačního partnera. Přestavba s delecí *IgH* genu se vyskytla u 4 z 15 pacientů (26,7 %). Z toho u 2 pacientů se vyskytla variantní t(11;14) (50 %). Parciální delece

*IgH* se vyskytla u 1 z 18 pacientů (5,6 %) – delece 5' konce *IgH*. Delece 3' konce *IgH* nebyla přítomna. U 2 z 18 pacientů (11,1 %) byly přítomny početní změny v *IgH* genu – 1 pacient měl 3 kopie genu *IgH*, 1 pacient měl pouze 1 kopii genu *IgH*. Delece *RBI* genu byla přítomna u 8 pacientů (33,3 %), u 7 pacientů objevovala současně se změnou v *IgH* genu (87,5 %), pouze u jednoho pacienta byla přítomna delece *RBI* samostatně (12,5 %). Duplikace *RBI* genu byla zjištěna u 1 pacienta (4,2 %). Zmnožení 1q21 bylo přítomno u 7 pacientů (29,2 %). Pouze u 1 pacienta se tato změna vyskytovala samostatně (14,3 %). U 6 pacientů vyskytlo vždy s další změnou buď v *IgH* nebo *RBI* genu (85,7 %). U 3 pacientů bylo zmnožení 1q21 doprovázeno změnami v *IgH* a *RBI* genu současně. Duplikace *TP53* se vyskytla u 1 pacienta s trizomií chromozomu 17. Delece *TP53* genu nebyla v této skupině prokázána.

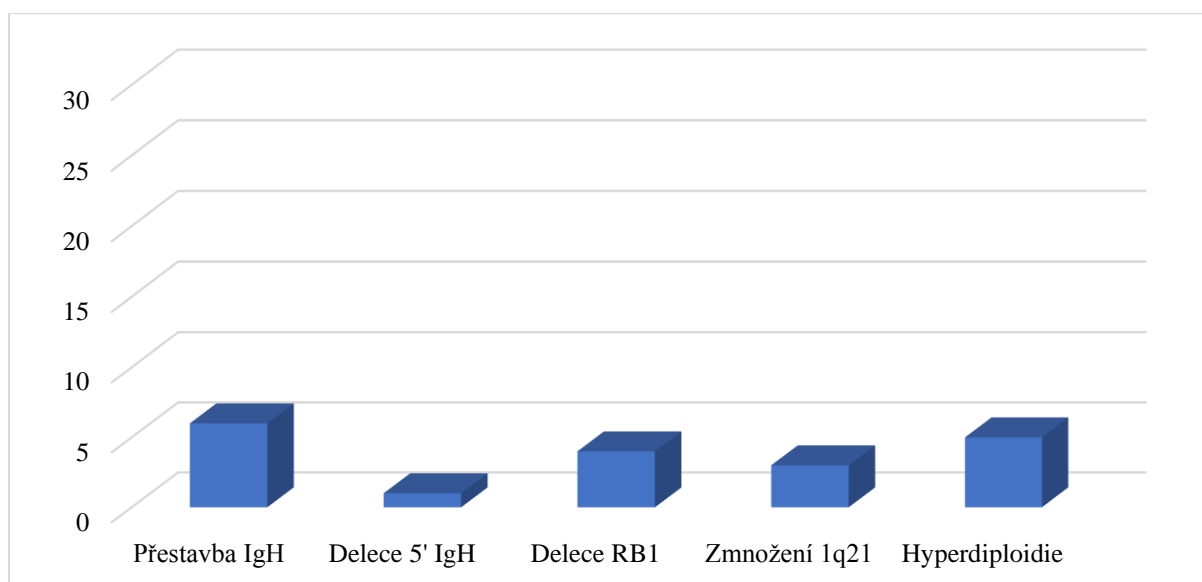
Trizomie alespoň jednoho z vyšetřovaných chromozomů byla detekována u 11 pacientů (26 %). Většinou se jednalo o trizomii více chromozomů současně, u jednoho pacienta byla přítomna současně trizomie i tetrazomie chromozomu 7. Nejčastější chromozomy s trizomií byly chromozomy 15 a 11, tyto trizomie byly detekovány každá zvlášť vždy u 5 pacientů. Trizomie chromozomu 9 se vyskytovala u 3 pacientů, trizomie 17 u 2 pacientů. Méně častá byla trizomie chromozomu 14, které se vyskytovala pouze u jednoho pacienta.



