

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Využití metod klasické cytogenetiky a molekulární
cytogenetiky pro přesné určení chromozómových
a genových změn a jejich klinického významu
u myelodysplastického syndromu**

Diplomová práce

Bc. Petra Lužná

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 30. 4. 2014

Bc. Petra Lužná

Poděkování:

Na prvním místě děkuji paní prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc. za vedení celé diplomové práce a za možnost pracovat na prvotřídním pracovišti, jakým Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice Olomouc je. Dále děkuji RNDr. Mileně Holzerové, PhD. za pečlivost při zodpovídání ustavičných dotazů, Mgr. Michaele Mikešové, Mgr. Lence Krůzové, Mgr. Pavle Mičkové a kolektivu laborantek HOK FN Olomouc (Jitce Kropáčkové, Ivě Prekopové a Janě Hanzlíkové) za seznámení s prací v laboratořích Hemato-onkologické kliniky a za hodnotné rady a připomínky. V neposlední řadě děkuji své rodině za výtečné zázemí, které mi po celou dobu studia poskytla.

OBSAH

SOUHRN	5
SUMMARY	6
1 ÚVOD	7
2 KRVETVORBA	8
2.1 KOSTNÍ DŘEŇ (KD)	9
2.2 KMENOVÉ BUŇKY (KB)	10
2.3 A) MYELOPOÉZA	12
2.4 B) LYMFOPOÉZA = BÍLÁ KREVNÍ ŘADA	13
3 CYTOGENETIKA	16
4 NÁDOROVÁ CYTOGENETIKA	20
5 MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKA	21
5.1 FLUORESCENČNÍ <i>IN SITU</i> HYBRIDIZACE (FISH)	21
5.2 MNOHOBAREVNÁ FLUORESCENČNÍ <i>IN SITU</i> HYBRIDIZACE (mFISH)	22
5.3 MNOHOBAREVNÉ PRUHOVÁNÍ (mBAND)	24
6 MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM (MDS)	25
6.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA	25
6.2 SOUČASNÁ CYTOGENETICKÁ KLASIFIKACE MDS	27
6.2.1 FAB klasifikace (French-American-British)	28
6.2.2 WHO (World Health Organization) klasifikace	29
6.2.3 IPSS (International Prognostic Scoring System)	32
6.3 CHROMOZÓMOVÉ A GENOVÉ ZMĚNY U MDS	34
6.3.1 Chromozómové změny	34
6.3.2 Genové změny	37
6.4 KLINICKÝ VÝZNAM GENETICKÝCH ZMĚN (viz kapitola Genetické a chromozómové změny, Genetické změny)	43
6.5 5q- SYNDROM	44
6.6 MDS S KOMPLEXNÍM KARYOTYPEM	48
7 CÍL PRÁCE	51
8 POUŽITÝ MATERIÁL A METODY	52
8.1 ZPRACOVÁNÍ BUNĚK KD PRO CYTOGENETICKÉ A MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ	52

8.2 CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ	54
8.3 MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ FISH S LOKUSOVĚ SPECIFICKÝMI (LSI), CENTROMERICKÝMI (CEP) A CELOCHROMOZÓMOVÝMI (WCP) SONDAMI	55
8.4 MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ mFISH	64
9 VÝSLEDKY	68
9.1 SOUBOR PACIENTŮ S 5q- SYNDROMEM	69
9.2 SOUBOR PACIENTŮ S KOMPLEXNÍM KARYOTYPEM.....	76
10 DISKUZE	100
11 ZÁVĚR	105
12 LITERATURA	106
13 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	120

SOUHRN

Diplomová práce se zabývá chromozómovými a genovými změnami, které se vyskytují u myelodysplastického syndromu (MDS) a klinickým významem těchto změn. Detailněji popisuje zmíněné aspekty u pacientů s 5q- syndromem a komplexním karyotypem.

Teoretická část diplomové práce sumarizuje základní informace o MDS z dostupné literatury. Praktická část popisuje zpracování kostní dřeně, její cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření a uvádí výsledky těchto vyšetření u pacientů s 5q- syndromem a komplexním karyotypem. Zároveň praktická část uvádí klinická data u pacientů z uvedených dvou skupin. U pacientů s komplexním karyotypem práce shrnuje, které chromozómy jsou nejčastěji aberovány.

SUMMARY

The thesis is concerned with chromosomal and gene changes that occur in myelodysplastic syndrome (MDS) and the clinical impact of these changes. Specifically, this thesis describes these aspects in patients with 5q- syndrome and complex karyotype.

The literary review summarizes basic information about MDS from the available literature. The practical part describes processing of bone marrow, its cytogenetic and molecular cytogenetic analysis and it refers the results of this analysis in patients with 5q- syndrome and complex karyotype. Moreover the practical part presents clinical data of patients from the two chosen groups and in patients with complex karyotype shows which chromosomes are the most often aberated.

1 ÚVOD

Rozvoj metod cytogenetiky a molekulární cytogenetiky představuje nesmírný pokrok ve studiu nádorových onemocnění, ale také vývojových vad nebo v prenatální diagnostice (Michalová, 1999a). Nádory jsou definovány jako genetické onemocnění, které je výsledkem kumulace genetických změn (Snustad *et* Simmons, 2009c). Incidence hematologických maligních onemocnění je podle WHO klasifikace 10 % všech maligních onemocnění (Vardiman *et al.*, 2002).

Myelodysplastický syndrom je hematologické onemocnění s klonální poruchou krvetvorby (Vondráková, 2010). Zhruba polovina pacientů disponuje chromozómovými abnormalitami. Detekce těchto změn metodou cytogenetiky a molekulární cytogenetiky hraje klíčovou roli v diagnostice, stanovení prognózy a léčbě onemocnění. Zároveň se prohlubují znalosti v patogenezi onemocnění a ve studiu kandidátních genů, které se na rozvoji onemocnění podílejí (Haase, 2008).

2 KRVETVORBA

Hematologie je podobor vnitřního lékařství, který se zabývá krví, krvetvornými orgány a krvetvorbou za fyziologických nebo patologických stavů (Pecka, 2002a). Samotná hematopoéza (tvorba krve) je tak neuvěřitelně komplikovaný proces, že veškeré jeho mechanismy nejsou dosud zcela známy (Pecka, 2002b).

Za normálních okolností probíhá produkce krevních buněk po narození v kostní dřeni (KD) (Pecka, 2002b). V tomto krvetvorném orgánu dochází od proliferace (dělení) krevních elementů až k jejich vyzrání (maturaci). Zralé buňky jsou následně vyplavovány do periferní krve (PK). V závislosti na tom, jaké krevní elementy jsou produkovány, je krvetvorba rozdělena na myelopoézu a lymfopoézu. Než dojde ke vzniku zralé krevní buňky, předchází tomuto proliferace mateřské buňky, dále diferenciaci následovaná maturací, kdy se buňka od své původní mateřské liší jak morfologicky, tak i funkčně a strukturně. Nejdříve se jedná o pluripotentní kmenovou buňku (KB), ze které se vyvíjí progenitorová kmenová buňka, dále prekurzorová kmenová buňka a nakonec již buňka diferencovaná, která se dále nedělí, pouze vyzrává (Juráňová *et* Faber, 2012).

Předporodní a poporodní krvetvorba se od sebe navzájem liší. Předporodní krvetvorba počíná již 14. až 19. dnem nitroděložního života ve žlutkovém vaku a v jeho krevních ostrůvcích. Tento cévní systém se ve 4. týdnu vývoje spojuje s cévním systémem embrya. Následuje hepatolínální období, kdy se krvetvorné buňky tvoří převážně v játrech. Doposud se jednalo o hematopoézu vytvářející pouze erytroidní elementy, odtud se tvoří také mateřské buňky bílých krvinek či krevních destiček. Po vzniku základů sleziny ve 12. týdnu vývoje slouží i tento orgán jako krvetvorný. Nicméně do poloviny zárodečného života jsou játra dominujícím místem krvetvorby. 20. týden prenatálního vývoje představuje okamžik, kdy se hematopoézy začíná účastnit i kostní dřev, a to produkcí všech krevních elementů. Díky tomu pomalu ustupuje mimodřevová tvorba krevních elementů, která ve 2.-3. týdnu po narození zaniká. (Pecka, 2002b)

Po narození dochází ke krvetvorbě převážně v kostní dřev. Některé buňky jsou ovšem tvořeny mimo KD, v lymfatických tkáních nebo v orgánech obsahujících tuto tkáň (slezina, brzlík). Malá část trombocytů je dokonce tvořena v plících. Pokud jsou krevní elementy v dospělosti produkovány slezinou nebo játry, jedná se o patologický stav, kdy KD není schopna z nějakého důvodu svoji úlohu v krvetvorbě dostatečně plnit. Příčinou může být nadměrná ztráta krve nebo nemoc krvetvorby (Pecka, 2002b).

2.1 KOSTNÍ DŘEŇ (KD)

Kostní dřeň je jedním z největších orgánů lidského těla. Je velmi organizována. Sestává z krvevorné tkáně, podpurné tkáně, cév, nervů, ale i lymfatické a tukové tkáně. V kosti vyplňuje dřeňovou dutinu. Hmotnost KD člověka je odhadována na 1600-3700 g. Červená kostní dřeň, která je stále aktivní a vyskytuje se ve všech kostech novorozeněte, je ve 4. roku věku zčásti nahrazena tukem a v 18. roku věku se aktivní krvevorná kostní dřeň vyskytuje, a hematopoéza tedy probíhá, jen v hrudní kosti, obratlích, žebrech, lopatkách, klíčních kostech, lebce, koncích pažních a stehenních kostí a lopkách kyčelních kostí. Nejdéle zastává svou funkci kostní dřeň v hrudní kosti a obratlích (Pecka, 1995a). Při zvýšených nárocích na krvevornost se však může inaktivní tuková dřeň do jisté míry přeměnit na aktivní. Krvevorná tkáň je tvořena kmenovými buňkami, mateřskými progenitorovými buňkami jednotlivých řad, dále prekurzory červené, bílé a destičkové řady a zralými krvinkami. Kostru KD tvoří podpurná tkáň. Výživa krvevorné tkáně je zajišťována cévami, které rovněž slouží jako transportní dráha krevních elementů do periferní krve (PK). Nezbytné nervy zajišťují komunikaci mezi nervovým systémem a KD, což umožňuje regulovat krvevornost dle momentální potřeby organismu. Červené krvinky dokážou po vypuzení jádra snadno přizpůsobit svůj tvar okolí, a tak ve stádiu nedozrálého erytrocytu (retikulocyty) migrují mezi endotelovými buňkami drobných cév. Bílým krvinkám je vlastní aktivní pohyb, tzv. diapedéza, kdy jádro buňky následuje vzniklý výběžek cytoplazmy mezi endotelovými buňkami. Výběžky megakaryocytů mezi endotelovými buňkami jsou uvnitř cév omílány protékající krví, a tím dochází k uvolňování trombocytů (Pecka, 2002b).

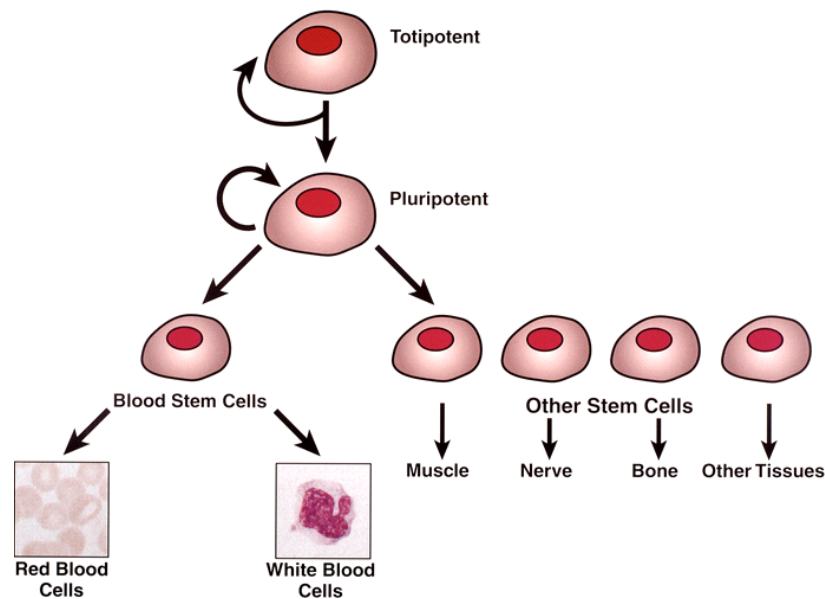
MYELOPOÉZA

Myelopoéza dává vzniknout buňkám všech krevních řad - erytroidním buňkám z červené řady, části buněk z bílé řady - buňkám myeloidním (granulocyty, monocyty) a buňkám destičkovým (megakaryocyty). Jmenovitě se jedná o erytrocyty, granulocyty, monocyty a trombocyty. Z pluripotentní kmenové buňky vzniká jejich mateřská progenitorová buňka *CFU-GEMM (Colony Forming Unit - Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte)*. V průběhu diferenciaci dochází u buněk k morfologickým změnám jak cytoplazmy (ztráta bazofilie), tak jádra (vypuzení jádra, zahuštění jádra u granulocytů, změna tvaru jádra) (Juráňová *et Faber*, 2012).

LYMFOPOÉZA

Lymfopoéza zajišťuje vznik lymfocytů, plazmocytů, NK buněk a dalších, které vznikají z mateřské lymfoidní kmenové buňky. Jsou součástí podpůrných tkání a svoji nezastupitelnou roli hrají v imunitní odpovědi organismu (Pecka, 2002b).

2.2 KMENOVÉ BUŇKY (KB)



Obr. 1 Hierarchie vývoje kmenové buňky (Arizona pain stem cell institute, 2013)

Kmenové buňky byly poprvé popsány A. Maximovem roku 1909 na jeho přednášce v Berlíně. Maximov popisoval tyto buňky jako mononukleární a tvrdil, že některé lymfocyty se chovají právě jako kmenové buňky, tedy migrují tkáněmi tak, až se usídlí ve vhodném mikroprostředí. Intenzivní výzkum KB probíhá od 50. let 20. století (Buněčná terapie, 2013b). Kmenová buňka je nediferencovaná buňka, která má schopnost diferencovat se v jakoukoli jinou buňku organismu. Kromě schopnosti diferenciacce má i schopnost sebeobnovy. Může být proto považována za „zásobní náhradní díl“ pro jakoukoli část organismu (Buněčná terapie, 2013a).

Z kmenové buňky vzniká buněčný klon. Morfologicky nejsou tyto buňky nijak výjimečné, vypadají jako lymfocyty s jemnou strukturou jaderného chromatinu. Přítomna jsou i jádérka, nukleocytoplazmatický poměr je velký a cytoplazma je bez granule

(Buliková, 2000). Z důvodu nenápadné morfologie je velmi důležitá přítomnost povrchového antigenu CD34 na těchto buňkách, díky kterému mohou být jednoznačně identifikovány. To je důležité pro stanovení jejich počtu v KD. A právě v KD připadá asi na 1000 jaderných buněk 1 buňka kmenová a malé množství lze nalézt ve slezině, játrech nebo lymfatických uzlinách. Dokonce jsou přítomny i v PK, kdy 20 000 buněk bílé krevní řady odpovídá 1 buňka kmenová (Pecka, 2002b).

Všem krvinkám je společná jedna jediná hematopoetická buňka, tzv. pluripotentní kmenová buňka, též označovaná jako totipotentní kmenová buňka (*CFU-S - Colony Forming Unit Spleen*). V průběhu hematopoézy je schopna vyvíjet se jakýmkoli směrem a dát vzniknout veškerým krevním elementům (Juráňová *et* Faber, 2012; Pecka, 1995a). Z této pluripotentní kmenové buňky se přes stádium progenitorových a prekurzorových kmenových buněk vyvíjí buňky diferencované, které již plní svoji konkrétní funkci. Jelikož v kostní dřeni i v jiných tkáních dochází k opotřebovávání přítomných buněk, využívá se právě neustálé proliferační aktivity nediferencovaných kmenových buněk, které dávají vzniknout buňkám novým. Toto zajišťuje početně malá populace hematopoetických kmenových buněk *HSC (Hematopoetic Stem Cell)* (Pecka, 2002b).

Pluripotentní kmenová buňka

Jde o mononukleární buňku o velikosti 7-10 μm s jemně rozptýleným chromatinem. V jádře se mohou vyskytovat 1-3 jádérka. Od diferencovanějších progenitorových buněk je lze rozlišit přítomností některých antigenů, které se na těch progenitorových nevyskytují. Část buněk vzniklých dělením dává vzniknout progenitorovým buňkám a část zachovává zásobu („pool“) kmenových buněk (Juráňová *et* Faber, 2012; Pecka, 2002b).

Progenitorová kmenová buňka

Progenitorové kmenové buňky se od pluripotentních významně liší tím, že ztratily schopnost sebeobnovy. Mohou se diferencovat do více krevních řad, nicméně jsou již předurčeny pro tvorbu určitého typu krevní buňky (Juráňová *et* Faber, 2012; Pecka, 1995a). Jsou citlivé na růstové faktory. Známý jsou pod zkratkou *CFU (Colony Forming Unit)* (Juráňová *et* Faber, 2012). Vzhledem k předurčení pro jeden nebo více typů krevních řad, jsou jednotlivé typy buněk označovány jako: *CFU-E (Erythrocyte)* a *BFU-E (Burst Forming Unit - Erythroid)* - ty dávají vzniknout červené krevní řadě, *CFU-GEMM*

(*Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte*) - pro buňky myelopoézy, *CFU-GM* (*Granulocyte Macrophage*) - pro granulocytární a makrofágovou řadu, pro neutrofilní řadu *CFU-N* (*Neutrophile*), eozinofilní řadu *CFU-Eos* (*Eosinophile*), bazofilní řadu *CFU-Baso* (*Basophile*), monocytární řadu *CFU-M* (*Macrophage*) a *CFU-Meg* (*Megakaryocyte*) pro megakaryocytární řadu (Juráňová *et* Faber, 2012; Pecka, 2002b).

2.3 A) MYELOPOÉZA

ČERVENÁ KREVNÍ ŘADA = ERYTROPOÉZA (Normoblastová vývojová řada)

Při erytropoéze dochází ke vzniku červených krvinek. Nejdříve se z nediferencované kmenové buňky vytvoří prekurzor pro tvorbu erytrocytů, který narozdíl od červených krvinek obsahuje jádro. Proerytoblast, bazofilní erytoblast, polychromní erytoblast a ortochromní erytoblast jsou stádia před tím, než dojde k vypuzení jádra z buňky, čímž dochází ke vzniku tzv. retikulocyty. Tento retikulocyt se během 48 hodin stává díky maturaci erytrocytem. Celý vývoj červených krvinek trvá přibližně 7 dní. Tvorba erytrocytů je ovlivňována hormonem erythropoetinem (EPO), který je produkován v ledvinách (Juráňová *et* Faber, 2012; Pecka, 2002b).