**Graf č. 4.:** Zastoupení jednotlivých cytogenetických změn u skupiny 24 pacientů vyšetřovaných prospektivně.

### 5.1.8 Pacienti s AL amyloidózou a současně s MM

Tato skupina zahrnovala 10 pacientů, kteří kromě AL amyloidózy měli také diagnostikovan MM (PB > 10 %). Nejčastější změnou byla přestavba *IgH* genu – 6 pacientů (60 %), z toho u 5 pacientů (83 %) byla prokázána t(11;14) a t(14;16) u 1 pacienta (17 %). Delece 5' konce se objevila pouze u 1 pacienta, delece 3' konce nebyla přítomna vůbec. Druhou nejčastější změnou byla delece *RB1* genu – 4 pacienti (40 %), která se vyskytla vždy současně se změnou *IgH*. Zmnožení 1q21 se vyskytovalo u 3 pacientů (30 %). U 4 pacientů byla prokázána hyperdiploidie. Změny *TP53* genu se v této skupině nevyskytly.



**Graf č. 5.:** Zastoupení jednotlivých cytogenetických změn u skupiny 10 pacientů se souběžnou MM.

## 6 DISKUZE

Amyloidóza lehkého řetězce (AL amyloidóza) je nejběžnější formou systémové amyloidózy. Literatura uvádí odhadovaný výskyt mezi 3–12 případy na milion obyvatel za rok. Prevalence se odhaduje na 30 000–45 000 pacientů s AL amyloidózou ve Spojených státech a Evropské unii. Tato nemoc je spojena s poruchami plazmatických buněk (dyskráziemi). Diagnóza AL amyloidózy je kvůli nízké incidenci, široké škále projevů a často neurčitým příznakům často obtížně rozpoznatelná. Strategie léčby se vyvíjela v posledním desetiletí a je zaměřena především na prodloužení celkové doby přežití a zachování funkce poškozených orgánů vlivem ukládání lehkých řetězců (Sanchorawala, 2016; Quock *et al.*, 2018).

Tato diplomová práce se zaměřuje na molekulárně cytogenetickou analýzu souboru 42 pacientů s AL amyloidózou.

V souboru převažoval typ lehkého řetězce lambda (76 %) proti typu kappa (24 %). Stejně zastoupení uvádí studie Sanchorawala, 2016 a Gertz *et al.*, 2002, kde se vyskytoval typ lambda oproti typu kappa v poměru 3 : 1. Nejčastěji poškozenými orgány byly ledviny (29 pacientů) a srdce (28 pacientů), v menší míře také nervový systém (8 pacientů). Poškození těchto orgánů při AL amyloidóze také uvádí studie Sidiqi *et al.*, 2018.

Vzhledem k vysoké heterogenitě AL amyloidózy se při určování prognózy nemoci využívají genetické markery – cytogenetické, molekulární a imunofenotypové.

Cytogenetika AL amyloidózy je méně studována než u MM z důvodu nižšího zastoupení PB a tím obtížnějšího vyšetřování, což téměř znemožňuje detekci změn klasickými cytogenetickými metodami i metodou FISH. Z tohoto důvodu byla v této práci použita metoda FICTION (cIg-FISH). Tato metoda umožňuje detekci genetických změn pouze v patologické populaci na základě imunofluorescenčního značení lehkých řetězců monoklonálního imunoglobulinu v cytoplazmě PB (Giefing *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2016).

U všech pacientů byla vyšetřena KD pomocí metody FICTION základním panelem sond pro geny *IgH*, *RBI*, *TP53* a oblast 1q21. Alespoň jedna cytogenetická změna byla detekována u 38 ze 42 (90 %) pacientů. U 4 pacientů (9,5 %) nebyla detekována žádná z vyšetřovaných změn. Záchyt abnormálních změn je o něco vyšší, než uvádí studie Warsame *et al.*, 2015, kde mělo 81 % pacientů abnormální změny. Tři pacienti bez detekovaných změn v retrospektivním souboru mohli mít hyperdiploidii, jelikož nebyli vyšetřováni na trizomie.



Změny *IgH* genu se vyskytly u 31 pacientů (74 %) z čehož se přestavba *IgH* genu vyskytla u 52 % (22 pacientů). Nejčastější translokací byla t(11;14)(q13;q32), kterou mělo 17 ze 42 pacientů (40,5 %), což přibližně odpovídá studii Kobayashi *et al.*, 2018, kde byl podíl pacientů s t(11;14) 40 %. Studie Warsame *et al.*, 2015 měla podíl pacientů s t(11;14) ještě o něco vyšší – 43 %. Prevalence t(11;14) byla významně vyšší u pacientů pouze s AL amyloidózou (28,6 %, 12 ze 42 pacientů) než u pacientů s AL amyloidózou s MM (11,9 %, 5 ze 42 pacientů), což také odpovídá výsledkům studie Kobayashi *et al.*, 2018. Přítomnost t(11;14) u pacientů s AL amyloidózou může mít negativní vliv na prognózu pacientů, na rozdíl od pacientů se souběžným MM, kde je tato změna spíše neutrálním prognostickým faktorem. Předchozí studie ukázaly, že t(11;14) je běžnou cytogenetickou změnou u AL amyloidózy a je detekována přibližně u 40–60 % pacientů. Pacienti s t(11;14) mají častěji poškozené srdce, což má významný vliv na celkovou prognózu nemoci, na rozdíl od pacientů s MM, kde tato změna nemá takový vliv. Literatura se příliš nezaměřuje na méně časté translokace t(4;14) t(14;20) a t(14;16) pro své poměrně nízké zastoupení u AL amyloidózy. V této práci byla t(4;14) nalezena u 2 pacientů, t(14;16) a t(14;20) byly prokázány každá u jednoho pacienta.