Společnými předchůdci normoblastové vývojové řady jsou kmenové buňky erytroidní povahy, tzv. *BFU-E* a *CFU-E*, které po stimulaci hormonem erythropoetinem dávají vzniknout diferencovanějším buňkám (Pecka, 2002b). Mezi ně patří již zmíněná stádia, která postupně vedou k tvorbě zralé červené krvinky. Mezi jednotlivými stádii dochází u buněk k četným morfologickým a biochemickým změnám. Velmi významnou změnou je vypuzení jádra z buňky ven, a s tím související vznik retikulocyty, který je již považován za mladý erytrocyt. Vyžíváním retikulocyty vzniká zralá červená krvinka (erytrocyt), také nazývaný normocyt (Juráňová *et* Faber, 2012).

Erytrocyty

Erytrocyty jsou bezjaderné krevní elementy bikonkávního tvaru (Juráňová *et* Faber, 2012). Průměr erytrocyty je 7,4 μm , výška 2,1 μm (Vácha *et al.*, 2010). Jedná se o nejpočetnější skupinu krevních buněk, které představují 40-45 % krve (Pecka, 1995b). V periferní krvi „žijí“ zhruba 120 dní a k jejich zániku dochází zejména díky makrofágům kostní dřeně a sleziny (Juráňová *et* Faber, 2012). Metabolismus erytrocytů je z důvodu nepřítomnosti jádra a jiných organel oproti jiným buňkám snížen. Nejdůležitějším úkolem

červené krvinky je vazba a transport kyslíku po organismu zprostředkovaný krevním barvivem hemoglobinem. Průměrný počet erytrocytů v krvi je u ženy $4,5 \times 10^{12}/l$ krve, u muže $5 \times 10^{12}/l$ krve (Pecka, 1995b; Vácha *et al.*, 2010).

BÍLÁ KREVNÍ ŘADA = LEUKOPOÉZA (Granulomonocytární vývojová řada)

Leukopoéza dává vzniknout části bílých krevních elementů, leukocytům. Jedná se o granulocyty a monocyty. Mateřskou buňkou je progenitorová buňka *CFU-GM*. Granulocyty mohou být neutrofilní, eozinofilní a bazofilní. Monocyty mohou být rozděleny na makrofágy a histiocyty. Vývoj granulocytů zahrnuje opět několik stádií: myeloblast, promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, nesegmentovaný granulocyt a nakonec segmentovaný granulocyt (neutrofil, eozinofil, bazofil) - od stádia myelocytu včetně jsou buňky již diferencovány na neutrofilní, eozinofilní nebo bazofilní. Stádia před vznikem monocytu jsou monoblast a promonocyt. Přítomnost myeloblastů, promyelocytů, myelocytů nebo metamyelocytů v periferní krvi je patologická, za normálních podmínek se tyto buňky vyskytují pouze v kostní dřeni (Juráňová *et Faber*, 2012; Pecka, 2002b).

DESTIČKOVÁ VÝVOJOVÁ ŘADA = MEGAKARYOPOÉZA (Megakaryocytová vývojová řada)

Tvorba megakarocytu z pluripotentní kmenové buňky trvá 8-10 dní. Součástí vývoje jsou buněčná stádia megakaryoblast, promegakaryocyt a nakonec megakaryocyt. Ten vyzrává a po 10 dnech od začátku samotné megakaryopoézy dochází k odštěpování cytoplazmy megakaryocytu, čímž dochází k uvolňování samotných trombocytů do oběhu. Tomuto procesu se říká trombopoéza a trvá asi 5 hodin. Veškeré dění je pod kontrolou hormonu trombopoetinu. Po 9-11 dnech jsou krevní destičky ve slezině, játrech a kostní dřeni degradovány (Juráňová *et Faber*, 2012).

2.4 B) LYMFOPÓÉZA = BÍLÁ KREVNÍ ŘADA

Lymfopóézou dochází ke vzniku druhé části elementů bílé krevní řady, a to lymfocytů. Všechny tyto buňky mají svoji mateřskou lymfoidní kmenovou buňku. V kostní dřeni se z ní stává B-lymfocyt. Pokud původně mateřská kmenová buňka v kostní dřeni nevyzrává do B-lymfocytu, putuje ve stádiu tzv. prothymocytu z kostní dřene do thymu, kde se z ní stává T-lymfocyt. Mezi lymfocyty patří i takzvané NK buňky (Pecka, 2002b).

Lymfocyty zabezpečují imunitní ochranu organismu. Buď produkcí protilátek, anebo například buněčnou imunitou. Délka jejich přežívání je různá, od 3-4 dnů, přes 4 roky, což je typické pro většinu lymfocytů, až po některé buňky, které přežívají i 10 let (Buliková, 2000). Kostní dřeň a thymus jsou primární lymfatické orgány. Do sekundárních lymfatických orgánů, kterými jsou uzliny, slezina nebo tonzily se lymfatické buňky dostávají až poté, co se dostaly do krve. Počet lymfocytů v organismu je regulován kostní dřeví, která je neustále doplňuje, v sekundárních orgánech stoupá totiž jejich množství až po antigenní stimulaci (Pecka, 2002b). Identifikace jednotlivých typů nebo stádií lymfocytů je obtížná, jelikož morfologicky se od sebe jednotlivé buňky nijak zvlášť neliší. Proto se k jejich typizaci využívá detekce antigenů typických pro jednotlivé typy (Juráňová *et Faber*, 2012).

B-lymfocyty

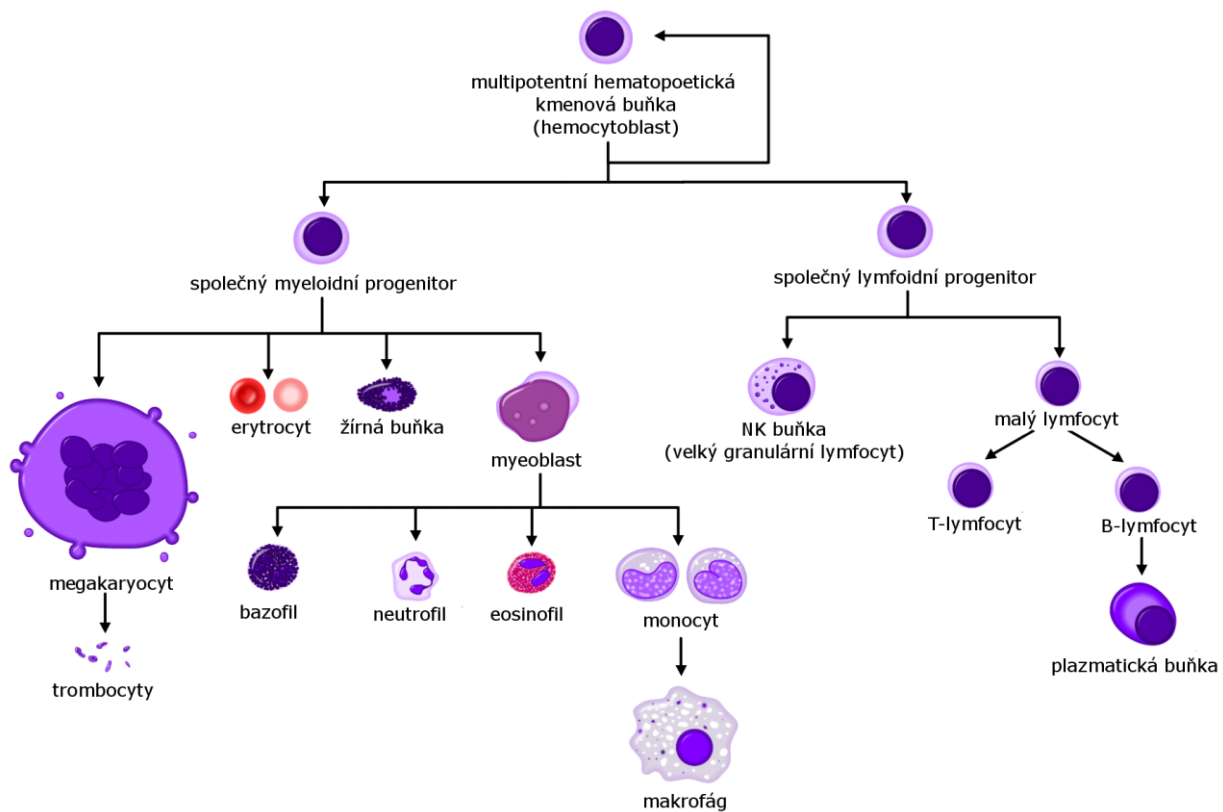
Pro tento druh lymfocytů je typická produkce protilátek. B-lymfocyty jsou charakterizovány antigeny, které nesou na svém povrchu. Podstupují v průběhu vývoje řadu procesů a jejich konečným stádiem, po stimulaci antigenem, je plazmatická buňka. Plazmocyty se vyskytují se v KD, kde vznikají, v PK, lymfatických uzlinách a slezině, taktéž v lymfoidní tkáni zažívacího ústrojí. Většina přežívá 10-20 dní (Pecka, 2002b). Stádia v jejich vývoji jsou: plazmoblast, proplazmocyt a plazmocyt (Juráňová *et Faber*, 2012).

T-lymfocyty

T-lymfocyty vznikají modifikací výše zmíněných prothymocytů v thymu. Nalezneme je hlavně v místech rozvětvení tepen, v lymfatické tkáni a pod obalem lymfatických uzlin. Zodpovídají za buňkami zprostředkovanou imunitu, a to pomocí interakcí umožněných přítomnými receptory.

NK-buňky

NK-buňky jsou lymfocyty bez možnosti identifikace B či T subtypu. Cytotoxicky působí na „podezřelé“ buňky v organismu a snaží se je zničit (např. na buňky napadené virem nebo nádorové buňky). Stejně tak působí na buňky s neplnohodnotnými povrchovými bílkovinami nebo na buňky s xenoantigeny (Caligiuri, 2008; Pecka, 2002b).



Obr. 2 Schéma hematopoézy (Wikipedie, 2012)

3 CYTOGENETIKA

Cytogenetika je úzce specializovaná vědecká disciplína, která zkoumá dědičnost na úrovni chromozómů buňky (Krahulcová, 2000; Michalová, 1999a). Studuje jejich počet a strukturu v dělicích se buňkách. Děje se tak pomocí tzv. karyotypování, kdy jsou metafázní chromozómy seřazeny v párech a ve skupinách do karyotypu.

Počátek cytogenetiky je v literatuře datován již na polovinu 19. století, kdy se evropským vědcům podařilo pozorovat chromozómy v průběhu buněčného dělení. Avšak k průlomovým objevům došlo až v průběhu 20. století. K tomu bylo potřeba několika zásadních objevů. Jednou ze stěžejních informací bylo, že geny jsou umístěny na chromozómech. Dalším pokrokem ve vývoji cytogenetiky byly objevy technik a technologií, které umožnily studovat jednotlivé geny. Jelikož k těmto událostem došlo až v průběhu 20. století, je cytogenetika všeobecně považována za vědní disciplínu 20. století (Snustad *et* Simmons, 2009a).

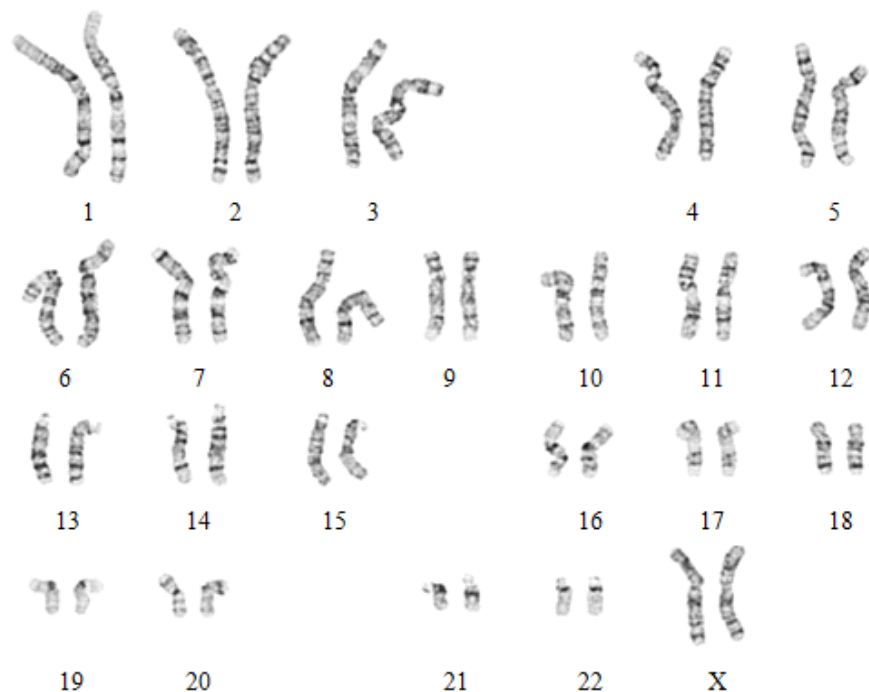
Historickým mezníkem byl pro cytogenetiku rok 1956, kdy Tjio a Levan a nezávisle na nich Ford a Hamerton určili přesný počet lidských chromozómů (Ford *et* Hamerton, 1956; Tjio *et* Levan, 1956). Následovalo období zdokonalování kultivačních a barvicích technik. Do roku 1969 existovaly jen takové barvicí techniky, které umožnily pouze určit počet chromozómů a karyotyp byl sestaven na základě postavení centromery a velikosti chromozómů. Chromozómy byly barveny Giemsovým barvivem nebo orceinem (Jarošová, 2000a). Objev pruhovacích technik představoval obrovský pokrok pro studium chromozómů (Michalová, 1999a). Caspersson *et al.* (1970) objevili jednu z pruhovacích technik, tzv. Q-pruhování (Q-banding). Q-pruhování představuje barvení chromozómů fluorochromem quinacrine mustard nebo quinacrine dihydrochloride a hodnocení ve fluorescenčním mikroskopu. Pro rutinní využití nebyla nicméně tato metoda vhodná a byla nahrazena jinými pruhovacími technikami jako G-, R- nebo C-pruhování. Nejužívanější pruhovací technikou je G-pruhování. Je ho docíleno například působením enzymů jako trypsin, kdy dochází k denaturaci bílkovin a následnému barvení v Giemsově barvivu (Michalová, 1999c). Mechanismus vzniku pruhů po aplikaci barviva není ani v dnešní době zcela znám (Snustad *et* Simmons, 2009a). Tmavé pruhy vznikají v oblasti s vysokou přítomností adeninu a thyminu. Těmto pruhům se říká G-pozitivní. Také se předpokládá, že se jedná o oblast s vysokým stupněm kondenzace a k její replikaci dochází až v pozdní syntetické fázi buněčného cyklu. G-pruhy obsahují hodně disulfidových proteinů. G-

negativní pruhy obsahují sulfhydrylové proteiny (Jarošová, 2000a). Aby byly pruhy jasně viditelné, musí dojít ke kondenzaci chromozómů. Právě proto jsou chromozómy pozorovány v metafázi. Od stupně kondenzace se odvíjí typický sled pruhů. Dohromady vznikne v metafázi na všech chromozómech 400-450 pruhů, což je počet pruhů v haploidní sadě (Michalová, 1999a).

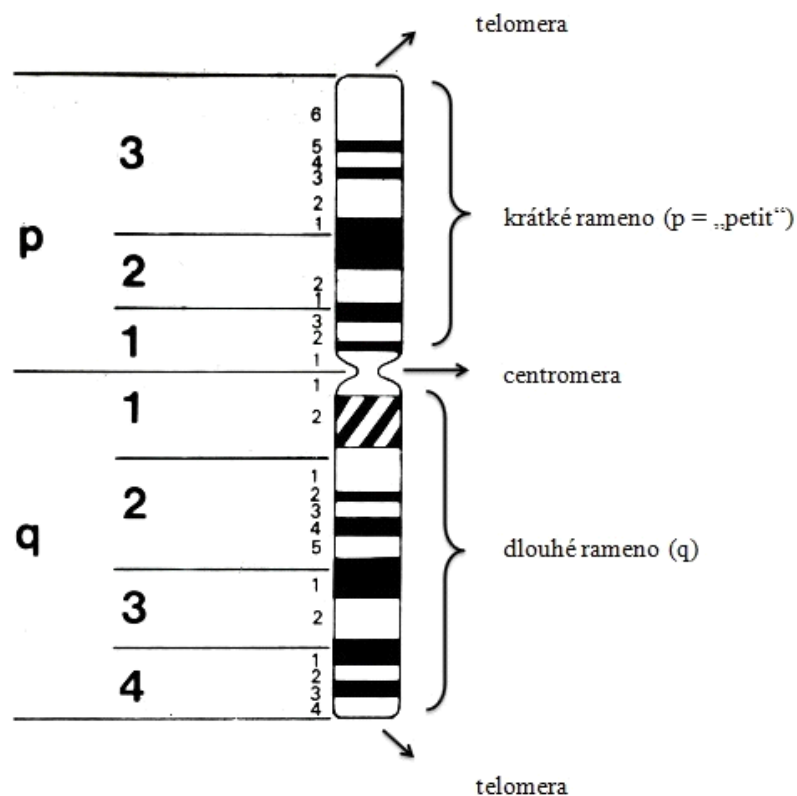
A)



B)



Obr. 3 G-pruhování - A) metafázní chromozómy, B) chromozómy seřazené do karyotypu (ISCN, 2013)

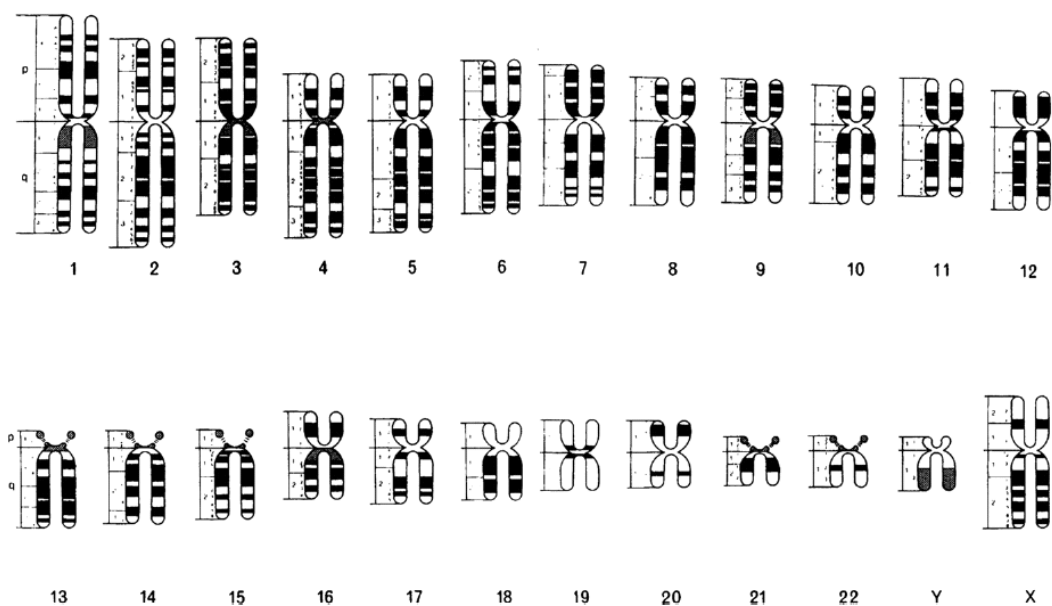


Obr. 4 Schematické znázornění chromozómu č. 1 po G-pruhování (velké číslice označují oblasti, malé číslice označují pruhy) (ISCN, 2013)

Přítomnost pruhů umožňuje identifikovat každý jednotlivý chromozómový pár a díky tomu mohla vzniknout cytogenetická nomenklatura (Michalová, 1999c). Základem byla tzv. „Denverská konference“, kdy se experti dohodli na nomenklatuře chromozómů již v roce 1960. Následovala konference v Londýně (1963), Chicagu (1966) a Paříži (1971). V roce 1978 byl vydán první mezinárodní systém lidské cytogenetické nomenklatury pod názvem: „An International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ (ISCN 1978) (Michalová, 1999a). Tento systém už označoval každý chromozóm číslem, krátké raménko chromozómu bylo označeno jako „p“, dlouhé jako „q“. Chromozómy byly popsány i z hlediska přítomnosti pruhů a podpruhů, které jsou číslovány od centromery k teloméře (ISCN, 1978). Následovalo další upřesňování nomenklatury a v současnosti je platná mezinárodní nomenklatura lidských chromozómů pod názvem ISCN (2013). Nomenklatura identifikuje chromozómy podle všech známých typických znaků (Snustad *et* Simmons, 2009a). Mezi ty základní patří poloha centromery, přítomnost sekundární konstriktce a typický sled pruhů (relativní délka se díky možnosti přesné identifikace na základě rozložení pruhů prakticky nevyužívá) (Michalová, 1999b).

Při sestavování karyotypů se vychází z toho, že existují nenáhodné chromozómové změny, které přímo souvisejí s výskytem některých onemocnění. Jedná se o početní a strukturní změny, které jsou díky sestavení karyotypu odhalitelné (Snustad *et* Simmons, 2009a). Díky tomu je možno stanovit vrozené vývojové vady jedinců, určovat chromozómové vybavení nenarozeného dítěte nebo zjistit změny v genetické informaci vyskytující se u nádorových onemocnění. Všechny tyto informace slouží ke zpřesnění diagnózy, určení prognózy, a tím k účinnější léčbě (Michalová, 1999a). Nezastupitelnou roli má cytogenetika pro kontrolu účinnosti léčby nebo pro detekci minimální reziduální choroby (Kuglík *et* Oltová, 2008).

Úkolem cytogenetika je na základě pruhovacího vzoru typického pro jednotlivé chromozómy seřadit všechny chromozómy do karyotypu, popřípadě odhalit přítomné změny. Karyotyp je jedna ze zásadních charakteristik rostlinných i živočišných druhů (Doležel, 2011).



Obr. 5 Ideogram (schematické znázornění G-pruhů) (Sandberg *et* Meloni-Ehrig, 2010)

4 NÁDOROVÁ CYTOGENETIKA

Historie nádorové cytogenetiky sahá do 60. let 20. století, kdy Peter Nowell a David Hungerford objevili první specifickou chromozómovou abnormalitu - marker chromozóm u pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Pojmenovali ho „Filadelfský chromozóm“. Předpokládali, že se jedná o chromozómovou delecii (Nowell *et* Hungerford, 1960). Až díky nově vynalezené metodě G-banding se zjistilo, že Filadelfský chromozóm vzniká díky reciproké translokaci mezi chromozómy 9 a 22, kdy dochází ke „zkrácení“ chromozómu 22 a „prodloužení“ chromozómu 9 (Rowley, 1973). Později bylo zjištěno, že translokace způsobuje vznik fúzního genu, a tedy nového proteinu, který hraje negativní roli v buněčném cyklu. Buňkám s expresí tohoto proteinu umožňuje rychlé nekontrolovatelné dělení a zabraňuje apoptóze. Po tomto přelomovém objevu byly následně pozorovány a objeveny další chromozómové změny, které souvisejí s výskytem nádorů (Mitelman, 2005). Všechny objevy mohly být učiněny díky vývoji nových metod. Chromozómové změny poukazují na deregulace genů, které vedou ke vzniku genomové nestability, a podporují tak vznik nádorů (Albertson *et al.*, 2003). V dnešní době je popsáno 55 000 karyotypů, které souvisejí s leukémiemi nebo jinými nádory. Nádorová cytogenetika umožňuje karyotyp nejen popsat, ale v některých případech také určit správně diagnózu, prognózu a pomůže stanovit typ léčebné strategie (Sandberg *et* Meloni-Ehrig, 2010).

5 MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKA

Metody molekulární cytogenetiky jsou v rámci studia chromozómů považovány za metody moderní. Podstatou je barevné značení úseků nebo celých chromozómů, kdy dochází k vizualizaci specifické sekvence DNA pomocí barevně značené sondy (Snustad *et* Simmons, 2009a). Průlomovým u této metody je fakt, že lze studovat i interfázní jádra (Michalová, 1999d). Velkým benefitem je možnost využít této metody jako doplňujícího vyšetření pro potvrzení/vyloučení chromozómové změny, pro studium materiálu se špatnou morfologií nebo malým počtem mitóz, kdy je klasická cytogenetika metodou nedostačující (Göhring *et al.*, 2011; Jarošová, 2000b). Mezi jednotlivé metody molekulární cytogenetiky patří: FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), mFISH (mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace) a mBAND (mnohobarevné pruhování) (Jarošová, 2000b). Všechny metody využívají jako značku fluorochromy, které jsou vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. A právě využití fluorescence v cytogenetických *in situ* hybridizačních technikách znamenalo převratný objev, který je využíván jak pro klinickou, tak nádorovou cytogenetiku (Speicher *et* Carter, 2005).

5.1 FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE (FISH)

Svoji historii započala hybridizace *in situ* již v roce 1969, kdy Mary Lou Pardueová a Joseph Gall vyvinuli metodu značení chromozómů pomocí jednovláknových radioaktivně značených komplementárních úseků DNA (Pardue *et* Gall, 1969). Hybridizace, jelikož dochází ke vzniku hybridních molekul. „*In situ*“ znamená „na svém původním místě“. V našem případě je pro označení komplementární jednovláknové sekvence použita fluorescenční značka. Tato metoda je velmi citlivá. Poprvé byla použita v 80. letech 20. století (Snustad *et* Simmons, 2009b; Weise, 2008).

FISH je využívána pro potvrzení přítomnosti určité nukleotidové sekvence chromozómů v buňkách nebo tkáních. Principem je schopnost jednovláknové značené DNA sondy navázat se (hybridizovat) ke komplementárnímu úseku jednovláknové cílové DNA. Podstatou je zahřát dvouvláknovou DNA na teplotu, kdy dojde k přerušení vodíkových můstků mezi jednotlivými vlákny, a tím dočasně ke vzniku jednovláknových molekul. Aby vlákna zpět podstoupila renaturaci, je potřeba dodržovat určité podmínky. Stejně tak je denaturována barevně značená sonda. Jakmile se setká cílová jednovláknová DNA s jednovláknovou komplementární sondou, dochází ke vzniku dvouvláknové

hybridní DNA. Tato molekula je označena fluorochromem, je proto snadno detekovatelná ve fluorescenčním mikroskopu (Jarošová, 2000b; Michalová, 1999d; Snustad *et* Simmons, 2009b). Cenným přínosem FISH je možnost simultánně detekovat více oblastí nebo genů za použití různě barevných fluorochromů (Kearney, 2006).

Pro FISH se využívají různé typy sond. První skupinou jsou sondy centromerické, které jsou komplementární k α a β -satelitní DNA chromozómu (Jarošová, 2000b). Tato DNA je pro většinu lidských chromozómů typická. Jedná se o repetitivní tandemovou oblast. Velikost této oblasti (okolo 4000 kb) umožňuje snadnou detekci bez potřeby amplifikace signálu (Michalová, 1999d). Další skupinu tvoří celochromozómové sondy (paintingové, malovací), které jsou komplementární k celému chromozómu. Jsou vhodné pro detekci chromozómových přestaveb (Jarošová, 2000b). Sondy, které hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA, tvoří třetí skupinu. Jedná se o genomické klony a v závislosti na jejich velikosti jsou množeny v příslušných klonovacích vektorech (Michalová, 1999d). Plazmid je použit pro klonování sondy o velikosti 500-5000 bp, bakteriofág λ pro sondy o velikosti 8-15 kb, sondy o velikosti 20-50 kb jsou pomnoženy v kosmidech. Největší úseky DNA o velikosti 50-100 kb jsou klonovány v klonovacích vektorech kvasinkových chromozómů - BAC (bacterial arteficial chromosome) (Jarošová, 2000b).

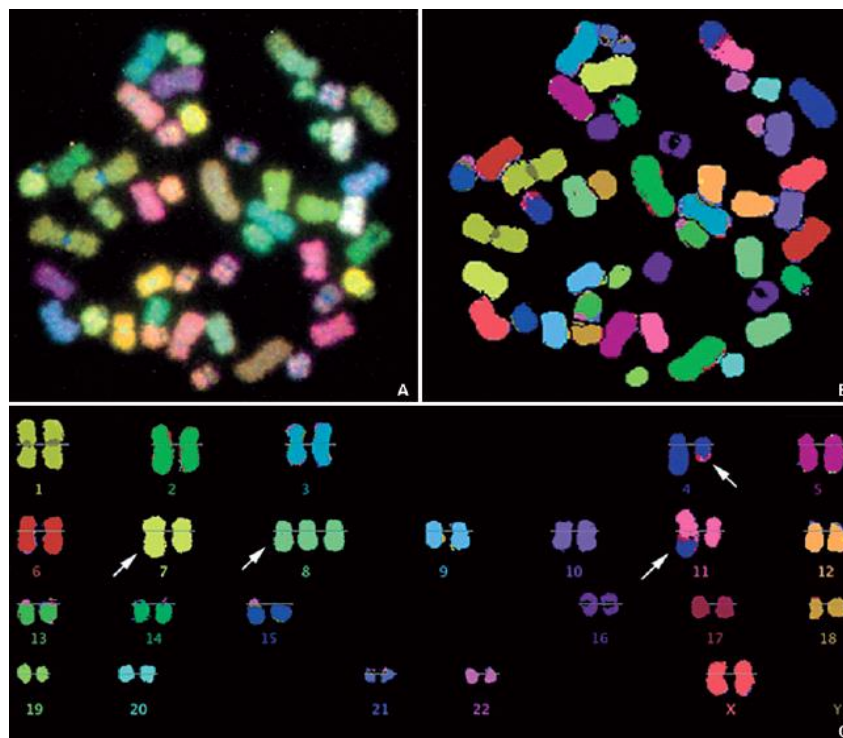
5.2 MNOHOBAREVNÁ FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE (mFISH)

První zmínka o „24 barevném karyotypování“ pochází z roku 1996. Metoda je nazvána mnohobarevnou FISH, mFISH (Speicher *et al.*, 1996). Jedná se o jeden z nejvýznamnějších objevů molekulární cytogenetiky. Stává se perfektní pro studium komplexních chromozómových změn a klonálních vývoju onemocnění, které nejsou jinými technikami dobře detekovatelné, ať z důvodu jejich malého rozsahu, nebo díky limitovaným možnostem jiných metod. Právě proto je využívána i pro studium zdánlivě normálních karyotypů až po ty s komplexními změnami (Kearney, 2006). Díky mFISH odpadl problém se současným využitím většího množství fluorochromů na jednom preparátu s rozdílnými emisními spektry (Kuglík *et* Oltová, 2008).

Principem mFISH je kombinatorní značení celochromozómových sond 5 různými fluorochromy (Jarošová, 2000b). Jelikož potřebujeme 24 různých kombinací (22 autozómů

+ 2 gonozómy), je třeba využít kombinací 5 fluorochromů. To lze spočítat podle vzorce $N = 2^n - 1$, kdy N je počet možných dosažených barevných kombinací a n je počet fluorochromů (Kearney, 2006). Každý chromozómový pár tím získává svoji specifickou kombinaci barev. Lidské oko však není schopno všechny vzniklé barvy od sebe odlišit, počítačovým programem jsou proto převedeny na tzv. pseudobarvy, pro nás již lehce rozpoznatelné. Celý lidský genom je tak možno vyšetřit pouze jedinou hybridizací (Kuglík *et Oltová*, 2008).

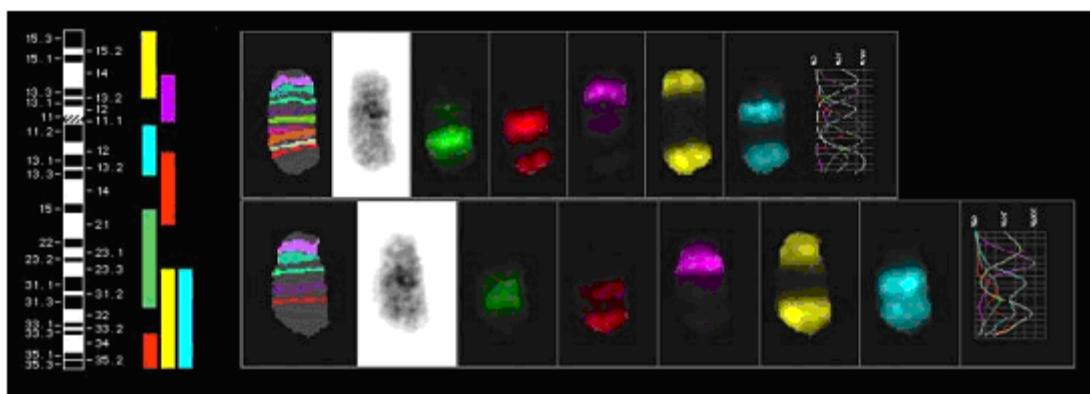
mFISH dokáže detekovat balancované i nebalancované translokace, komplexní přestavby a marker chromozómy (Tosi *et al.*, 1999; Veldman *et al.*, 1997). Metoda má ovšem svá úskalí. Jsou to neschopnost detekovat změny v rámci jednoho chromozómu, mezi které patří intrachromozómové přestavby jako duplikace, delece nebo inverze (Uhrig *et al.*, 1999).



Obr. 6 mFISH pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), A - chromozómy se specifickou kombinací barev po kombinatorním značení, B - chromozómy s přidělenými pseudobarvami, C - karyotyp, ve kterém je přítomna translokace mezi chromozómy 4 a 11: $t(4,11)(q21;q23)$, izochromozóm dlouhého ramene chromozómu 7: $i(7q)$ a trizomie chromozómu 8: $+8$ (Kearney, 2006)

5.3 MNOHOBAREVNÉ PRUHOVÁNÍ (mBAND)

Mnohobarevné pruhování využívá tzv. parciálních sond, které jsou vytvořeny pomocí mikrodisekce. Jedná se o modifikaci metody mFISH, sondy jsou opět značeny kombinací 5 fluorochromů a ke kombinacím jsou taktéž přiřazeny pseudobarvy (Kuglík *et Oltová*, 2008). Sondy jsou komplementární k určitým „subregionům“ chromozómů menším než chromozómové raménko (Liehr *et al.*, 2006). Vzniká tak obraz barevně pruhovaných chromozómů. Díky tomu je možno objevit intrachromozómové přestavby (Kuglík *et Oltová*, 2008).



Obr. 7 mBAND - chromozóm 5: obrázek znázorňuje intersticiální delecí chromozómu v oblasti 5q13q23.3 (obrázek byl získán z Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoře HOK)

6 MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM (MDS)

6.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA

Myelodysplastický syndrom je chronické klonální onemocnění krvetvorby. Typická je pro něj neefektivní krvetvorba, která se vyznačuje poruchou diferenciací, proliferací a apoptózou pluripotentní kmenové buňky. Kostní dřeň je hypercelulární a buňky vykazují dysplastické rysy. V periferní krvi je přítomna cytopenie jedné nebo více krevních řad. Jedná se o velmi heterogenní skupinu onemocnění vykazující různé klinické, morfologické a cytogenetické znaky. U 20-30 % případů progreduje do akutní myeloidní leukémie (AML) (Krejčí *et al.*, 2008; Vondráková, 2012). Z toho důvodu je také označována jako doutnající leukémie, preleukémie nebo preleukemická anémie (Mayer *et Starý*, 2002).

Studium patogeneze MDS ukázalo, že dochází k poškození genetické informace pluripotentní kmenové buňky. Taková buňka má proliferační výhodu a vzniká patologický klon (Čermák, 2010). To vede k útlumu normální krvetvorné aktivity kostní dřeně. Buňky vykazují poruchu proliferace, a tím i diferenciací a mohou vést dokonce i k autoimunitním reakcím (Krejčí *et al.*, 2008). Tehdy je vzniklý patologický klon vnímán jako antigenní podnět, na který imunitní systém reaguje aktivací cytotoxických T-lymfocytů. Následně dochází k apoptóze zralých buněk jednotlivých krevních řad, což vede ke vzniku cytopenií v PK (Čermák, 2010). Myelodysplastický syndrom je rozdělen na 2 základní typy, primární a sekundární.

Primární MDS (p-MDS) vzniká z neznámé příčiny. Vyskytuje se u věkově starší populace. Hlavním ukazatelem je cytopenie v periferní krvi, která může postihnout více krevních řad (pancytopenie). U 50-70 % případů jsou přítomny cytogenetické abnormality (Delforge, 2003; Garcia-Manero, 2010; Krahulcová, 2000; Vondráková, 2012).

Sekundární MDS (t-MDS) vzniká v důsledku působení předchozích chemoterapií nebo radioterapií, a také po expozici toxickým látkám. Cytogenetické změny se vyskytují asi u 90 % nemocných a jedná se často o změny komplexní, které mají nepříznivou prognózu (Chen *et al.*, 2001; Delforge, 2003; Garcia-Manero, 2010; Krahulcová, 2000; Vondráková, 2012).

Etiologie

Příčina vzniku MDS není ještě zcela známa. Fakt, že se vyskytuje u starších osob, vypovídá o tom, že genetické změny jsou podmíněny celoživotní expozicí rizikovým faktorům (chemické látky, emise, kouření a jiné). Jedná se o komplexní změny zahrnující regulaci proliferace, maturace a diferenciaci buněk (Orazi *et* Czader, 2009). Genetické změny zřejmě negativně ovlivňují také opravné mechanismy poškozené DNA. Tím k původním genetickým změnám přibývají změny nové. Tento fakt koreluje se zhoršením zdravotního stavu pacienta, což může vést až k transformaci do AML (Krejčí *et al.*, 2008). K mutaci dochází již u kmenové buňky, kdy v polovině případů vzniká detekovatelná klonální změna (Haase, 2008). Buňka s mutací roste přednostně a její proliferační aktivita se zvyšuje (Krahulcová, 2000).

Velkým předmětem zájmu vědců je s pomocí různých molekulárně biologických technik (PCR, aCGH, SNP array a dalších) detekovat konkrétní mutace, které podporují vznik MDS a rozlišit, které mutace jsou primární a které vznikají jako důsledek přítomných změn (Davids *et* Steensma, 2010). Existují dokonce teorie o tom, že cytogenetické změny nejsou iniciátory vzniku onemocnění, nýbrž jen získanými změnami v jeho průběhu (Delforge, 2003). Zjistit, jaká je ta správná etiologie onemocnění, je velmi důležité z hlediska možnosti správné diagnostiky, a tím efektivní léčby pacienta (Masuda, 2011).