U 7 pacientů se vyskytla parciální delece *IgH*, z toho delecí 5' konce *IgH* a následně prokázanou variantní t(11;14) měli 2 pacienti. Parciální delece 5' konce *IgH* bez variantní t(11;14) byla přítomna u 4 pacientů. Tato delece může být fyziologická a je dána přeskupováním subgenů variabilní oblasti *IgH* genu. Parciální delece 3' konce *IgH* u 1 pacienta, u kterého nebyla prokázána t(11;14) ani t(4;14) může být intersticiální (delece střední části chromozomu) nebo může být důsledkem jiné translokace zahrnující *IgH* gen, kdy při vzniku translokace došlo ke ztrátě části nebo celého chromozomu vstupujícího do translokace (Zelenetz *et al.*, 1993).

Pacienti, kteří měli trizomii alespoň jednoho chromozomu (11 pacientů s hyperdiploidií, 26,2 %) by neměli mít současně translokaci *IgH*, jelikož se tyto dvě změny vzájemně vylučují. Existují však výjimky, kdy mají pacienti obě tyto změny současně. Hyperdiploidie je u AL amyloidózy na rozdíl od MM méně častá – přibližně 11 % (Bochtler *et al.*, 2015), vyšší zastoupení hyperdiploidií v tomto souboru může být dáno přítomností 10 pacientů se souběžnou diagnózou MM.

Delece *RBI* genu byla zjištěna u 31 % pacientů, stejná frekvence výskytu je popisována i v jiných studiích, kde se také delece *RBI* genu nevyskytovala jako samostatná změna ale

v kombinaci s abnormalitami *IgH* genu a oblasti 1q21 tak jak bylo detekováno i v této práci (Bochtler *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2016).

Zmnožení oblasti 1q21 bylo prokázáno u 28,5 % pacientů, což odpovídá nálezům v literatuře. Bochtler *et al.*, 2013 uvádí zmnožení 1q21 u 23 % pacientů. Zmnožení oblasti 1q21 u pacientů s MM vede k nepříznivé prognóze, jelikož je známkou progresu nemoci, podobně je tomu také u pacientů s AL amyloidózou. U pacientů v této práci nebyla delece genu *TP53* prokázána. Deregulace genu *TP53* u pacientů s MM je vysoce rizikovým faktorem, stejně jako u pacientů s AL amyloidózou, kde bývá detekována zcela v minimální míře (Bochtler *et al.*, 2013)

Ve vyšetřovaném souboru pacientů nebyl prokázán vliv přítomnosti t(11;14) u pacientů s AL amyloidózou na jejich celkovou dobu přežívání (medián přežití 3 roky) oproti pacientům s jinou změnou nebo beze změn (medián přežití 2,7 roku) V literatuře se naopak uvádí nepříznivý vliv t(11;14) na přežití pacientů (Bochtler *et al.*, 2015; Muchtar *et al.*, 2017). Tato diskrepance může být dána dlouhým přežíváním 3 pacientů s translokací t(11;14) (více než 100 měsíců). Dále se v této analýze nehodnotil způsob léčby jednotlivých pacientů, což významně ovlivňuje přežívání pacientů. Dalším faktorem, který ovlivňuje statistickou analýzu je malá velikost souboru vyšetřovaných pacientů.

## 7 ZÁVĚR

Cílem teoretické části diplomové práce bylo sestavit literární přehled o monoklonálních gamapatiích se zaměřením na AL amyloidózu. Byly shrnuty obecné informace o vzniku této nemoci, popsány klinické projevy a kritéria pro určení diagnózy. Také byly rozebrány nejčastější cytogenetické změny a možnosti jejich detekce, krátce byly popsány možné způsoby léčby.

Cílem praktické části byla molekulárně cytogenetická analýza metodou FICTION v souboru 42 pacientů diagnostikovaných jako AL amyloidóza, případně se souběžnou MM. Byly detekovány a podrobně popsány nejběžnější cytogenetické změny u AL amyloidózy. Cytogenetické změny byly nalezeny u 90 % pacientů. Nejčastěji zjištěnou abnormalitou byla změna v *IgH* genu (31 pacientů), t(11;14) mělo 17 pacientů, další častou změnou byla delece *RBI* genu (13 pacientů) a zmnožení oblasti 1q21 (12 pacientů). Pacienti byli rozděleni do retrospektivní (18 pacientů) a prospektivní skupiny (24 pacientů). Dále byli analyzováni pacienti podle diagnózy: jen AL amyloidóza (32 pacientů) a pacienti s AL amyloidózou i MM (10 pacientů). U každé skupiny byly podrobně rozebrány jednotlivé cytogenetické změny.

Tato diplomová práce prokázala význam metody FICTION v detekci cytogenetických změn u pacientů s AL amyloidózou. Metoda umožňuje vysoký záchyt změn – zejména v nejčastěji postiženém *IgH* genu.

## 8 LITERATURA

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2012): Cellular and molecular immunology: 7th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.

Abd El-Naby A., Gawaly A., Elshweikh S. (2016): *CKS1B/CDKN2C (P18) amplification/deletion as prognostic markers in multiple myeloma patients*. The Egyptian Journal of Haematology 41(2): 87–93.

Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. (2008): Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí. 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Grada, Praha.

Aglietta M., Pasquino P., Sanavio F., Stacchini A., Severino A., Fubini L., Morelli S., Volta C., Monteverde A., Piacibello W., Gavosto F. (1993): Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor and interleukin 3: Target cells and kinetics of response in vivo. Stem cells 11(S2): 83–87.

Akira S. (2011): Innate immunity and adjuvans. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 366(1579): 2748–2755.

Ansell S. M., Kyle R. A., Reeder C. B., Fonseca R., Mikhael J. R., Morice W. G., Bergsagel P. L., Buadi F. K., Colgan J. P., Dingli D., Dispenzieri A., Greipp P. R., Habermann T. M., Hayman S. R., Inwards D. J., Johnston P. B., Kumar S. K., Lacy M. Q., Lust J. A., Markovic S. N., Micallef I. N. M., Nowakowski G. S., Porrata L. F., Roy V., Russell S. J., Short K. E. D., Stewart A. K., Thompson C. A., Witzig T. E., Zeldenrust S. R., Dalton R. J., Rajkumar S. V., Gertz M. A. (2010): Diagnosis and Management of Waldenström Macroglobulinemia: Mayo Stratification of Macroglobulinemia and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Guidelines. Mayo Clinic Proceedings 85(9): 824–833.

Backhaus O. (2018): Generation of Antibody Diversity. Antibody Engineering. InTech, London.

Balcárková J., Mlynářčiková M., Mičková P., Ščudla V., Pika T., Bačovský J., Minařík J., Jarošová M., (2016): Analýza variantních nálezů počtu signálů při určení translokace t(4;14)(p16.3;q32.3) metodou FICTION u nemocných s mnohočetným myelomem. Transfuze a hematologie dnes 22(3): 182–188.

Barh D., Azevedo V. (2019): Single-Cell Omics. Elsevier, Amsterdam.

Bejjani B. A., Shaffer L. G. (2006): Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics* 8(5): 528–533.

Benson M. D. (2003): The hereditary amyloidoses. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 17(6): 909–927.

Bergsagel P. L., Chesi M., Nardin E., Lim R. S., Shonukan O., Kuehl W. M. (1998): IgH translocations in multiple myeloma. *Cancer Research Therapy and Control* 6(1-4): 47–52.

Bochtler T., Hegenbart U., Cremer F. W., Heiss Ch., Benner A., Hose D., Moos M., Bila J., Bartram C. R., Ho A. D., Goldschmidt H., Jauch A., Schonland S. O. (2008): Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood* 111(9): 4700–4075.

Bochtler T., Hegenbart U., Heiss Ch., Benner A., Moos M., Seckinger A., Pschowski-Zuck S., Kirn D., Neben K., Bartram C. R., Ho A. D., Goldschmidt H., Hose D., Jauch A., Schonland S. O. (2011): Hyperdiploidy is less frequent in AL amyloidosis compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance and inversely associated with translocation t(11;14). *Blood* 117(14): 3809–3815.

Bochtler T., Hegenbart U., Kunz Ch., Benner A., Seckinger A., Dietrich S., Granzow M., Neben K., Goldschmidt H., Ho A. D., Hose D., Jauch A., Schönland S. O. (2013): Gain of chromosome 1q21 is an independent adverse prognostic factor in light chain amyloidosis patients treated with melphalan/dexamethasone. *Amyloid* 21(1): 9–17.

Bochtler T., Hegenbart U., Kunz Ch., Granzow M., Benner A., Seckinger A., Kimmich Ch., Goldschmidt H., Ho A. D., Hose D., Jauch A., Schönland S. O. (2015): Translocation t(11;14) Is Associated With Adverse Outcome in Patients With Newly Diagnosed AL Amyloidosis When Treated With Bortezomib-Based Regimens. *Journal of Clinical Oncology* 33(12): 1371–1378.

Bradwell A. R., Carr-Smith H. D., Mead G. P., Harvey T. C., Drayson M. T. (2003): Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *The Lancet* 361(9356): 489–491.