Incidence

Myelodysplastický syndrom postihuje starší část populace (Valent *et al.*, 2009). Do 40. roku věku se vyskytuje vzácně, jedná se asi o 30-40 případů na 1 milion obyvatel ročně. U osob nad 70 let se výskyt onemocnění enormně zvyšuje, objevuje se 200-400 nových případů na 1 milion obyvatel za rok (Vondráková, 2012). Střední věk pacientů je mezi 70 a 75 lety (Garcia-Manero, 2010). Častěji se vyskytuje u mužů (Vondráková, 2012). U dětí se MDS vyskytuje zřídka, incidence se uvádí na 0,53-3,4 nových případů na 1 milion dětí (Vallespí *et al.*, 1998).

Diagnostika

Diagnostikovat MDS není jednoduché, jelikož se jedná o heterogenní onemocnění s různými klinickými, morfologickými a laboratorními projevy (Vallespí *et al.*, 1998).

Subjektivně trpí pacienti rozličnými obtížemi v závislosti na tom, jak moc a jaké buňky určité krevní řady jsou postiženy. Obvykle jsou postiženy erytroidní buňky, dochází tedy k anemickým příznakům, jako únava a nevykonnost (80 % pacientů). 25-30 % pacientů má snížen počet bílých krvinek, což doprovází časté infekce. Krvácivé projevy jsou spojeny s poklesem počtu krevních destiček (10 % pacientů). Nemoc mohou doprovázet autoimunitní fenomény, jako artritida, horečka, neuropatie a jiné (Krejčí *et al.*, 2008).

MDS má na mikroskopické úrovni mnoho projevů, proto musí být využito různých laboratorních vyšetření a kombinací těchto metod pro jeho detekci (Mayer *et Starý*, 2002). Stěžejním je vyšetření periferní krve a kostní dřeně. Diagnóza je založena na přítomnosti dysplastických rysů buněk účastnících se hematopoézy (Vallespi *et al.*, 1998). V periferní krvi jsou přítomny hypogranulované neutrofilie s hyposegmentovanými jádry (pseudo-Pelger-Huetova anomálie) a velké krevní destičky. V kostní dřeni jsou zasaženy buňky erytroidní, myeloidní nebo megakaryocytární vývojové řady a KD může být normo nebo hypercelulární. Jak již bylo řečeno, nejtypičtějším rysem jsou cytopenie v PK (Malcovati *et Nimer*, 2008). Imunofenotypizace za použití průtokové cytometrie je taktéž jedním ze základních vyšetření. Je využito detekce přítomnosti povrchových antigenů pomocí monoklonálních protilátek. V neposlední řadě hraje v diagnostice MDS nezastupitelnou roli cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření buněk PK a KD. Umožňuje zkoumat genetickou informaci jako takovou, detekovat genetické abnormality, a to i u velkého množství buněk, kdy je zachycena přítomnost i malé populace buněk s genetickou změnou. Všechny tyto a ještě další metody potvrzují nebo vyvrací klinickou diagnózu, a to je nesmírně důležité pro správnou a efektivní léčbu onemocnění (Mayer *et Starý*, 2002).

6.2 SOUČASNÁ CYTOGENETICKÁ KLASIFIKACE MDS

Klasifikovat správně MDS a jeho subtyp je klíčovým pro správnou diagnózu, prognózu a co nejefektivnější terapii onemocnění. Proto je velmi důležité vytvářet klasifikační systémy poskytující co největší množství informací, ať už morfologických, cytogenetických, klinických i jiných. K tomu je v dnešní době potřeba kombinací některých klasifikačních systémů (Malcovati *et Nimer*, 2008).

V současné době existují 2 klasifikace, podle kterých je MDS rozdělen na jednotlivé subtypy. Tyto subtypy jsou charakterizovány morfologickými nálezy v periferní krvi a kostní dřeni. Jedná se o FAB (Francouzsko-americko-britskou) klasifikaci.

Modernější a v současnosti používanou je WHO (World Health Organization) klasifikace. Ke stanovení prognózy nemocných slouží skórovací systém IPSS (International Prognostic Scoring System) opírající se o data z WHO klasifikace (Vondráková, 2012).

6.2.1 FAB klasifikace (French-American-British)

Francouzsko-americko-britská klasifikace byla vytvořena v roce 1976 a byla založena na hodnocení morfologie buněk. Tehdy klasifikovala 2 subtypy „dysmyelopoetických syndromů“ (RAEB a CMML). V roce 1982 byla inovována a definovala již nyní 5 subtypů (Steensma, 2009). Díky tomu mohla být AML rozlišena od MDS (Krahulcová, 2000). Je tou nejstarší pro klasifikaci MDS (Malcovati *et Nimer*, 2008). Myelodysplastický syndrom diagnostikuje v přítomnosti dysplastických hematopoetických buněk v KD a/nebo za přítomnosti myeloblastů od 5-30 % v KD (Mufti *et al.*, 2008). Jednotlivé subtypy jsou charakterizovány na základě množství blastů v PK, přítomnosti/nepřítomnosti prstenčitých sideroblastů, zvýšeného množství cirkulujících monocytů. Omezení této klasifikace představuje fakt, že v rámci subtypu není klasifikace homogenní. Navíc se nezabývá biologii onemocnění, tedy například tím, ve kterých krvetvorných liniích se vyskytuje dysplazie (Malcovati *et Nimer*, 2008). Proto došlo v roce 1999 ke korektuře dosavadní klasifikace a WHO dala vzniknout novým schémátům (Krahulcová, 2000). I přesto slouží FAB klasifikace pořád jako základní schéma pro rozdělení pacientů s MDS (Mayer *et Starý*, 2002). Definuje tyto následující subtypy: refrakterní anémie, refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty, refrakterní anémie s nadbytkem blastů, refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci, chronická myelomonocytární leukémie.

Refrakterní anémie (RA)

Vyskytuje se u ní cytopenie jedné krevní řady v PK. KD je normo nebo hypercelulární a vykazuje známky dysplazie. Počet blastů v PK je menší než 1 %, v KD menší než 5 %.

Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)

Je přítomna cytopenie i dysplazie, počet blastů v PK je menší než 1 %, v KD menší než 5 %. V KD je přítomno více jak 15 % prstenčitých sideroblastů.

Refrakterní anémie s nadbytkem blastů (RAEB)

Cytopenie postihuje dvě nebo více krevních řad v PK, dysplastické buňky se vyskytují u všech tří krevních řad, v PK se vyskytuje 5 % blastů nebo méně. V KD je přítomno 5-20 % blastů.

Refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci (RAEB-t)

Cytopenie postihuje dvě nebo více krevních řad v PK, dysplastické buňky se vyskytují u všech tří krevních řad. V PK je více jak 5 % blastů nebo v KD 21-30 % blastů nebo jsou přítomny blasty s auerovými tělísky.

Chronická myelomonocytární leukémie (CMML)

V PK se vyskytuje monocytóza, méně jak 5 % blastů a okolo 20 % blastů v KD (Malcovati *et Nimer*, 2008).

6.2.2 WHO (World Health Organization) klasifikace

Cílem světové zdravotnické organizace je vytvořit celosvětově uznávanou klasifikaci tumorů (Vardiman *et al.*, 2009). První vydání nazvané „WHO Cancer Classification“ pochází již z roku 1967. První revize byla provedena v roce 1981 s názvem „International Histological Classification of Tumours“. Třetí edice pochází z roku 1999, nicméně oficiálně byla publikována v roce 2001. Ani první ani druhé vydání neposkytuje klasifikaci MDS (Steensma, 2009). K tomu dochází až ve třetím vydání (Krahulcová, 2000). Důležitou změnou ve třetím vydání oproti FAB klasifikaci je změna počtu blastů, kdy dochází k transformaci do AML ze 30 % na 20 %. Také zanikly subtypy RAEB-T a CMML. CMML je považována za myelodysplastické/myeloproliferativní onemocnění (Mufti *et al.*, 2008). Poslední, čtvrté vydání s názvem „Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues“ pochází z roku 2008 (Steensma, 2009). Tato revize předchozího třetího vydání z roku 2001 byla nutná z důvodu mnoha nových vědeckých a klinických poznatků (Vardiman *et al.*, 2009). Klasifikace využívá pro typizaci všech doposud známých onemocnění výsledky morfologie, genetické analýzy, cytochemie, imunofenotypizace a klinické známky onemocnění. MDS je dle WHO považován za myeloidní neoplázii, která je obtížně diagnostikovatelná a klasifikovatelná (Orazi *et Czader*, 2009). WHO klasifikace MDS vychází z FAB klasifikace, ovšem lépe definuje

jednotlivé subtypy na základě specifických kritérií a oproti FAB klasifikaci se zabývá tím, jaké a kolik krvetvorných linií v KD je postiženo dysplazií (Malcovati *et Nimer*, 2008). WHO klasifikace dělí MDS na tyto jednotlivé subtypy: refrakterní cytopenie s unilineární dysplazií, refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty, refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií, refrakterní anémie s nadbytkem blastů-I, refrakterní anémie s nadbytkem blastů-II, myelodysplastický syndrom - neklasifikovatelný, MDS asociovaná s izolovanou abnormalitou del(5q) (Kantarjian *et al.*, 2008; Malcovati *et al.*, 2007). Nedostatkem WHO klasifikace je nepřítomnost speciálního doporučení pro definici blastů (Mufti *et al.*, 2008).

Refrakterní anémie s unilineární dysplazií (RCUD)

Dysplazie je přítomna pouze v jedné vývojové řadě. Refrakterní anémie (RA) by měla být normocytická nebo normochromická, ale převážně je makrocytická. V PK se vyskytuje méně než 1 % blastů, v KD méně než 5 %. V hypercelulární KD je přítomna dyserythropoéza. Méně než 15 % z erytroidních buněk zaujímají prstenčité sideroblasty (Orazi *et Czader*, 2009). V jedné myeloidní vývojové řadě se vyskytuje více jak 10 % buněk vykazujících dysplazii (Vardiman *et al.*, 2009). Pro další typ RCUD, Refrakterní neutropenii (RN) je příznačná neutropenie a dysgranulopoéza. U refrakterní trombocytopenie (RT) se vyskytují dysplastické rysy v megakaryocytární linii a trombocytopenii. RN s RT tvoří ze všech MDS pouze 1-2 %. 5-10 % pacientů progreduje do AML (Orazi *et Czader*, 2009).

Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)

Přítomna je anémie bez blastů v PK. V KD je nejméně 15 % erytroidních prekurzorů tvořeno prstenčitými sideroblasty, dysplazie postihuje pouze erytroidní elementy a množství blastů je menší než 5 % (Kantarjian *et al.*, 2008; Malcovati *et al.*, 2007). Dysplazie granulocytární a megakaryocytární linie postihuje méně než 10 % buněk. RARS patří mezi MDS s příznivou prognózou s přežitím 7-9 let. Pouze u 5 % pacientů dojde k přechodu do AML (Orazi *et Czader*, 2009).

Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií (RCMD)

Cytopenie postihuje jednu nebo více krevních řad. Dysplazie v KD postihuje 10 a více % buněk dvou a více buněčných linií. Přítomno je +/- 15 % prstenčitých sideroblastů

a méně než 5 % blastů v KD (Kantarjian *et al.*, 2008; Malcovati *et al.*, 2007). V PK je méně než 1 % blastů (Orazi *et Czader*, 2009).

Refrakterní anémie s nadbytkem blastů-I (RAEB-I)

V PK se vyskytuje cytopenie jedné nebo více krevních řad. Jsou přítomny 2-4 % blastů. KD postihuje dysplazie jedné nebo více vývojových řad. Počet blastů je 5-9 %. Nejsou přítomna Auerova tělíska (Kantarjian *et al.*, 2008; Malcovati *et al.*, 2007). Diagnóza je nepříznivá. Přežití se udává kratší než 2 roky. 30-40 % pacientů progreduje do AML. Převážně však umírají na komplikace (Orazi *et Czader*, 2009).

Refrakterní anémie s nadbytkem blastů-II (RAEB-II)

V PK se taktéž vyskytuje cytopenie jedné nebo více krevních řad, počet blastů je ale vyšší (5-19 %). Dysplazie v KD taktéž postihuje jednu nebo více vývojových řad, přítomno je 10-19 % blastů a Auerova tělíska (Kantarjian *et al.*, 2008; Malcovati *et al.*, 2007). Diagnóza je o něco rizikovější než u RAEB-I, a to z hlediska transformace do AML (Orazi *et Czader*, 2009).

Myelodysplastický syndrom - neklasifikovatelný (MDS-U)

Do této skupiny jsou zahrnuti pacienti, kteří na základě výsledků zcela nezapadají do jiných skupin (Orazi *et Czader*, 2009). V PK jsou přítomny cytopenie. V KD se může nebo nemusí vyskytovat dysplazie, nicméně jsou přítomny cytogenetické změny typické pro MDS. Počet blastů v KD je menší než 5 % (Kantarjian *et al.*, 2008; Malcovati *et al.*, 2007).

MDS asociovaná s izolovanou abnormalitou del(5q)

U tohoto subtypu MDS je přítomna anémie a normální nebo zvýšený počet krevních destiček. V KD se vyskytuje dysplazie erytroidních buněk a počet blastů je menší než 5 % (Kantarjian *et al.*, 2008; Malcovati *et al.*, 2007). Typický je cytogenetický nález intersticiální delecce dlouhého ramene chromozómu 5. Pacienti dobře odpovídají na léčbu lenalidomidem (Orazi *et Czader*, 2009).

Žádný klasifikační systém však není dokonalý. Existují studie, které poukazují na to, že RCUD by neměla být rozdělována na RA, RN a RT, jelikož jejich prognóza je stejná. Stejně tak, že by MDS-U měla být součástí RCMD (Maassen *et al.*, 2013).

Tab. I Charakteristika jednotlivých subtypů MDS dle WHO klasifikace (Vondráková, 2010)

WHO 2008	Periferní krev	Kostní dřev
RCUD RA RN RT	mono nebo bicytopenie* blasty žádné nebo ojediněle (< 1%) †	dysplazie jen jediné řady (> 10% buněk dané řady) < 5% blastů < 15% prstenčitých sideroblastů
RARS	anémie blasty žádné	dysplazie jen červené řady ≥ 15% prstenčitých sideroblastů < 5% blastů
RCMD	cytopenie (bi- či pancytopenie) blasty žádné nebo ojediněle (< 1%) † Auerovy tyče nepřítomny < 1x 10 ⁹ /l monocytů	dysplazie ve ≥ 10% buněk ve 2 a více řadách < 5% blastů Auerovy tyče nepřítomny ± 15% prstenčitých sideroblastů
RAEB-1	cytopenie < 5% blastů † žádné Auerovy tyče < 1x 10 ⁹ /l monocytů	dysplazie jedné a více řad 5–9% blastů † žádné Auerovy tyče
RAEB-2	cytopenie 5–19% blastů † Auerovy tyče ±† < 1x 10 ⁹ /l monocytů	dysplazie jedné a více řad 10–19% blastů † Auerovy tyče ±†
MDS-U	cytopenie blasty (< 1%) †	dysplazie < 10% buněk 1 nebo více řad s typickou cytogenetickou změnou pro MDS < 5% blastů
MDS s izolovanou del (5q)	anémie blasty žádné nebo ojediněle (< 1%) trombocyty normální nebo zvýšené	normální nebo zvýšený počet megakaryocytů s hypolobulárním jádrem, izolovaná del (5q) < 5% blastů žádné Auerovy tyče

6.2.3 IPSS (International Prognostic Scoring System)

IPSS byl navržen v roce 1997. Pacienty řadí do jednotlivých kategorií na základě množství blastů v KD a cytopenií v PK, a jako jediný systém používá jako nezávislý prognostický faktor i cytogenetický nálezn (karyotyp). Stanovuje rizikovost jednotlivých skupin v závislosti na přežití a riziku progresu do AML (Malcovati *et Nimer*, 2008). Všeobecně platí, že čím větší množství blastů se u pacienta vyskytuje, tím je větší riziko vzniku AML (Mufti *et al.*, 2008). V roce 1997 rozděloval pacienty s MDS dle rizikovosti do 4 skupin: low (nízké), intermediate-1 (střední-1), intermediate-2 (střední-2) a high (vysoké) (Malcovati *et Nimer*, 2008). Studie Schanze *et al.* (2012) se 2902 pacienty poukázala na nedostatek IPSS (86 % všech cytogenetických nálezů mohlo být zařazeno do jednotlivých prognostických skupin a zbylých 14 % cytogenetických abnormalit mělo neznámý prognostický význam). Děje se tak díky velké heterogenitě cytogenetických změn doprovázejících MDS. Tento fakt vyzýval k tvorbě nového systému, který by

předpovídal prognostický význam i méně se vyskytujících změn. V průběhu let bylo získáno mnoho nových informací o izolovaných změnách. Navíc nedávné studie prokázaly dokonce existenci prognosticky různých skupin u pacientů s komplexním karyotypem. Výzvou je stále klasifikace vzácných abnormalit. Studie Schanze *et al.* (2012) se snažila poskytnout data pro revizi IPSS, přispěla i studie Greenberga *et al.* (2012) se 7012 pacienty. Nakonec v roce 2012 došlo ke vzniku revidovaného IPSS (R-IPSS). Oproti IPSS zahrnuje do své klasifikace větší množství cytogenetických abnormalit, což umožňuje lepší zařazení pacientů do jednotlivých prognostických skupin (Tatic *et al.*, 2013). R-IPSS definuje na základě vypočítání tzv. skóre 5 prognostických subtypů: very good/very low (velmi dobrá prognóza/velmi nízké riziko), good/low (dobrá prognóza/nízké riziko), intermediate (střední prognóza/riziko), poor/high (špatná prognóza/vysoké riziko), very poor/very high (velmi špatná prognóza/ velmi vysoké riziko) (Greenberg *et al.*, 2012).

Prognóza onemocnění:

Very good (velmi dobrá)

Do této skupiny je zařazena přítomnost těchto cytogenetických změn: -Y, del(11q). Počet blastů v KD je menší než 2 %. Medián přežití se udává 8,8 roku.

Good (dobrá)

Dobrou prognózu předznamenává normální karyotyp nebo del(5q), del(12p), del(20q) nebo dvě cytogenetické změny, z nichž jedna je del(5q). Počet blastů v KD je 2-5 %. Medián přežití činí 5,3 roku.

Intermediate (střední)

Pro středně rizikovou prognózu hovoří cytogenetické abnormality del(7q), +8, +19, i(17q) nebo jiné samostatné dvě cytogenetické změny různých klonů. Počet blastů v KD je 5-10 %. Medián přežití se udává na 3 roky.

Poor (špatná)

Pro nepříznivou prognózu hovoří karyotyp -7, inv(3)/t(9q)/del(3q) nebo dvě změny, z nichž jedna je -7 nebo del(7q) a komplexní abnormality obsahující 3 cytogenetické změny. Počet blastů v KD je vyšší než 10 %. Medián přežití je 1,6 roku.

Very poor (velmi špatná)

Jedná se o více jak tři změny karyotypu, tzv. komplexní karyotyp. Medián přežívání činí 0,8 roku (Greenberg *et al.*, 2012).