Brito-Babapulle V., Baou M., Matutes E., Morilla R., Atkinson S., Catovsky D. (2001): Deletions of D13S25, D13S319 and RB-1 mapping to 13q14.3 in T-cell prolymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 114(2): 327–332.

Bryce A. H., Ketterling R. P., Gertz M. A., Lacy M., Knudson R. A., Zeldenrust S., Kumar S., Hayman S., Buadi F., Kyle R. A., Greipp P. R., Lust J. A., Russell S., Rajkumar S. V., Fonseca R., Dispenzieri A. (2009): Translocation t(11;14) and survival of patients with light chain (AL) amyloidosis. *Haematologica* 94(3): 380–386.

Cook J., Muchtar E., Warsame R. (2020): Updates in the Diagnosis and Management of AL Amyloidosis. *Current Hematologic Malignancy Reports* 15(3): 155–167.

Cuenca I., Alameda D., Sanchez-Vega B., Gomez-Sanchez D., Alignani D., Lasa M., Onecha E., Lecumberri R., Prosper F., Ocio E. M., González M. E., García de Coca A., De La Rubia J., Gironella M., Palomera L., Oriol A., Casanova M., Cabañas V., Taboada F., Pérez-Montaña A., De Arriba F., Puig N., Carreño-Tarragona G., Barrio S., Enrique de la Puerta J., Ramirez-Payer A., Krsnik I., Bargay J. J., Lahuerta J. J., Mateos M.-V., San-Miguel J. F., Paiva B., Martinez-Lopez J. (2021): Immunogenetic characterization of clonal plasma cells in systemic light-chain amyloidosis. *Leukemia* 35(1): 245–249.

Davids M. S., Murali M. R., Kuter D. J. (2010): Serum free light chain analysis. *American Journal of Hematology* 85(10): 787–790.

Dores G. M., Landgren O., McGlynn K. A., Curtis R. E., Linet M. S., Devesa S. S. (2009): Plasmacytoma of bone, extramedullary plasmacytoma, and multiple myeloma: incidence and survival in the United States, 1992-2004. *British Journal of Haematology* 144(1): 86–94.

Drach J., Ackermann J., Fritz E., Krömer E., Schuster R., Gisslinger H., DeSantis M., Zojer N., Fiegl M., Roka S., Schuster J., Heinz R., Ludwig H., Huber H. (1998): Presence of a p53 Gene Deletion in Patients With Multiple Myeloma Predicts for Short Survival After Conventional-Dose Chemotherapy. *Blood* 92(3): 802–809.

Dyson N. J. (2016): B1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes & Development* 30(13): 1492–1502.

Fairfield H., Falank C., Avery L., Reagan M. R. (2016): Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1364(1): 32–51.

Gertz M. A., Lacy M. Q., Dispenzieri A. (2002): Immunoglobulin light chain amyloidosis and the kidney. *Kidney International* 61(1): 1–9.

Giefing M., Siebert R. (2019): FISH and FICTION in Lymphoma Research. Lymphoma. Springer, New York.

Granzow M., Hegenbart U., Hinderhofer K., Hose D., Seckinger A., Bochtler T., Hemminki K., Goldschmidt H., Schönland S. O., Jauch A. (2017): Novel recurrent chromosomal aberrations detected in clonal plasma cells of light chain amyloidosis patients show potential adverse prognostic effect: first results from a genome-wide copy number array analysis. *Haematologica* 102(7): 1281–1290.

Hamdaoui H., Natiq A., Benlarroubia O., Liehr T., Dehbi H., Loukmas L., Chegiani F. (2020): Near tetraploid karyotype with translocation t(11;14) in a Moroccan patient with amyloid light-chain amyloidosis and multiple myeloma. *Leukemia Research Reports* 14: 1–4.

Hammons L., Brazauskas R., Pasquini M., Hamadani M., Hari P., D'Souza A. (2018): Presence of fluorescent *in situ* hybridization abnormalities is associated with plasma cell burden in light chain amyloidosis. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 11(2): 105–111.

Hořejší V., Bartůňková J. (2005): *Základy imunologie*: 3. vydání. Triton, Praha.

Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R. (2017): *Základy imunologie*: 6., aktualizované vydání. Stanislav Juhaňák – Triton, Praha.

Janssen J. W. G., Imoto I., Inoue I., Shimada Y., Ueda M., Imamura M., Bartram C. R., Inazawa J. (2002): MYEOV, a gene at 11q13, is coamplified with CCND1, but epigenetically inactivated in a subset of esophageal squamous cell carcinomas. *Journal of Human Genetics* 47(9): 460–464.

Janz S. (2017): Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS). *Encyclopedia of Cancer*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin. 2919–2923.

Jercan A., Ene A., Jurcut R., Draghici M., Badelita S., Dragomir M., Dobrea C., Popescu M., Jordan D., Stoica E., Iacob S., Codita I., Stan C., Coriu D. (2020): Clinical characteristics in patients with hereditary amyloidosis with Glu54Gln transthyretin identified in the Romanian population. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 15(1): 1–8.