Tab. II Údaje o pacientech na základě jejich zařazení do rizikové skupiny dle R-IPSS (Greenberg *et al.*, 2012)

Riziková kategorie (cytogenetická kategorie)	Blasty v KD (%)	Cytogenetika	Medián přežití (roky)	Medián transformace 25 % nemocných do AML (roky)
Very low (very good)	≤ 2	Y, del(11q)	8,8	Nedochází k transformaci
Low (good)	2-5	normální karyotyp, del(5q), del(12p), del(20q), dvě cytogenetické změny (jedna je del(5q))	5,3	10,8
Intermediate	5-10	del(7q), +8, +19, i(17q), samostatné dvě cytogenetické změny různých klonů	3,0	3,2
High (poor)	> 10	7, inv(3)/t(9q)/del(3q) dvě změny (jedna je -7, nebo del(7q)), 3 cytogenetické změny	1,6	1,4
Very high (very poor)	-	více jak 3 změny	0,8	0,73

6.3 CHROMOZÓMOVÉ A GENOVÉ ZMĚNY U MDS

6.3.1 Chromozómové změny

Z hlediska chromozómových změn představuje MDS velmi heterogenní onemocnění. Cytogenetické změny se vyskytují zhruba u 50 % pacientů. Haase (2008) popsal ve studii se 2072 pacienty s MDS 684 různých cytogenetických abnormalit. Velkou část tvořily tzv. nebalancované abnormality, kdy dochází ke kvantitativní změně množství genetické informace v genomu. Nejčastěji dochází ke ztrátě genetického materiálu díky delecii nebo monozomii (Haase, 2008). To obvykle způsobí ztrátu tumor-supresorového genu (Delforge, 2003). Méně častou změnou je zisk genetické informace prostřednictvím

trizomie (Haase, 2008). Balancované abnormality, kdy dochází „pouze“ k přemístění informace v rámci karyotypu patří k těm vzácnějším (Haase, 2008). Ty způsobují vznik chimérických onkogenních genů (Delforge, 2003).

Zjišťovat, jaký je karyotyp pacienta, je velmi důležité z hlediska diagnózy, klasifikace, a s tím souvisejícím zařazením do prognostické skupiny s odpovídající léčbou (Valent *et al.*, 2009).

Samostatné chromozómové změny jsou pozorovány spíše u p-MDS a v začátku nemoci. Komplexní změny jsou detekovány hlavně u t-MDS a v průběhu progresu onemocnění. Množství změn u MDS koreluje s genomickou nestabilitou, která je způsobená přítomností genetických defektů a/nebo nefunkčností opravných mechanismů DNA (Delforge, 2003).

U primárních MDS se nejčastěji vyskytují tyto chromozómové změny: delece chromozómu 5, trizomie chromozómu 8 a delece chromozómu 7 nebo monozomie chromozómu 7. Dále ztráta chromozómu Y, delece chromozómu 17, izochromozóm 17q a intersticiální delece chromozómů 3, 11, 12, 13 a 20. Sekundární MDS doprovází nejčastěji delece nebo monozomie chromozómu 7, delece nebo monozomie chromozómu 5 (Malcovati *et Nimer*, 2008).

Delece dlouhého ramene chromozómu 5 (5q-)

Delece dlouhého ramene chromozómu 5 patří mezi nejčastěji se vyskytující cytogenetické abnormality u MDS. Je přítomná v 30 % případů abnormálních karyotypů. Velikost deletovaného úseku je variabilní, ale téměř vždy postihuje oblast 5q31. Tato delece se vyskytuje buď jako izolovaná změna, kdy hovoříme o tzv. 5q- syndromu (viz kapitola 5q- syndrom) s dobrou prognózou, nebo jako součást komplexních změn (viz kapitola MDS s komplexním karyotypem), kdy předznamenává prognózu nepříznivou (Haase, 2008).

Abnormality chromozómu 7

Chromozóm 7 je druhý nejčastěji postižený chromozóm u pacientů s MDS. Jeho změny je možno nalézt ve 25 % případů abnormálních karyotypů. Často je tomu tak u t-MDS (Haase, 2008). Změny postihující chromozóm 7 jsou monozomie, delece dlouhého ramene nebo translokace (Cordoba *et al.*, 2012). Delece může postihovat různě velkou

oblast. Doposud nebyl zjištěn rozdílný prognostický význam různě velkých delecí. Mezi deletované oblasti patří 7q22, 7q31-32 a 7q36 (Haase, 2008). Dosavadní znalosti poukazují na to, že pacienti s delecí mají lepší prognózu než pacienti s monozomií. Přežití se udává na 19 měsíců. Zatímco pacienti se samostatnou monozomií 7 mají průměrné přežívání 14 měsíců, pokud se s monozomií 7 vyskytuje ještě jedna cytogenetická změna, činí přežití 11 měsíců, v případě, že je monozomie 7 součástí komplexního karyotypu, přežití je 8 měsíců. Pokud to zdravotní stav pacienta umožní, je jako léčba využívána alogenní transplantace krvetvorných buněk. Chemoterapie nejsou dostačující (Cordoba *et al.*, 2012; Haase, 2008).

Trizomie chromozómu 8

U primární MDS se trizomie chromozómu 8 vyskytuje izolovaně nebo jako součást komplexních změn v 10-15 % případů abnormálních karyotypů. Přežití se udává na 25-27 měsíců (Vallespí *et al.*, 1998). Sloan *et al.* (2007) publikovali práci, kde poukazují na skutečnost, že CD34+ buňky MDS pacientů s izolovanou trizomií 8 se liší od jiných MDS buněk i od normálních hematopoetických buněk, a to v expresi apoptotických markerů. Bylo potvrzeno, že buňky s trizomií 8 podstupují apoptózu, ale jen částečnou, díky čemuž jsou schopné růst a tvořit kolonie (Vallespí *et al.*, 1998).

Delece dlouhého ramene chromozómu 20 (20q-)

Byly popsány různě velké a různě lokalizované delece, jak intersticiální (vmezežené), tak terminální. Molekulárně-biologická data podporují tvrzení o intersticiální delecí. Obvykle se vyskytuje jako změna izolovaná, v tom případě je spojena s dobrou prognózou. Předpokládá se, že mezi lokusy D20S174 a D20S17, kde dochází k delecí, se vyskytují tumor-supresorové geny, jejichž ztráta díky delecí by mohla podporovat vznik MDS (Vallespí *et al.*, 1998).

Chybění chromozómu Y mužů

Ztráta chromozómu Y u mužů koreluje většinou s věkem pacientů (Wong *et al.*, 2008). Prognosticky je tato změna považována za dobrou, jelikož u MDS s touto chromozómovou změnou nebyla nikdy zaznamenána progresse do AML (Zhang *et al.*, 2007). Nicméně ještě dodnes není jasně určen klinický význam ztrát chromozómu Y (Wong *et al.*, 2008). Existují totiž i studie, které evidují, že chybění chromozómu nesouvisí pouze s věkem, ale je výrazně vyšší u hematologických onemocnění než u jiných

onemocnění, a že souvisí s přítomnými neoplastickými změnami (Zhang *et al.*, 2007). Práce Wiktora *et al.* (2000) potvrdila, že ztráta Y chromozómu je spojena s klonální nádorovou buněčnou populací u hematologických malignit až v případě výskytu ve více jak 75 % buněk.

6.3.2 Genové změny

Genové změny jsou způsobovány jak díky chromozómovým změnám, kdy dochází ke ztrátám genů, ke vzniku nadbytečných kopií nebo ke změně jejich funkce v důsledku vzniku chimérických genů či k jejich inaktivaci, tak díky mutacím, které ovlivňují jejich funkci (Davids *et Steensma*, 2010). Molekulární biologie prokázala přítomnost mutací 43 genů vyskytujících se u MDS. Tyto mutace ovlivňují sestřih RNA, modifikace DNA, regulace chromatinu nebo buněčnou signalizaci (Papaemmanuil *et al.*, 2013). Mezi nejčastěji postižené geny patří: *RUNX1(AML1)*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *RPS14* nebo *SPARC* (Davids *et Steensma*, 2010). Další mutace postihují geny *EGR1*, *EZH2*, *ETV6*, *NPM1*, *miR-145*, *miR-146*, *L(3)MBTL1* a jiné. Úkolem do budoucna bude zjistit, jaký je mechanismus působení těchto mutací, a zdali se jedná o řídicí mutace, které podněcují onkogenezi, nebo jedná-li se o tzv. „doprovodné“ mutace (Masuda, 2011).

Nejnovější průzkumy poukazují na to, že 78 % pacientů s MDS má nejméně jednu onkogenní mutaci. Bude proto velmi důležité objevovat právě tyto mutace, které pomohou pacienta správně diagnostikovat, tedy i vhodně léčit (Papaemmanuil *et al.*, 2013).

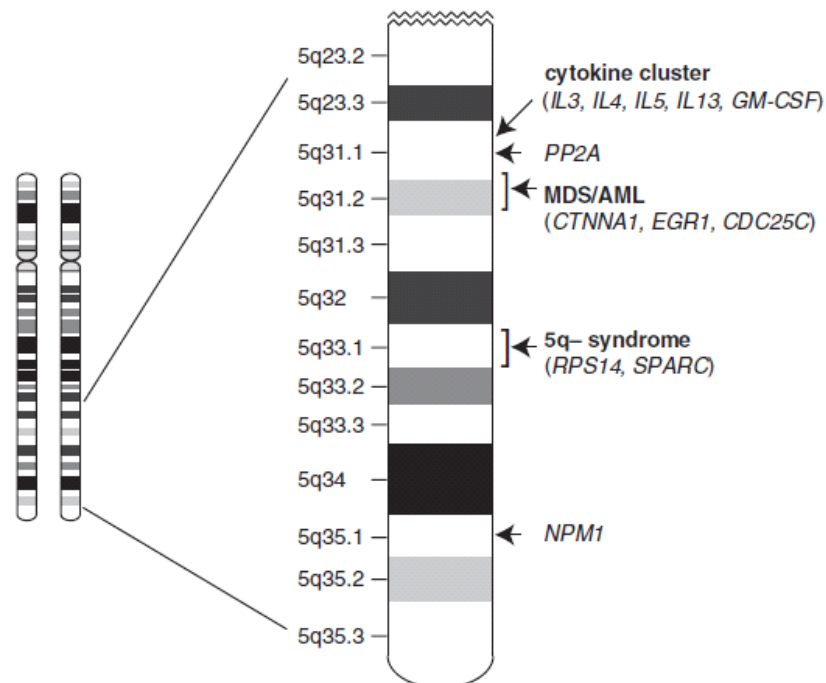
Chromozóm 4

***TET2* (Tet methylcytosine dioxygenase 2)**

Jedná se o gen ze skupiny *TET* (Ten-eleven translocation protein). Tento gen je lokalizován na chromozómu 4 (4q24). Vzniklé proteiny mají díky enzymatické aktivitě schopnost konvertovat 5-metylcytozin na 5-hydroxymetylcytozin (Abdel-Wahab *et Figueroa*, 2012). Chemická aktivita enzymů hraje důležitou roli v demethylaci cytozinových reziduí, což je důležité pro genovou expresi (Davids *et Steensma*, 2010). Zatím nebyl zjištěn vliv mutace *TET2* na přežití u MDS (Graubert *et Walter*, 2011). Mutace ve formě delece, nesmyslné nebo substituční mutace, ztráta heterozygoty či posun čtecího rámce se vyskytují u 19-26 % pacientů s MDS (Abdel-Wahab *et Figueroa*, 2012).

Delece dlouhého ramene chromozómu 5

Pomocí metody umlčení (knock down) bylo studováno 41 genů, které se vyskytují v deletované oblasti chromozómu 5. Pozornost byla věnována hlavně genům, které jsou exprimovány CD34+ hematopoetickými buňkami, např.: *SPARC*, *EGR1*, *NPM1* (všechny se nevyskytují přímo v deletované oblasti, nicméně stejně se předpokládá jejich možný vliv na patogenezi onemocnění). S 5q- syndromem byla spojena delece, a tím snížená exprese genu *RPS14* (Ebert, 2009). Bylo prokázáno, že haploinsuficience je mechanismem, který iniciuje vznik MDS a jeho progresi (Graubert *et* Walter, 2011).



Obr. 7 Schéma 5q delece u MDS (Ebert, 2009)

***RPS14* (Ribosomal protein S14)**

Tento gen se vyskytuje v oblasti 5q33 (Davids *et* Steensma, 2010). Produkt genu je komponentou 40S ribozomální podjednotky. Při delecii nedochází ke správnému sestavení ribozómu (Ebert, 2009). Ribozóm je ovšem klíčovým pro translaci mRNA do proteinů (Giagounidis *et al.*, 2014). Knock down *RPS14* způsobuje inhibici růstu erytroidních buněk a podporuje růst kolonie megakaryocytů. Stejně tak indukuje apoptózu buněk a morfologické abnormality v erytroidní řadě (Davids *et* Steensma, 2010). Nedochází však

k ovlivnění trombopoézy. Experimenty poukazují na to, že haploinsuficience tohoto genu zvyšuje aktivitu dráhy p53, která je klíčovou pro zastavení probíhajícího buněčného cyklu a pro spuštění apoptózy. Dochází k tomu hlavně u erytroidních buněk, což má za následek hypoplastickou anémi (Giagounidis *et al.*, 2014). Jedná se o heterozygotní (monoalelické) delece. U tohoto genu nedochází k mutaci nebo umlčení funkce pomocí hypermetylace. Haploinsuficience má tedy zřejmě v patogenezi MDS velký význam (Davids *et Steensma*, 2010). Je však jasné, že haploinsuficience *RPS14* nezpůsobuje veškeré hematopoetické projevy MDS. To napovídá, že se v CDR (common deleted region) budou vyskytovat jiné geny, jejichž delece má na onemocnění svůj vliv. Jedná se například o gen *EGR1* (Graubert *et Walter*, 2011). Prognóza při delecí *RPS14* u MDS pacientů je příznivá (Davids *et Steensma*, 2010). Delece genu *RPS14* hraje stěžejní roli u 5q- syndromu (Ebert *et al.*, 2008).

***SPARC* (Secreted protein, acidic, cystein-rich)**

Tento gen se taktéž vyskytuje v CDR chromozómu 5, v distální části, jejíž delece způsobuje 5q- syndrom. Jedná se o tumor-supresorový gen. Produkt genu ovlivňuje interakci cytoplazmatické membrány a stromatu buňky a podporuje apoptózu (Davids *et Steensma*, 2010). Stejně tak má antiangiogenní, antiproliferační a antiadhezivní účinky. Exprese je snížena u CD34+ buněk s delecí 5q. Po léčbě lenalidomidem se exprese naopak zvětšuje (Ebert, 2009) Je považován za jeden z genů, který podporuje proliferaci buněk s delecí 5q, a tedy jejich klonální vývoj (Giagounidis *et al.*, 2014).

***EGR1* (Epidermal growth receptor 1)**

Jedná se o tumor-supresorový gen vyskytující se v proximálním CDR 5q. Je transkripčním faktorem, který v buňce zprostředkovává odezvu na přítomnost mitogenů, stresových stimulů a růstových faktorů (Joslin *et al.*, 2007). Reguluje expresi dalších tumor-supresorových genů (např. *TP53*) a redukuje proliferaci (Giagounidis *et al.*, 2014). Gen je rozhodujícím pro regulaci zachování „klidového stavu“ kmenových buněk v KD. Haploinsuficience genu pravděpodobně přispívá ke klonálnímu vývoji kmenových buněk s delecí 5q (Ebert, 2009). K tomu, aby došlo k rozvoji onemocnění, je zapotřebí sekundárních kooperujících mutací. Počet nebo kombinace mutací, které se musí k heterozygotní/homozygotní ztrátě genu přidat, zatím není znám (Joslin *et al.*, 2007).

***NPM1* (Nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)**

Gen pro nukleofosmin je lokalizován v oblasti 5q35.1 (Fuchs, 2012). Není součástí CDR, avšak je postižen u pacientů s rozsáhlými delecemi. Jedná se o tumor-supresorový gen, jehož exprese je díky haploinsuficienci snížena (Ebert, 2009). Umlčení genu vede ke vzniku genetické nestability. KD u myši s touto mutací je hypercelulární s dysplastickými rysy v erytroidní a megakaryocytární linii. Nevyzrálé buňky červené krevní řady se hromadí v KD. Jedná se o heterozygotní mutace, které u myši postihují lymfoidní i myeloidní řadu (Fuchs, 2012). Tyto informace napovídají o tom, že haploinsuficience přispívá ke vzniku fenotypových znaků doprovázejících MDS (Ebert, 2009). Stejně jako gen *EGR1* nebo *SPARC* pravděpodobně podporuje proliferační výhodu buněk s delecí, a tím přispívá ke klonálnímu vývoji onemocnění (Giagounidis *et al.*, 2014).

***miR-145* a *miR-146a* (MicroRNA-145, MicroRNA-146a)**

Geny se vyskytují v distálním CDR chromozómu 5. Produkty těchto genů jsou nekódující RNA, které se váží ke specifické mRNA a způsobují tak genové umlčení. Jejich exprese je při delecí snížena. Ovlivňují vrozenou imunitní signalizaci (Duong *et al.*, 2012). U pacientů s del(5q) dochází u CD34+ buněk k umlčení těchto genů (Giagounidis *et al.*, 2014). To v myši hematopoetické kmenové/progenitorové buňce způsobí megakaryocytární dysplazii. Dojde k trombocytóze a k neutropenii (Duong *et al.*, 2012).

Chromozóm 7 (delece dlouhého ramene/monozomie)

***EZH2* (Enhancer of zeste homolog 2)**

V deletované oblasti byl lokalizován gen *EZH2* (Graubert *et al.*, 2011). Jedná se o katalytickou doménu skupiny Polycomb represivního komplexu 2 (PRC2). Zodpovídá za metylace histonů 3, což reprimuje transkripci. U MDS dochází ke ztrátě funkce tohoto genu. U pacientů s *de novo* MDS se vyskytuje mutace v 6,4-12 % případů. Mutace je indikátorem horší prognózy. Bejar *et al.* (2011) ve své studii prokazují, že mutace *EZH2* souvisí s nižším přežitím nezávisle na IPSS a dalších mutacích. U *de novo* AML se tato mutace vyskytuje jen zřídka, dalo by se tedy předpokládat, že souvisí s dysplazií (Abdel-Wahab *et al.*, 2012).

Chromozóm 12

***ETV6* (Ets variant 6)**

Gen *ETV6* se vyskytuje na krátkém rameni chromozómu 12 (12p13) a kóduje transkripční faktor (Haferlach *et al.*, 2012). Funkce genu může být ovlivněna delecí, somatickou mutací nebo translokací. U pacientů s MDS se delece vyskytuje zhruba v 0,6 % (Grimwade *et al.*, 2010; Schanz *et al.*, 2012). Nicméně v přítomnosti del(7q)-7 je možný předpoklad vyšší četnosti deletovaného *ETV6*. Studie Walla *et al.* (2012) ovšem poukázala na to, že delecí není možné dobře detekovat a na svém souboru pacientů ji prokázali u pacientů s del(7q)-7 v 18 % případů.

Chromozóm 17

***TP53* (Tumor suppressor p53)**

Jde o gen produkující tumor-supresorový protein. Jeho mutace je spojená s vyšším rizikem a vyskytuje se u 20 % MDS případů. MDS jsou v tomto případě sekundární a mutace *TP53* je součástí komplexních změn karyotypu. Prognóza je nepříznivá. Pokud u tohoto genu dojde ke ztrátě heterozygoty, prognóza je velmi špatná, proto je „nález“ mutace genu *TP53* nezávislým IPSS faktorem (Davids *et Steensma*, 2010). Předznamenává progresi do AML. Množství postižených buněk roste s progresí onemocnění (Giagounidis *et al.*, 2014).