Kim S. Y., Im K., Park S. N., Kim J.-A., Yoon S.-S., Lee D.-S. (2016): Burden of cytogenetically abnormal plasma cells in light chain amyloidosis and their prognostic relevance. *Leukemia Research* 44: 45–52.

Kobayashi H., Abe Y., Miura D., Narita K., Kitadate A., Takeuchi M., Matsue K. (2019): Prevalence and clinical implications of t(11;14) in patients with amyloid light-chain amyloidosis with or without concurrent multiple myeloma. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 49(2): 195–198.

Koh Y. (2020): AL amyloidosis: advances in diagnosis and management. *Blood Research* 55(S1): 54–57.

Kubiczková L., Dúcka M., Sedlaříková L., Kryukov F., Hájek R., Ševčíková S. (2013): Cyclins D in Regulation and Dysregulation of the Cell Cycle in Multiple Myeloma. *Klinická onkologie* 26(5): 313–318.

Kumar S., Dispenzieri A., Lacy M. Q., Hayman S. R., Buadi F. K., Colby C., Lauramann K., Zeldenrust S. R., Leung N., Dingli D., Greipp P. R., Lust J. A., Russell S. J., Kyle R. A., Rajkumar S. V., Gertz M. A. (2012): Revised Prognostic Staging System for Light Chain Amyloidosis Incorporating Cardiac Biomarkers and Serum Free Light Chain Measurements. *Journal of Clinical Oncology* 30(9): 989–995.

Kyle R. A., Therneau T. M., Rajkumar S. V., Larson D. R., Plevak M. F., Melton L. J. (2004): Long-term Follow-up of 241 Patients With Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: The Original Mayo Clinic Series 25 Years Later. *Mayo Clinic Proceedings* 79(7): 859–866.

Kyle R. A., Therneau T. M., Rajkumar S. V., Offord J. R., Larson D. R., Plevak M. F., Melton L. J. (2002): A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine* 346(8): 564–569.

La Cognata V., Morello G., Gentile G., Cavalcanti F., Cittadella R., Conforti F. L., De Marco E. V., Magariello A., Muglia M., Patitucci A., Spadafora P., D'Agata V., Ruggieri M., Cavallaro S. (2018): NeuroArray: A Customized aCGH for the Analysis of Copy Number Variations in Neurological Disorders. *Current Genomics* 19(6): 431–443.

Lakshman A., Painuly U., Rajkumar S. V., Ketterling R. P., Kapoor P., Greipp P. T., Dispenzieri A., Gertz M. A., Buadi F. K., Lacy M. Q., Dingli D., Fonder A. L., Hayman S. R., Hobbs M. A., Gonsalves W. I., Hwa Y. L., Leung N., Go R. S., Lin Y., Kourelis T. V., Warsame R., Lust J. A., Russell S. J., Zeldenrust S. R., Kyle R. A., Kumar S. K. (2019): Impact of acquired del(17p) in multiple myeloma. *Blood Advances* 3(13): 1930–1938.



Lymphoma Research Foundation. [online] [navštíveno 16. 1. 2021] Dostupné z: <https://lymphoma.org>.

Madhira B. R., Konala V. M., Adapa S., Naramala S., Ravella P. M., Parikh K., Gentile T. C. (2020): Recent Advances in the Management of Smoldering Multiple Myeloma. *World Journal of Oncology* 11(2): 45–54.

Machálková K., Maisnar V. (2014): Rizikové faktory asymptomatického mnohočetného myelomu. *Klinická biochemie a metabolismus* 22: 70–73.

Malgeri U., Baldini L., Perfetti V., Fabris S., Vignarelli M. C., Colombo G., Lotti V., Compasso S., Bogni S., Lombardi L., Maiolo A. T., Neri A. (2000): Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of IgH-MMSET fusion transcripts. *Cancer Research* 60(15): 4058–4061.

Maniatis A. (2009): Pathophysiology of paraprotein production. *Renal Failure* 20(6): 821–828.

Martínez-Ramírez A., Cigudosa J. C., Maestre L., Rodríguez-Perales S., Haralambieva E., Benítez J., Roncador G. (2004): Simultaneous detection of the immunophenotypic markers and genetic aberrations on routinely processed paraffin sections of lymphoma samples by means of the FICTION technique. *Leukemia* 18(2): 348–353.

Martín-Subero J. I., Chudoba I., Harder L., Gesk S., Grote W., Novo F. J., Calasanz M. J., Siebert R. (2002): Multicolor-FICTION. *The American Journal of Pathology* 161(2): 413–420.

Merlini G., Palladini G. (2012): Differential diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematology American Society of Hematology. Education Program* 595–603.

McGowan-Jordan J. E., Hastings R. J., Moore S. (2020): *ISCN 2020*: Karger Publishers, Basilej.

Muchtar E., Dispenzieri A., Kumar S. K., Ketterling R. P., Dingli D., Lacy M. Q., Buadi F. K., Hayman S. R., Kapoor P., Leung N., Chakraborty R., Gonsalves W., Warsame R., Kourelis T. V., Russell S., Lust J. A., Lin Y., Go R. S., Zeldenrust S., Kyle R. A., Rajkumar S. V., Gertz M. A. (2017): Interphase fluorescence *in situ* hybridization in untreated AL amyloidosis has an independent prognostic impact by abnormality type and treatment category. *Leukemia* 31(7): 1562–1569.

Narita T., Inagaki A., Kobayashi T., Kuroda Y., Fukushima T., Nezu M., Fuchida S., Sakai H., Sekiguchi N., Sugiura I., Maeda Y., Takamatsu H., Tsukamoto N., Maruyama D., Kubota Y., Kojima M., Sunami K., Ono T., Ri M., Tobinai K., Iida S. (2015): T(14;16)-positive multiple myeloma shows negativity for CD56 expression and unfavorable outcome even in the era of novel drugs. *Blood Cancer Journal* 5(2): 1–4.

Navrátil L. (2017): *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory: 2., zcela přepracované a doplněné vydání.* Grada, Praha.

Ngo V. N., Young R. M., Schmitz R., Jhavar S., Xiao W., Lim K.-H., Kohlhammer H., Xu W., Yang Y., Zhao H., Shaffer A. L., Romesser P., Wright G., Powell J., Rosenwald A., Muller-Hermelink H. K., Ott G., Gascoyne R. D., Connors J. M., Rimsza L. M., Campo E., Jaffe E. S., Delabie J., Smeland E. B., Fisher R. I., Braziel R. M., Tubbs R. R., Cook J. R., Weisenburger D. D., Chan W. C., Staudt L. M. (2011): Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470(7332): 115–119.

Palladini G., Milani P., Merlini G. (2020): Management of AL amyloidosis in 2020. *Blood* 136(23): 2620–2627.

Pan J., Wan J. (2020): Methodological comparison of FACS and MACS isolation of enriched microglia and astrocytes from mouse brain. *Journal of Immunological Methods* 486: 1–7.

Penka M., Slavíčková E. (2011): *Hematologie a transfuzní lékařství.* Grada, Praha.

Platelets on the Web. [online] [navštíveno 30. 12. 2020] Dostupné z: <https://ouhsc.edu/platelets/index.html>.

Portál české leukemické skupiny. [online] [navštíveno 1. 4. 2021] Dostupné z: <https://www.leukemia-cell.org>.

Pospíšilová Š., Dvořáková D., Mayer J. (2013): *Molekulární hematologie.* Galén, Praha.

Qiang Y.-W., Ye S., Huang Y., Chen Y., van Rhee F., Epstein J., Walker B. A., Morgan G. J., Davies F. E. (2018): MAFb protein confers intrinsic resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma. *BMC Cancer* 18(1): 1–13.

Qiang Y.-W., Ye S., Chen Y., Buros A. F., Edmonson R., van Rhee F., Barlogie B., Epstein J., Morgan G. J., Davies F. E. (2016): MAF protein mediates innate resistance to proteasome inhibition therapy in multiple myeloma. *Blood* 128(25): 2919–2930.

- Quock T. P., Yan T., Chang E., Guthrie S., Broder M. S. (2018): Epidemiology of AL amyloidosis: a real-world study using US claims data. *Blood Advances* 2(10): 1046–1053.
- Raca G., Jackson C. A., Kucinkas L., Warman B., Shieh J. T. C., Schneider A., Bardakjian T. M., Schimmenti L. A. (2011): Array comparative genomic hybridization analysis in patients with anophthalmia, microphthalmia, and coloboma. *Genetics in Medicine* 13(5): 437–442.
- Rajan A. M., Rajkumar S. V. (2015): Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer Journal* 5(10): 1–7.
- Rajkumar S. V. (2005): MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on Pathogenesis, Natural History, and Management. *Hematology* 2005(1): 340–345.
- Rajkumar S. V., Kyle R. A., Therneau T. M., Melton L. J., Bradwell A. R., Clark R. J., Larson D. R., Plevak M. F., Dispenzieri A., Katzmann J. A. (2005): Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 106(3): 812–817.
- Rajkumar S. V., Landgren O., Mateos M.-V. (2015): Smoldering multiple myeloma. *Blood* 125(20): 3069–3075.
- Ratan Z. A., Zaman S. B., Mehta V., Haidere M. F., Runa N. J., Akter N. (2017): Application of Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus* 9(6): 1–13.
- Real de Asua D., Galvan J. M., Filigghedu M. T., Trujillo D., Costa R., Cadinanos J. (2014): Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Clinical Epidemiology* 2014(6): 369–377.
- Rheingold S. R., Brown V. I., Fang J., Kim J. M., Grupp S. A. (2003): Role of the BCR Complex in B Cell Development, Activation, and Leukemic Transformation. *Immunologic Research* 27(2–3): 309–330.
- Ryšavá R. (2013): Systémové amyloidózy a jejich léčba. *Farmakoterapie pro praxi*. Maxdorf, Praha.
- Saksena A., Mahajan N., Agarwal S., Jain S. (2014): Solitary bone plasmacytoma: An interesting case report with unusual clinico-cytological features. *Journal of Cytology* 31(3): 158–160.