Delece dlouhého ramene chromozómu 20 (20q-)

Zásadní geny vyskytující se v deletovaném úseku ještě nejsou známy. V CDR se vyskytují geny ze skupiny „polycomb“, např. gen *L(3)MBTL1* (homolog, který u drozofily způsobuje maligní tumor mozku - zřejmě se jedná o tumor supresorový gen) (Nimer, 2008) a gen *ASXL1* (Graubert *et Walter*, 2011).

***L(3)MBTL1* (Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1)**

Tento gen je exprimován v CD34+ hematopoetických progenitorových buňkách. Jedná se o represor. Zkompaktňuje chromatin. Přednostně rozpoznává metylovaná a dimetylovaná rezidua lyzinů u některých histonů. Tento gen je potřebný pro správně probíhající mitózu (Nimer, 2008).

***ASXL1* (Additional sex comb like 1)**

Je lokalizován na chromozómu 20 (20q11.1). Vyskytuje se v oblasti, která je u některých pacientů deletována. Kóduje ligand-dependentní koaktivační protein, který se váže na chromatin receptoru pro retinovou kyselinu. Jak ovlivňuje tato mutace patogenezi onemocnění, není zatím známo. Uvažuje se, že tento gen ovlivňuje spíše proliferaci, než diferenciaci (Davids *et* Steensma, 2010). Mutace se vyskytuje u 14,4-20,7 % MDS pacientů a je spojena s horším přežitím nezávisle na jiných parametrech, mezi které patří věk, cytogenetický nálezn a počet cytopenií. Mutace jsou somatické, nesmyslné nebo dochází v rámci inserce/delece k posunutí čtecího rámce. Některé studie předpokládají, že delece způsobuje morfologickou dysplazii a vznik anémie a leukopenie, a to nejdříve 6 měsíců po jejím vzniku (Abdel-Wahab *et* Figueroa, 2012).

Chromozóm 21

***RUNX1* (*AML1*) (Runt-related transcription factor), (Acute myeloid leukemia 1)**

Výskyt bodové mutace tohoto genu se odhaduje u zhruba 20 % pacientů s MDS. Vyskytuje se spíše u sekundárních MDS. Gen je lokalizován na chromozómu 21 (21q22) a kóduje podjednotku na DNA se vázícího faktoru, který je transkripčním faktorem nezbytným pro normální hematopoézu. Pacienti s touto mutací se nalézají v pokročilejším stádiu onemocnění a mají horší prognózu. Byly nalezeny jak bialelní, tak heterozygotní mutace genu (Davids *et* Steensma, 2010).

***IDH1/IDH2* (Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+))/ Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+) (chromozóm 2/chromozóm 15)**

Produkty genů jsou izocitrátdehydrogenázy, které způsobují konverzi izocitrátu na α -ketoglutarát. Vyskytují se zde substituční heterozygotní mutace. Tím dochází ke změně specifity enzymů a neschopnosti konvertovat izocitrát. Mutace genu se vyskytuje u 4-12 % MDS pacientů. Nebyl nalezen rozdíl v tom, když je mutován pouze gen *IDH1*, nebo oba geny zároveň. Prognóza je nepříznivá. OS (overall survival - celkové přežití) je sníženo a existuje zvýšená pravděpodobnost transformace do AML (Abdel-Wahab *et* Figueroa, 2012).

6.4 KLINICKÝ VÝZNAM GENETICKÝCH ZMĚN (viz kapitola Genetické a chromozómové změny, Genetické změny)

I z klinického hlediska představuje MDS velmi heterogenní onemocnění. O tom svědčí fakt, že pacienti, kteří mají stejný cytogenetický profil, disponují různými klinickými projevy. Prognostický skórovací systém IPSS v rámci prognózy bohužel nezohledňuje jednotlivé genové mutace. Přitom právě tyto změny budou pravděpodobně těmi klíčovými, které ovlivňují klinický projev onemocnění a OS. Jakmile bude známo, jaký vliv mají mutace genů na klinický projev, bude moci být pacientovi indikována individualizovaná léčba.

Významné mutace dle jejich klinického projevu

Delece genu *SPARC* způsobuje zvýšenou adhezi buněk, klinicky se projevuje trombocytopenií a anémií. Delece genu *EGR1* se u pacienta projevuje leukocytózou, anémií a trombocytopenií. Defekty v regulaci buněčného cyklu a následná apoptóza je ovlivněna delecí genů *CDC25C* a *PP2A*. Typická makrocytární anémie souvisí s haploinsuficiencí genu *RPS14*. Stejně tak haploinsuficience *miR-145* a *miR-146a* ovlivňuje funkci těchto genů. Fenotypově se to projeví přítomností trombocytózy, neutropenie a megakaryocytární dysplazie (Giagounidis *et al.*, 2014). Somatické mutace genů *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX*, *ASXL1* jsou indikátory nízkého OS a jsou považovány za důležité pro klinickou prognózu.

Na základě pozorování byla zjištěna asociace mezi trombocytopenií a mutacemi genů *RUNX1*, *TP53*. Zároveň měli pacienti zvýšený počet blastů (Bejar *et al.*, 2011). Většina pacientů s mutacemi genů *EZH2* nebo *ASXL1* má dle IPSS nízké nebo střední-1 riziko. Přítomnost mutace *EZH2* je spojena s nižším OS. Mutace genu *ASXL1* nepředstavuje tak velké riziko. Mutace genu *TP53* jsou pozorovány u pacientů s rizikem středním-2 nebo vysokým. Jsou asociovány s trombocytopenií, zvýšeným množstvím blastů a komplexním karyotypem (Bejar *et al.*, 2011).

Mutace *TET2* nejsou tak striktně asociovány s cytopeniemi nebo množstvím blastů. U 25 % pacientů s MDS byla ve studii Bejara *et al.* (2011) nalezena bialelická delece. Jelikož se mutace nevyskytuje s tou největší frekvencí, není považována za časnou genetickou událost. Mutace genů *ASXL1* a *EZH2* mají podobný klinický projev jako

mutace *TET2*, délka přežití se však liší, což napovídá, že jejich mutace ovlivňuje jiné aspekty buněčné transformace (Bejar *et al.*, 2011).

Mutace genu *TET2* má zřejmě významnou patogenní roli, jelikož je alespoň částečně nezávislá na ostatních mutacích v genomu buňky. Právě mutace genu *TET2* a genu *TP53* řadí pacienta do specifické „karyotypové“ skupiny. *TET2* je totiž mutován převážně u pacientů s normálním karyotypem, naopak mutace *TP53* je spojována s karyotypem komplexním. Mutace *TP53* je často asociována s abnormalitami chromozómu 17, u chromozómu 7 tomu tak není, mutace *EZH2* není s delecí 7q asociována (Bejar *et al.*, 2011).

6.5 5q- SYNDROM

Historie

5q- syndrom byl poprvé popsán v roce 1974 Hermanem van den Berghem (Van den Berghe *et al.*, 1974). Jedná se o MDS s delecí dlouhého ramene chromozómu 5 jako jedinou změnou v karyotypu nemocných (Ebert, 2009). Pacienti s touto genetickou abnormalitou mají makrocytární anémii s oválnými makrocyty, normální nebo lehce snížené množství bílých krvinek a normální nebo zvýšené množství krevních destiček. V KD byla nalezena erytroidní hypoplazie, jádra megakaryocytů byla malá, kulatá nebo oválná a nelaločnatá (Cazzola, 2008).

Delece dlouhého ramene chromozómu 5 byla po Filadelfském chromozómu druhou popsanou chromozómovou změnou u hematologických malignit (Cazzola, 2008). Boulwood a Wainscoat definovali 5q- syndrom takto: Primární myelodysplastický syndrom (MDS) s del(5q) jako jedinou změnou karyotypu a se zvýšeným množstvím blastů (Boulwood *et al.*, 1994).

Současnost

V současnosti je známo, že se tato delece vyskytuje i u jiných myeloidních onemocnění. Proto bylo potřeba 5q- syndrom přesně definovat (Cazzola, 2008). Na základě WHO klasifikace je 5q- syndrom považován za jeden ze sedmi subtypů MDS (Malcovati *et Nimer*, 2008). Je pozorován u 10 % nemocných s MDS (Orazi *et Czader*, 2009). Charakteristickými znaky jsou makrocytární anémie, normální nebo zvýšené množství krevních destiček, hypolobulární mikromegakaryocyty a nízké riziko progresu do

AML (5-16 %, jiné subtypy MDS 30-45 %) (Malcovati *et Nimer*, 2008). Myeloblasty tvoří méně jak 5 % jaderných buněk KD a méně než 1 % jaderných buněk PK. Auerova tělíska nejsou přítomna (Orazi *et Czader*, 2009). Dysplazie v KD postihuje erytroidní nebo granulocytární linii, ovšem ne ve velké míře, někdy není přítomna vůbec. Buňky účastnící se megakaryopoézy vykazují značné dysplastické rysy (Haase, 2008). Většina pacientů ale konkrétními symptomy nedisponuje (Ebert, 2009). Častěji postihuje ženy a prognóza je oproti jiným subtypům MDS příznivá (Malcovati *et Nimer*, 2008).

Deletovaná oblast

Delece dlouhého ramene chromozómu 5 je intersticiální (Ebert, 2009). Předpokládá se, že genetická změna vzniká u 5q- syndromu velmi časně a postihuje hematopoetické kmenové buňky (Boultwood *et al.*, 2010). Byly nalezeny dvě oblasti, které jsou delecemi postiženy (CDR = common deleted region). CDR, která leží distálně na dlouhém rameni, způsobuje 5q- syndrom. Delece CDR, která se vyskytuje proximálně, je spojena s vyšším rizikem transformace do AML a obvykle je jednou z více cytogenetických změn. Většina pacientů má velkou delecí, která zahrnuje oba tyto CDR současně. Naproti tomu pouze menší část pacientů má deletován jen jeden z CDR regionů. Díky tomu nelze jednoduše získat informace vztahující se ke konkrétnímu deletovanému úseku (Ebert, 2009).

Deletovaná oblast 5q- syndromu má velikost 1,5 Mb; zahrnuje lokusy 5q32-5q33, vyskytuje se oproti druhému CDR distálně. V této oblasti je lokalizováno 33 genů, které jsou exprimovány CD34+ hematopoetickými progenitorovými buňkami. A právě tyto buňky jsou u MDS transformovány (Ebert, 2009).

Druhá deletovaná oblast orientovaná proximálně zahrnuje oblast 5q31 velkou 1-1,5 Mb (Giagounidis *et al.*, 2014). Vyskytuje se u pacientů s MDS a AML, kteří nemají 5q- syndrom. Tento typ delece je rovněž přítomen u t-MDS. Je většinou jednou z více cytogenetických změn. V tomto úseku se vyskytují tumor-supresorové geny, například: *EGRI*, *CDC25C*, *PP2A* (Ebert, 2009).

Kromě těchto dvou CDR se na dlouhém rameni chromozómu 5 vyskytují ještě další geny, jejichž produkty hrají roli při hematopoéze a nádorovém bujení. Jedná se např. o geny kódující interleukiny 3, 4, 5, 9, 13 a 17β. Produktem dalšího přítomného genu je granulo-monocytární stimulující faktor (GM-CSF). Tyto geny pro tvorbu cytokinů se vyskytují v oblasti 5q31. Rovněž jsou zde přítomny geny pro tvorbu receptorů: *CSF1R*

(colony stimulating factor 1 receptor), *PDGFRA* (platelet-derived growth factor receptor- α) a *PDGFRB* (platelet-derived growth factor receptor- β) (Ebert, 2009).

Dosavadní výzkumy poukazují na fakt, že příčinou podněcující vznik MDS u pacientů s 5q- syndromem, je haploinsuficience zapříčiněná heterozygotní delecí dlouhého ramene chromozómu 5. V distální oblasti deletovaného úseku nebyla zjištěna přítomnost bodových mutací ani bialelické (homozygotní) delece nebo epigenetická umlčení (Duong *et al.*, 2012). Po vyšetření genů, vyskytujících se v deletované oblasti, pomocí RNA interference *in vitro* bylo zjištěno, že stejný hematologický fenotyp jako pacienti s 5q- syndromem vykazují buňky, u nichž byla snížena exprese genu *RPS14* (Ebert, 2009). Je však jasné, že se na fenotypu jedinců podílí větší množství genů, a že gen *RPS14* nezpůsobuje veškeré klinické znaky onemocnění, jako například klonální výhodu transformovaných buněk nebo odezvu na léčbu lenalidomidem. Za další kandidátní geny, jejichž haploinsuficience podporuje vznik 5q- syndromu, jsou považovány např. geny: *SPARC*, *EGRI*, *NPM1*, *miR-145*, *miR-146* (viz kapitola: Chromozómové a genové změny) (Davids *et Steensma*, 2010).

Léčba 5q- syndromu

Transfúze červených krvinek

Dříve byli pacienti s 5q- syndromem léčeni opakovanými transfúzemi červených krvinek. S časem se však závislost pacienta na transfúzích zvětšuje. Dochází díky tomu sice k dočasnému zvýšení množství hemoglobinu v těle, což je žádoucí, přináší to ale i své nedostatky. Léčba je nekomfortní a drahá. Může docházet k zatížení organismu železem, což vyžaduje chelatační léčbu. Možné jsou i bakteriální nebo virové infekce (Fenaux *et Kelaidi*, 2006).

Rekombinantní erythropoetin, talidomid a retinoidy

Nevýhody transfúzí červených krvinek přivedly kliniky na léčbu erythropoetinem. Odpověď na tuto léčbu je menší než u jiných typů MDS (Fenaux *et Kelaidi*, 2006). Další léčebný přístup je léčba talidomidem. Talidomid je imunomodulační látka (derivátem je lenalidomid) používaná pro léčbu anémie, ale pouze u cca 1/3 pacientů s del(5q) a na krátký čas (Adès *et Fenaux*, 2011). Podávání trans-retinové kyseliny ovlivňuje přítomné cytopenie, ale efektivnost léčby u 5q- syndromu je limitovaná (Fenaux *et Kelaidi*, 2006).

Chemoterapie a hypometylační látky

Chemoterapie u pacientů s 5q- syndromem není tak účinná a je spojena se vznikající myelosupresí. Odezva na léčbu hypometylačními látkami (5-azacitidin, decitabin) je u pacientů s 5q- syndromem malá (Fenaux *et al.*, 2006).

Lenalidomid

Jedná se o imunomodulační lék (Giagounidis *et al.*, 2014). Inhibuje tumor-nekrotizující faktor- α a interleukin-6, angioenezi a stimuluje tvorbu T-buněk a NK buněk prostřednictvím interleukinu-2 a interferonu- γ . (Boulwood *et al.*, 2010). U pacientů s 5q- syndromem je působení lenalidomidu nejefektivnější. Používá se ale i u jiných subtypů MDS (Krejčí *et al.*, 2008).

V posledních letech byli pacienti s 5q- syndromem léčeni pouze podpůrnou léčbou. Ukázalo se, že lenalidomid má účinky u pacientů MDS s nízkým rizikem, kteří neodpovídají na léčbu erythropoetinem. Odezva na léčbu byla vyšší u pacientů s delecí v oblasti 5q31. U těchto pacientů došlo ke snížení požadavků na transfúze a ke změně cytogenetických a cytologických abnormalit (jednalo se o pacienty s izolovanou delecí 5q nebo s přidruženými změnami) (Boulwood *et al.*, 2010).

Lenalidomid efektivně redukuje množství progenitorů v KD tak, že je zaměřen na některé haploinsuficientní geny a jejich dráhy. To vede k cytogenetické odpovědi na léčbu. Odezva na léčbu se objevuje u 50-83 % pacientů s del(5q). V distální oblasti, jejíž delece způsobuje 5q- syndrom, je jediným genem, který je díky léčbě lenalidomidem exprimován, gen *SPARC*. Na základě experimentů se předpokládá, že lenalidomid nejen že ničí poškozené buňky, ale podporuje tvorbu populace normálních prekurzorů. Tím stimuluje normální erythropoézu a obnovení linií vznikajících ze zdravých CD34+ buněk. Ovlivňuje dokonce hypercelularitu KD tím, že obnovuje žádoucí apoptózu erytroidních prekurzorů. Zlepšuje vlastnosti stromatu KD ve prospěch hematopoézy nebo zvyšuje expresi adhezních molekul na povrchu CD34+ buněk, i buněk stromatu KD. Lenalidomid taktéž zlepšuje a obnovuje správné funkce imunitního systému pacienta, které jsou díky onemocnění narušeny. Chvilí po zahájení léčby se u pacienta objevují cytopenie, které reflektují rapidní eliminaci postižených prekurzorových buněk, kdy následně dochází ke vzniku nových zdravých buněk. Pacienti dosáhnou normalizace karyotypu (45 % pacientů) a přestanou být závislí na transfúzích erytrocytů (67 % pacientů), což snižuje riziko progresu do AML.

Ovšem bohužel, u 50 % léčených dochází po 2-3 letech k relapsu (klinicky i cytogeneticky). Některé buňky se stávají rezistentními. Je tedy důležité pacienta v průběhu léčby cytogeneticky monitorovat, aby bylo zavčas zjištěno, zda nedochází k progresi onemocnění (Germing *et al.*, 2009; Giagounidis *et al.*, 2014; List *et al.*, 2006; Raza *et al.*, 2008; Sekeres *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2007).

6.6 MDS S KOMPLEXNÍM KARYOTYPEM

Definice komplexního karyotypu (CK) není vždy jednoznačná, avšak obecně je komplexní karyotyp u hematologických malignit definován jako nález tří a více změn v karyotypu nemocného (Haase *et al.*, 2007). Svůj význam uplatňuje určení CK především při stanovování prognózy nádorových onemocnění. V ISCN (2013) není CK definován.

Chromozómovou změnou se v definici CK rozumí jak strukturní, tak početní změna. Balancované změny, zisk nebo ztráta chromozómu a ring chromozómy tvořené materiálem z jednoho chromozómu se obvykle počítají jako jedna změna. Nebalancované aberace zahrnující dva a více chromozómů a invertované duplikace se mohou počítat jako více změn (podle počtu zahrnutých chromozómů) (Schoch *et al.*, 2002). Některé práce doporučují každou aberaci v karyotypu, která je uvedena v ISCN zápisu mezi závorkami, počítat jako jednu změnu (Chun *et al.*, 2010).

Komplexní karyotyp se vyskytuje u 15 % *de novo* MDS a u 50 % t-MDS (Barouk-Simonet *et al.*, 2005). Právě značná část těchto pacientů byla před diagnózou vystavena expozici terapeutických mutagenů, alkylačních látek nebo radiaci. Jeho vznik je zřejmě zapříčiněn tzv. evolucí karyotypu, kdy dochází k postupné akumulaci abnormalit. Komplexní karyotyp má nepříznivou prognózu. Medián přežití se udává nižší než jeden rok. Je stále předmětem studia, kolik změn je ukazatelem nepříznivé prognózy (Haase, 2008). CK se značí velkým rizikem progresu do AML (Trost *et al.*, 2006).