Sanganalmath S. K., Abdel-Latif A., Bolli R., Xuan Y.-T., Dawn B. (2011): Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond. *Basic Research in Cardiology* 106(5): 709–733.

Sanchorawala V. (2016): Light-Chain (AL) Amyloidosis: Diagnosis and Treatment. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 1(6): 1331–1341.

Ščudla V., Pika T., Látalová P., Flodr P., Maisnar V., Hájek R., Česká myelomová skupina (2014): Diagnostika a stratifikace systémové AL amyloidózy ve světle „Doporučení České myelomové skupiny 2013“. *Klinická biochemie a metabolismus* 22(43): 49–60.

Seita J., Weissman I. L. (2010): Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2(6): 640–653.

Sidiqi M. H., Aljama M. A., Muchtar E., Buadi F. K., Warsame R., Lacy M. Q., Dispenzieri A., Dingli D., Leung N., Gonsalves W. I., Kumar S. K., Kapoor P., Kourelis T. V., Hogan W. J., Gertz M. A. (2018): Light chain type predicts organ involvement and survival in AL amyloidosis patients receiving stem cell transplantation. *Blood Advances* 2(7): 769–776.

Sonoki T., Harder L., Horsman D. E., Karran L., Taniguchi I., Willis T. G., Gesk S., Steinemann D., Zucca E., Schlegelberger B., Solé F., Mungall A. J., Gascoyne R. D., Siebert R., Dyer M. J. S. (2001): Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 98(9): 2837–2844.

Straub J., Adam Z., Gregora E., Hájek R., Kessler P., Maisnar V., Ščudla V., Schützová M., Špička I. (2009): Mnohočetný myelom – časná diagnostika. *Medicína pro praxi* 6(4): 197–199.

Stuhlmann-Laeisz Ch., Schönland S. O., Hegenbart U., Oschlies I., Baumgart J.-V., Krüger S., Röcken Ch. (2019): AL amyloidosis with a localized B cell neoplasia. *Virchows Archiv* 474(3): 353–363.

Swerdlow S. H., Campo E., Pileri S. A., Harris N. L., Stein H., Siebert R., Advani R., Ghielmini M., Salles G. A., Zelenetz A. D., Jaffe E. S. (2016): The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127(20): 2375–2390.

Šolcová L., Maisnar V., Šimková J. (2016): Soubor nově diagnostikovaných monoklonálních gamapatií v regionální laboratoři v osmiletém časovém období. *Klinická biochemie a metabolismus* 4: 179–182.

Therneau T. M., Kyle R. A., Melton L. J., Larson D. R., Benson J. T., Colby C. L., Dispenzieri A., Kumar S., Katzmann J. A., Cerhan J. R., Rajkumar S. V. (2012): Incidence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Estimation of Duration Before First Clinical Recognition. *Mayo Clinic Proceedings* 87(11): 1071–1079.

Treon S. P., Xu L., Yang G., Zhou Y., Liu X., Cao Y., Sheehy P., Manning R. J., Patterson Ch. J., Tripsas Ch., Arcaini L., Pinkus G. S., Rodig S. J., Sohani A. R., Harris N. L., Laramie J. M., Skifter D. A., Lincoln S. E., Hunter Z. R. (2012): MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine* 367(9): 826–833.

Wadhera R. K., Rajkumar S. V. (2010): Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: A Systematic Review. *Mayo Clinic Proceedings*

Warsame R., Kumar S. K., Gertz M. A., Lacy M. Q., Buadi F. K., Hayman S. R., Leung N., Dingli D., Lust J. A., Ketterling R. P., Lin Y., Russell S., Hwa L., Kapoor P., Go R. S., Zeldenrust S. R., Kyle R. A., Rajkumar S. V., Dispenzieri A. (2015): Abnormal FISH in patients with immunoglobulin light chain amyloidosis is a risk factor for cardiac involvement and for death. *Blood Cancer Journal* 5(5): 1–7.

Zahrádková (2016): Systémová amyloidóza. *Onkológia* 6: 361–364.

Zelenetz A. D., Cleary M. L., Levy R. (1993): A submicroscopic interstitial deletion of chromosome 14 frequently occurs adjacent to the t(14;18) translocation breakpoint in human follicular lymphoma. *Genes, Chromosomes and Cancer* 6(3): 140–150.