Existují nové studie, které předpokládají, že prognóza více jak tří abnormalit je horší, než pokud komplex tvoří pouze tři genetické změny. V rámci skupiny komplexní karyotyp budeme zřejmě moci naleznout ještě více podskupin ovlivňujících prognózu. Existují teorie, že prognóza je příznivější, pokud není součástí komplexního karyotypu změna postihující chromozóm 5 nebo 7. V roce 2008 Breems *et al.* definovali novou skupinu: monozomální karyotyp (MK). O něm hovoříme tehdy, jsou-li u pacienta přítomny nejméně dvě autozomální monozomie nebo jedna autozomální monozomie a nejméně

jedna strukturní abnormalita. Bylo zjištěno, že pacienti s CK bez monozomií mají lepší prognózu než ti s MK. Nebyl ovšem rozdíl v jejich přežívání, což nekoresponduje se studií Schanze *et al.* (2011), který připisuje větší riziko pacientům s CK a aberacemi chromozómu 5/7, než pacientům bez nich. Všechny tyto informace svědčí pro to, že se jedná o heterogenní podskupinu MDS. V rámci komplexního karyotypu existují zřejmě další skupiny s různými kombinacemi cytogenetických změn, a tedy i různými prognózami. Do budoucna bude proto velmi důležité shromáždit co nejvíce informací, aby tyto podskupiny byly odhaleny, a díky tomu mohli být pacienti lépe diagnostikováni a léčeni. Je vysoce žádoucí pacienty s komplexními karyotypy studovat a snažit se nacházet veškeré souvislosti (Schlegerberger *et al.*, 2012).

Součástími komplexních karyotypů jsou často nebalancované strukturní změny chromozómu 5 (5q-) a chromozómu 7 (7q-). Méně často dochází ke ztrátám genetického materiálu prostřednictvím delece u následujících chromozómů: 3 (rameno p nebo q), 12 (12p), 13 (13q), 16 (16q), 17 (17p), 18 (18q) a 20 (20q). Zmnožení genetického materiálu bylo zaznamenáno u chromozómů 8 (8/8q), 11 (11q), 21 (21q). Byla též nalezena souvislost mezi přítomností komplexního karyotypu a zmnožení oblastí: 8q24, 9p24, 11q23, 12p13, 13q12, 20q11 a 2q1q22 (Haase, 2008).

Pacienti s komplexním karyotypem jsou vyššího středního věku, remise bývá krátká, s rizikem brzkého relapsu. Léčbou pro tyto pacienty je alogenní transplantace kmenových buněk. Novými terapeutickými strategiemi jsou léky zaměřující se na hypermetylaci, deacetylaci a imunomodulaci (Haase, 2008).

Léčba

Prioritou léčby je snaha pacientovi zajistit určitou kvalitu života, u pacientů s vysokým rizikem je největším terapeutickým cílem „prodloužení“ života. Léčba je vysoce individuální (Germing *et al.*, 2013).

Alogenní transplantace

Jedná se o jediný způsob, který umožňuje potenciální vyléčení nemoci. Doporučuje se pacientům do 70 let, u kterých nejsou přítomna jiná onemocnění. U pacientů s vysokým rizikem by mělo dojít k časně transplantaci. Je známo, že pro starší pacienty je vhodnějším dárce mladší nepříbuzný jedinec než starší v příbuzenském vztahu (Germing *et al.*,

2013). U 30 % pacientů se však vyskytují závažné komplikace, které mohou způsobit smrt. U dalších 30 % pacientů dochází k relapsu onemocnění (Sdružení diagnóza MDS, 2008).

Chemoterapie

Chemoterapie většinou předchází transplantaci. Dávky jsou určovány na základě věku a přítomných komorbidit, mladší pacienti podstupují spíše vysokodávkovou chemoterapii (Germing *et al.*, 2013). Cílem je dosáhnout lepšího efektu transplantace. Chemoterapie sama o sobě nezabrání návratu onemocnění a je doprovázena nežádoucími účinky (Sdružení diagnóza MDS, 2008).

Hypometylační látky (5-azacitidin - Vidáza)

Léčba 5-azacitidinem je první volbou u pacientů, kteří nejsou vhodnými kandidáty pro transplantaci (Čuřík *et al.*, 2012). Pokud buňky pacienta vykazují epigenetické změny (hypermetylace), je pacientovi indikována léčba 5-azacitidinem (Germing *et al.*, 2013). Tím dochází k obnovení funkce některých genů (Čuřík *et al.*, 2012). Na tuto léčbu reaguje 60 % pacientů. Délka působení se udává na 14 měsíců. Azacitidin zabraňuje nebo oddaluje progresi do AML (Silverman *et Mufti*, 2005).

7 CÍL PRÁCE

Prvním cílem experimentální části diplomové práce bylo naučit se prakticky provádět metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH), naučit se výsledky obou metod analyzovat a vyhodnocovat, využít těchto znalostí k vyšetření pacientů s MDS a zaměřit se na analýzu souboru pacientů s 5q- syndromem a s komplexním karyotypem. Druhým cílem bylo výsledky pacientů z obou skupin sumarizovat a soubory pacientů detailněji popsat.

8 POUŽITÝ MATERIÁL A METODY

8.1 ZPRACOVÁNÍ BUNĚK KD PRO CYTOGENETICKÉ A MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ

Biologický materiál

Pro cytogenetické i molekulárně cytogenetické vyšetření jsou biologickým materiálem buňky kostní dřeně. Pro jednoho pacienta jsou při odběru KD ideálně připraveny dva vzorky (záleží na množství odebrané KD). Vzorky jsou následně kultivovány, každý za drobně odlišných podmínek (viz 2. část přípravy vzorku). Jeden vzorek je označen K, druhý K24col. S biologickým materiálem musí být zacházeno podle standardních operačních postupů (SOP).

Přístroje a pomůcky

- kombinovaná chladnička Philco FR 310/2T (Philco, Philadelphia, PA, USA), mraznička Liebherr GN 2856-20 (Biberach an der Riss, SRN), flowbox MSC 1.2 Advantage (Thermo Electron, Lagensbold, SRN), CO₂ inkubátor Function Line (Heraeus Holding, Hanau, SRN), centrifuga Heraeus Megafuge 16 R (Thermo Electron, Lagensbold, SRN), stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), třepačka Heidolph Real top (Heidolph, Schwabach, SRN), laboratorní sklo

Spotřební materiál

- odběrové zkumavky s heparinem (3 ml) (Sarstedt, Nümbrecht, SRN), plastové kultivační láhve (40 ml) (NuncTM Delta Surface), centrifugační zkumavky Falcon (15 ml) (obojí Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), centrifugační zkumavky Falcon (50 ml) (TPP[®], Trasadingen, Švýcarsko), Pasteurovy pipety (10 ml) (Biosigma, Benátky, Itálie), sterilní injekční jehly (B. Braun, Melsungen, SRN)

Reagencie

- Karyomax Kolcemid, Giemsovo barvivo (obojí Gibco[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), BM médium (bone marrow karyotyping medium) (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael), 0,075M KCl (lékárna FNOL), metanol, kyselina octová ledová (obojí Lach-Ner, Neratovice, ČR)

- přesné složení médií je uvedeno na přiloženém datasheetu výrobku nebo je možné jej nalézt na internetových stránkách výrobce

1. PRVOTNÍ MANIPULACE S ODEBRANÝM VZORKEM

Při odběru je od pacienta odebrána KD do dvou 3ml odběrových zkumavek s heparinem (v každé zkumavce cca 1-2 ml vzorku). Následně dochází k přečištění od heparinu přenesením cca 1 ml materiálu z odběrové zkumavky do zkumavky s 15 ml RPMI-1640 média. Po promíchání Pasteurovou pipetou dochází k centrifugaci (1000 rpm, 37°C, 10 min). Médium je odsáto a supernatant je přenesen do dvou kultivačních médií.

2. KULTIVACE

Pro každého pacienta jsou připravovány dvě kultivace, jedna označována jako K, a druhá jako K24col. Obě kultivační láhve obsahují 10 ml BM média, do kterých je přenesen biologický materiál. Kultivace probíhá po dobu 24 hodin. U kultivace označené K24col je kolcemid přidán ihned po smísení média se vzorkem. Následně jsou obě kultivace inkubovány při 37°C po dobu 24 hodin. Další den jsou do kultivace K přidány 2 kapky kolcemidu 30 minut před ukončením kultivace, a poté dochází ke zpracování obou kultivací.

3. ZPRACOVÁNÍ VZORKU

Kultivace jsou přelity do 15ml centrifugačních zkumavek a materiál je centrifugován (1000 rpm, 37°C, 10 min). Vzniklý supernatant je odsát a ke vzorku je přidáno cca 10 ml vytemperovaného 0,075M roztoku KCl. Následuje inkubace po dobu 25 minut při 37°C. Dále jsou ke vzorku přidány 3 kapky fixáže (metanol:kys.octová, 3:1) a po promíchání dochází opět k centrifugaci (1000 rpm, 37°C, 10 min). Po odstranění supernatantu je přidáno cca 10 ml vychlazené fixační směsi (-20°C), kdy první ml je přidáván po kapkách. Následně je biologický materiál inkubován 30 minut při pokojové teplotě (RT). Po další centrifugaci (1000 rpm, 4°C, 10 min) a po odsátí supernatantu je znova přidáno cca 10 ml fixační směsi a opět následuje centrifugace (1000 rpm, 4°C, 10 min). Odsátí supernatantu, přidání fixační směsi a centrifugace jsou opakovány tolikrát, dokud nemá buněčná směs mléčné zbarvení. Nakonec je zhodnocena kvalita interfázních buněk a přítomnost mitóz. Vzorek kultivace K a K24col je nakapán na sklo a obarven

Giemsovým barvivem (pro jednoho pacienta 5 podložních skel z každé kultivace). Suspenze je uskladněna v lednici a připravena k dalšímu použití.

8.2 CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ

Biologický materiál

- buněčná suspenze pacientů s diagnózou MDS

Přístroje, pomůcky, software

- laboratorní sklo, laboratorní váhy Scaltec (Scaltec Instruments, Heiligenstadt, SRN), magnetická míchačka (Schott Instruments, Mainz, SRN), centrifuga Heraeus Megafuge 16 R (Thermo Electron, Lagenselbold, SRN), kombinovaná chladnička Philco FR 310/2T (Philco, Philadelphia, PA, USA), digestoř N/900 M2 (Merci, Brno, ČR), kahan, světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japonsko), CCD kamera (Metasystems, Altlussheim, SRN), karyotypovací software Ikaros, Metafer Axioplan 2 Imaging (obojí MetaSystems, Altlussheim, SRN), software Axioplan 2 (Carl Zeiss MicroImaging, LLC, Thornwood, NY, USA)

Spotřební materiál

- Pasteurovy pipety (10 ml) (Biosigma, Benátky, Itálie), podložní skla SuperFrost[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Reagencie

- EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) - oplachovací roztok, Giemsa KaryoMAX, Gurrův roztok (Gurr's buffer solution pH 6,8) (vše Gibco[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), PBS pufr pH 7,4 (lékárna FNOL), Na₂HPO₄·12H₂O, kyselina citronová, metanol (vše Lach-Ner, Neratovice, ČR), dH₂O (vyrábí si HOK), trypsin, Leishmannovo činidlo (obojí Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Příprava roztoků

- 0,14M Na₂HPO₄: 25 g Na₂HPO₄·12H₂O je rozpuštěno v 500 ml dH₂O

- 0,1M kyselina citronová: 10,5 g kys. citronové je rozpuštěno v 500 ml dH₂O

- Leishmannovo činidlo: 0,6 g Leishmann's stain je rozpuštěno ve 400 ml metanolu (na magnetické míchačce po dobu 4 hodin), přelito do odměrné baňky a doplněno metanolem do objemu 500 ml, činidlo musí před prvním použitím 24 hodin zrát

- roztok trypsinu: 0,04 g trypsinu rozpuštěno v 1 ml PBS
- barvicí roztok I: 75 ml 0,14M Na₂HPO₄, 20 ml kyseliny citronové, 0,32 ml Giemsa Karyomax a 0,5 ml roztoku trypsinu v PBS
- barvicí roztok II: 15 ml Leishmannova činidla, 45 ml Gurrrova roztoku

Pracovní postup

Buněčná suspenze (2-3 kapky) je kápnuta na nadýchnuté podložní sklo z výšky cca 50 cm. Sklo je protáhnuto nad plamenem kahanu a do uschnutí je ponecháno při pokojové teplotě. Pro každého pacienta je připraveno 10 vzorků/10 podložních skel, 5 z kultivace K a 5 z kultivace K24col. Podložní sklo je vloženo na 2 minuty do barvicího roztoku I, následně je opláchnuto v oplachovacím roztoku EBSS a na další 3 minuty přeneseno do barvicího roztoku II. Poté je sklo opláchnuto destilovanou vodou a pozorováno ve světelném mikroskopu. Kamera umístěná na mikroskopu přenáší obraz do počítače, kde pomocí softwarového programu na analýzu obrazu Ikaros dochází k analýze obrazu a definování pozadí a objektů - chromozómů. Ty jsou následně sestavovány do karyotypu. U každého pacienta se hodnotí 30 metafází a 10 z nich se karyotypuje.

8.3 MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ FISH S LOKUSOVĚ SPECIFICKÝMI (LSI), CENTROMERICKÝMI (CEP) A CELOCHROMOZÓMOVÝMI (WCP) SONDAMI

Biologický materiál

- buněčná suspenze pacientů s diagnózou MDS

Přístroje, pomůcky, software

- kombinovaná chladnička Philco FR 310/2T (Philco, Philadelphia, PA, USA), kombinovaná chladnička Liebherr Medline LCv4010, mraznička Liebherr Comfort G 2733 (obojí Liebherr, Biberach an der Riss, SRN), centrifuga Jouan CR4-22 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), pH metr Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), skleněné kyvety, pipety (obojí Gilson, Middleton, WI, USA), vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, SRN), inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK), topná a sušicí deska Medax (Nagel, Kiel, SRN), třepačka Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, SRN), stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), digestoř N/900 M2 (Merci, Brno, ČR), mikroskop

Olympus BX41, fluorescenční lampa U-RFL-T (obojí Olympus, Tokyo, Japonsko), CCD kamera, software ISIS (obojí MetaSystems, Altlussheim, SRN), ThermoBrite S500-24 (StatSpin, Westwood, MA, USA)

Spotřební materiál

- centrifugační zkumavky (15 ml), podložní skla SuperFrost[®] (obojí Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), centrifugační zkumavky Falcon (50 ml) (TPP[®], Trasadingen, Švýcarsko), plastové mikrozukumavky (1,5 ml; 2 ml) (Eppendorf, Hamburg, SRN), Pasteurovy pipety (10 ml) (Biosigma, Benátky, Itálie), krycí skla (22x22 mm, 24x24 mm) (Menzel-Gläser, Braunschweig, SRN), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA), Fixogum Rubber Cement (Marabu, Tamm, SRN), Parafilm[®] (Bemis Company, Neenah, WI, USA), imerzní olej (Olympus, Tokyo, Japonsko)

Reagencie

- dH₂O (vyrábí si HOK), metanol, kyselina octová (obojí Lach-Ner, Neratovice, ČR), 20x SSC (saline-sodium citrate buffer), DAPI, NP40 (obojí Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), Tween20 (Serva, Heidelberg, SRN), ultračistý formamid (Qbiogene, Montreal, QC, Kanada), 70%, 80%, 90% a 96% etanol (EtOH) (Fagron, Nieuwerkerk a/d IJssel, Nizozemí), fluorescenčně značená sonda (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA; Kreatech, Amsterdam, Nizozemí)

Příprava roztoků

- 20x SSC: 132 g 20x SSC je rozpuštěno v 500 ml dH₂O a upraveno na pH 5,3; uchovává se při RT

- 2x SSC: naředění zásobního roztoku 20x SSC dH₂O

- 2x SSC/0,1% NP40: 100 ml 20x SSC, 850 ml dH₂O, 1 ml NP40, pH 7±0,2; doplněno dH₂O do 1 l, uchováváno při RT

- 0,4x SSC/0,3% NP40: 20 ml 20x SSC, 950 ml dH₂O, 3 ml NP40, pH 7-7,5; doplněno dH₂O do 1 l, uchováváno při RT

- 70% denaturační roztok: 49 ml formamidu, 7 ml 20xSSC, 14 ml dH₂O, pH 7-8; směs je rozdělena do dvou 50ml plastových zkumavek a zamrazena, po rozmražení se ke směsi přidává 5 ml 20x SSC a 10 ml dH₂O

- 70%, 80%, 90% EtOH: naředění 96% EtOH, uchováváno při -20°C

Příprava sond

Podle typu chromozómové aberace, jejíž přítomnost chceme prokázat/vyvrátit, se odvíjí typ použité sondy. Sondy jsou dodávány ředěné pufrům i neředěné. Pokud není sonda ředěna z výroby, je tak učiněno před jejím použitím. Sondy a pufrů Abbott Molecular se skladují v mrazáku, sondy Kreatech v lednici. Před použitím je nutné sondy Abbott Molecular rozmrazit, vortexovat a centrifugovat.

LSI (lokusově-specifické) + CEP (centromerické) sondy

U pacientů s diagnózou MDS je běžně vyšetřován tzv. „MDS panel“. Jedná se o vyšetření sondami pro chromozómy 5, 7, 8 a 20. Jsou k tomu využity LSI sondy, které se váží na lokusově specifická místa (detekce strukturních chromozómových aberací) nebo CEP sondy komplementární k DNA v oblasti centromer (průkaz aneuploidie, průkaz dicentrických chromozómů). Použité LSI a CEP sondy Abbott Molecular nejsou ředěné. LSI sondy na chromozóm 5 - (5q31/5p15) a 7 - (7q31/CEP7) jsou připravovány smísením 7 µl LSI pufru, 2 µl dH₂O a 0,8 µl sondy. Tyto sondy jsou aplikovány samostatně, váží se totiž na 2 odlišné oblasti značené dvěma různými fluorochromy. LSI sonda na chromozóm 20 se váže pouze na 1 lokus (20q12), kombinuje se proto obvykle s CEP sondou na chromozóm 8 (CEP8), která je značená jiným fluorochromem, aby mohly být od sebe sondy rozlišeny. Každá sonda je připravena zvlášť, s polovičním objemem všech reagentů (s příslušným pufrům LSI/CEP) a sondy jsou smíchány až po jejich denaturaci. Stejně tak mohou být kombinovány pouze CEP sondy značené různými fluorochromy, ty mohou být denaturovány dohromady, poloviční množství se aplikuje pouze u každé ze sond (0,4 µl).

Sondy od firmy Kreatech jsou již ředěné, všechny jsou dvoubarevné, tedy používané samostatně. Na vzorek se aplikuje 8 µl sondy. Jedná se o LSI sondy na chromozóm 5 - (5q31/5q33), 7 - (7q22/7q36)/SE 7 TC, 20 - (PTPRT 20q12)/20q11.

Na základě toho, jaké sondy jsou k dispozici, zvolíme takovou jejich kombinaci, aby byly vyšetřeny všechny chromozómy z panelu, respektive, aby mohly být určeny změny vybraných chromozómů (delece dlouhého ramene chromozómu 5/monozomie 5, delece dlouhého ramene chromozómu 7/monozomie 7, trizomie 8, delece dlouhého ramene chromozómu 20).

WCP (celochromozómové) sondy

Celochromozómové sondy nejsou těmi základními pro vyšetření pacientů s MDS. Jsou aplikovány v případě, kdy sondy LSI, CEP nebo metoda m-FISH přináší nejednoznačný výsledek, který je třeba ověřit. Používají se k detekci marker chromozómů, k analýze strukturních chromozómových aberací a složitých komplexních přestaveb. Sonda se váže na celý chromozóm. Výsledek hybridizace je možné hodnotit pouze na chromozómech. Sondy dodává Abbott Molecular a jsou již ředěné, připravují se mícháním 6,3 μ l dvou různě značených celochromozómových sond.

Sondy jsou denaturovány ve vodní lázni. Denaturace LSI a CEP sond od firmy Abbott Molecular probíhá 5 minut při 73°C. LSI sondy od firmy Kreatech jsou denaturovány 10 minut při 90°C. Denaturace WCP sond od firmy Abbott Molecular probíhá 10 minut při 73°C ve vodní lázni a následně 10-15 minut ve vodní lázni při 37°C. Skla, na která jsou sondy aplikovány, jsou denaturována 5 minut v denaturačním roztoku umístěným ve vodní lázni 73°C teplé (při aplikaci sondy od firmy Abbott Molecular) nebo 2 minuty (při aplikaci sond Kreatech nebo WCP sond).

Jinou možností je denaturace v zařízení zvaném Thermobrite, jde o tzv. kodenaturaci. Připravené sondy jsou aplikovány na podložní sklo se vzorkem a takto dohromady je preparát denaturován. U sond Abbott Molecular při 75°C po dobu 5 minut, u sond Kreatech při 80°C po dobu 5 minut. Nepoužívá se při hybridizaci s WCP sondami.

Pracovní postup

Před tím, než je buněčná suspenze nakapána na podložní sklo, je biologický materiál promýván. Děje se tak po centrifugaci (1000 rpm, 4°C, 10 min) a odsátí supernatantu pomocí vývěvy v digestoři. Odsávání musí být opatrné, aby nedošlo k nasátí usazených buněk. Promývacím roztokem (fixační směs) Carnoye (metanol:kyselina octová, 3:1) je zkumavka téměř doplněna, protřepána a opět centrifugována (1000 rpm, 4°C, 10 min). Po odstátí supernatantu je k buňkám přidávána fixační směs po kapkách tak dlouho, dokud nedojde ke vzniku mléčného zbarvení suspenze. To svědčí pro optimální hustotu buněk. Preparát je připraven nakápnutím 2-3 kapek na nadýchnuté a popsané podložní sklo. Po uschnutí je preparát zkontrolován pod mikroskopem. Při dostatečném počtu buněk a/nebo mitóz může být vzorek promýván v roztoku 2x SSC (pokud není počet buněk/mitóz optimální, je směs naředěna nebo je na podložní sklo suspenze dokápnuta). Roztok 2x SSC je připraven naředěním zásobního roztoku a v něm jsou ve skleněné kyvetě

preparáty po dobu 20 minut inkubovány při RT. Mezitím dochází k přípravě sond (viz výše: Příprava sond). Po uplynulých 20 minutách je preparát odvodněn inkubací ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 80%, 90% a 96% etanol), v každém alkoholu po dobu 2 minut (alkoholy jsou uchovávány při -20°C, 96% etanol v lednici). Po oschnutí je preparát denaturován ve vytemperovaném denaturačním roztoku (73°C, 5 minut nebo 2 minuty, viz výše: Příprava sond). Po denuraci projde sklo bez osušení opět alkoholovou řadou a po opětovném osušení na něj mohou být aplikovány sondy.

Pokud dochází k tzv. kodenaturaci se sondou, končí příprava podložního skla se vzorkem prvním kolem odvodňovací alkoholové řady, k denuraci v denaturačním roztoku nedochází. Vzorek se denaturuje společně se sondou v Thermobritu (viz výše: Příprava sond).

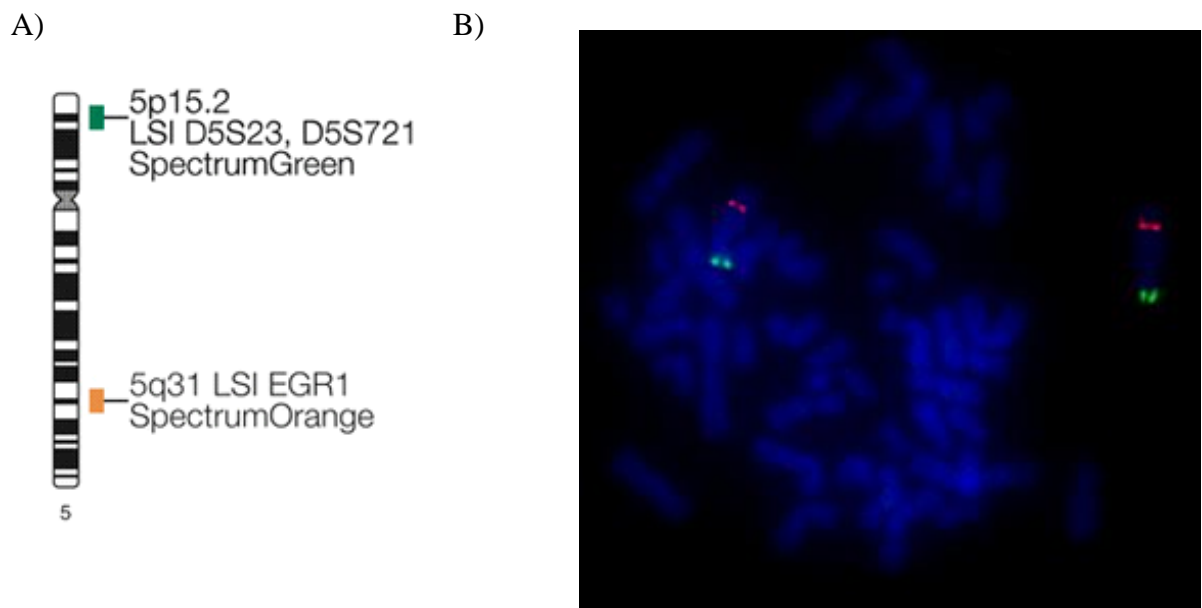
Hybridizace a její ukončení

Denaturovaná sonda je napipetována na suchý denaturovaný preparát a přikryta krycím sklem (v případě kodenaturace dochází nejdříve k aplikaci sondy na preparát, k přikrytí krycím sklem a ke společné denuraci v Thermobritu). Poté je krycí sklo oblepeno rubber cementem, který zabrání vyschnutí sondy v oblasti pod krycím sklem. Tímto je vzorek připraven k hybridizaci, která probíhá v hybridizační peci při 37°C po dobu 24 hodin. Druhý den je krycí sklo odstraněno a preparát je umístěn do roztoku 0,4x SSC/0,3% NP40, který je umístěn ve vodní lázni při 73°C. Inkubace trvá 2 minuty, v průběhu toho dochází k odmytí nenavázané sondy. Následuje inkubace 2 minuty v roztoku 2x SSC/0,1% NP40 při RT. Na vlhké sklo je napipetováno 10 µl DAPI (podbarvení) a po překrytí krycím sklem je preparát připraven k vyhodnocení. Postup zacházení se vzorkem druhý den po hybridizaci je stejný i v případě kodenaturace.

Vyhodnocení

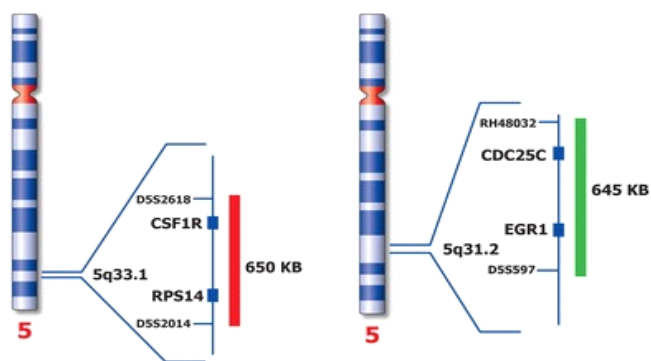
Preparát je hodnocen pomocí fluorescenčního mikroskopu s fluorescenčními filtry, které odpovídají fluorochromům použitých sond. Obraz je snímán pomocí CCD kamery a ukládán v softwaru ISIS. U LSI nebo CEP sond je hodnoceno 300 interfázních buněk a 10 metafází. U WCP sond jsou hodnoceny pouze metafáze, cca 30. Patologický nález je takový, když se abnormální signály vyskytují ve více než např. 5 % všech spočítaných interfázních jader, jedná se o tzv. cut off hodnotu sondy. Tato hodnota není fixní, u některých sond se jedná například o 10 %. Proto je třeba mít pro správné vyhodnocování zkušenosti. Metafáze jsou kontrolovány zvlášť.

LSI sonda 5q31/5p15.2 (Abbott Molecular) hybridizuje na chromozóm 5 ve dvou oblastech. První oblastí je 5p15.2 (lokusy D5S23, D5S721), je značená zeleným fluorochromem (Spectrum Green - SG), druhý signál se vyskytuje v oblasti 5q31 (gen EGR1), je označen oranžovým fluorochromem (Spectrum Orange - SO). Normální interfázní jádra mají dva zelené a dva oranžové signály. V přítomnosti delece chybí jeden oranžový signál, monozomie se projeví přítomností jednoho oranžového a jednoho zeleného signálu.



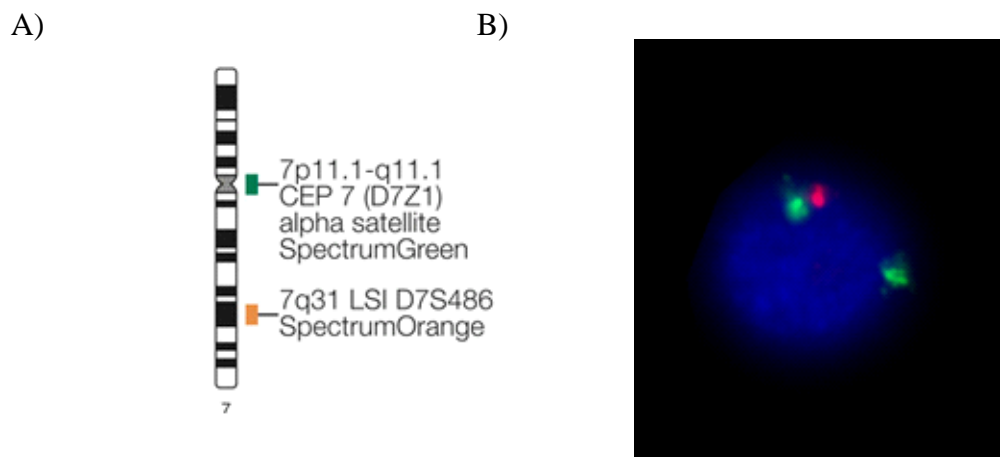
Obr. 8 A) Ideogram chromozómu 5 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda (Abbott Molecular, 2014), B) FISH na metafázním jádře za použití sondy 5q31 (SO)/5p15.2 (SG) - normální nález (obrázek získán z Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoře HOK)

LSI sonda 5q31/5q33 (Kreatech) hybridizuje ve dvou zmíněných oblastech. SG značí oblasti 5q31 (gen *CDC25*, *EGR1*), SO značí oblast 5q33 (gen *CSF1R*, *RPS14*). Oba lokusy se vyskytují na q rameni chromozómu 5. Tato sonda tedy nemůže prokázat monozomii, ale slouží k detekci delece a zároveň umožňuje zjistit rozsah delece v závislosti na tom, zda chybí oranžový i zelený signál nebo pouze jeden z nich.



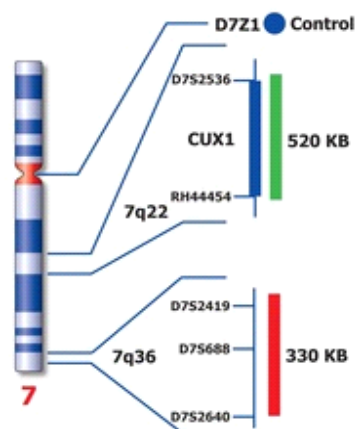
Obr. 9 Ideogram chromozómu 5 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda (Kreatech, 2014)

LSI sonda 7q31/CEP 7 (Abbott Molecular) hybridizuje k chromozómu 7 taktéž ve dvou oblastech. SG reflektuje přítomnost centromery (7p11.1-q11.1, lokus D7Z1). Druhá oblast 7q31 (lokus D7S486) je značena fluorochromem SO. Normální interfázni jádra vykazují dva oranžové a dva zelené signály. Delece oblasti 7q31 zapříčiní přítomnost jednoho oranžového signálu. Při monozomii je vidět jeden zelený a jeden oranžový signál.



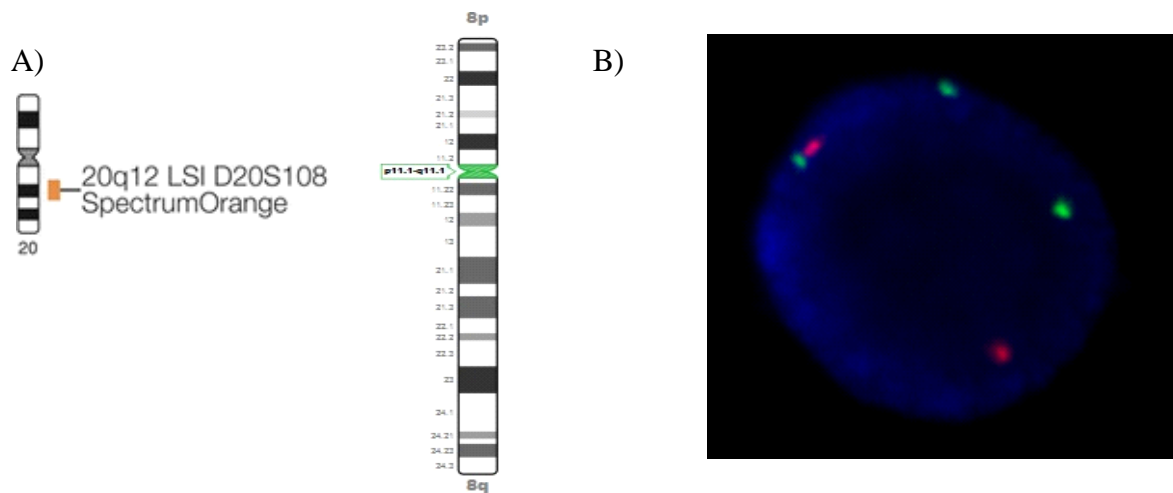
Obr. 10 A) Ideogram chromozómu 7 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda (Abbott Molecular, 2014); B) FISH na interfázni jádře za použití sondy 7q31 (SO)/CEP 7 (SG) - delece oblasti 7q31 (obrázek získán z Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoře HOK)

LSI sonda (7q22/7q36)/SE 7 TC (Kreatech) se váže na tři oblasti chromozómu 7. Jednou z nich je centromera (lokus D7Z1), oblast je značena modrým fluorochromem (Spectrum Aqua - SA). Zelený fluorochrom se váže na oblast 7q22 (gen *CUX1*) a oranžový fluorochrom na oblast 7q36 (lokusy D7S2419, D7S688, D7S2640). Tato sonda může prokázat jak monozomii (ztráta modrého signálu), tak delecí dlouhého ramene a může určit její rozsah (jeden červený signál, jeden zelený signál, ani jeden ze signálů).



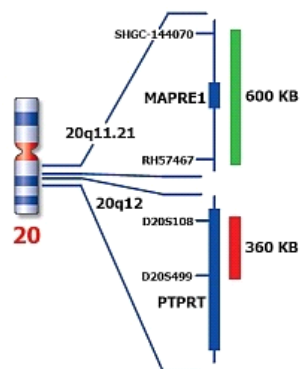
Obr. 11 Ideogram chromozómu 7 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda (Kreatech, 2014)

Kombinace sond **LSI 20q12(SO)/CEP 8 (SG)** (Abbott Molecular) se v normálních buňkách projevuje dvěma oranžovými (lokus D20S108) a dvěma zelenými signály (8p11.1-8q11.1). V případě delecí dlouhého ramene chromozómu 20 je přítomen jeden oranžový signál. Trizomie 8 se projevuje přítomností tří zelených signálů. Pokud není k dispozici sonda na chromozóm 20, je nutno sondu CEP 8 kombinovat s nějakou jinou sondou, nejčastěji s jinou centromerickou sondou značenou jiným fluorochromem.



Obr. 12 A) Ideogramy chromozómů 20 a 8 a vizualizace oblastí, na které se váží sondy (Abbott Molecular, 2014); B) FISH na interfátním jádře za použití sond 20q12 (SO) + CEP 8 (SG) - trizomie chromozómu 8 (obrázek získán z Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoře HOK)

Sonda (*PTPRT* 20q12)/20q11 (Kreatech) se váže na dlouhé rameno chromozómu 20. Zelený signál je přítomen v oblasti 20q11 (gen *MAPRE1*) a oranžový signál v oblasti 20q12 (gen *PTPRT*). Delece se projeví ztrátou signálů příslušné barvy v závislosti na velikosti delece. Tato sonda nemůže sloužit k průkazu monozomie.



Obr. 13 Ideogram chromozómu 20 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda (Kreatech, 2014)

WCP sondy hybridizují s celými chromozómy. Preparát se proto vyhodnocuje pouze na mitózách, kde jsou pozorovány marker chromozómy, strukturní chromozómové aberace nebo přestavby. To se projevuje různými dvoubarevnými kombinacemi dvou rozličně značených sond nebo nečelým zbarvením konkrétních chromozómů.

8.4 MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ mFISH

Biologický materiál

- buněčná suspenze vzorku pacientů

Přístroje, pomůcky, software

- kombinovaná chladnička Philco FR 310/2T (Philco, Philadelphia, PA, USA), kombinovaná chladnička Liebherr Medline LCv4010, mraznička Liebherr Comfort G 2733 (obojí Liebherr, Biberach an der Riss, SRN), centrifuga Jouan CR4-22 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), pH metr Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), skleněné kyvety, pipety (obojí Gilson, Middleton, WI, USA), inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK), topná a sušící deska Medax (Nagel, Kiel, SRN), třepačka Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, SRN), stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), digestoř N/900 M2 (Merci, Brno, ČR), mikroskop Olympus BX41, fluorescenční lampa U-RFL-T (obojí Olympus, Tokyo, Japonsko), CCD kamera, software ISIS (obojí MetaSystems, Altlussheim, SRN), cycler ProFlex™ (Life Technologies Corporation, CarlsBad, CA, USA), CO₂ inkubátor Function Line (Heraeus Holding, Hanau, SRN), Metafer Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss MicroImaging, LLC, Thornwood, NY, USA), CCD kamera metaferu a software Axioplan 2 (obojí MetaSystems, Altlussheim, SRN)

Spotřební materiál

- centrifugační zkumavky (15 ml), podložní skla SuperFrost® (obojí Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), centrifugační zkumavky Falcon (50 ml) (TPP®, Trasadingen, Švýcarsko), plastové mikrozukumavky (1,5 ml; 2 ml) (Eppendorf, Hamburg, SRN), Pasteurovy pipety (10 ml) (Biosigma, Benátky, Itálie), krycí skla (22x22 mm, 24x24 mm) (Menzel-Gläser, Braunschweig, SRN), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA), Fixogum Rubber Cement (Marabu, Tamm, SRN), Parafilm® (Bemis Company, Neenah, WI, USA), imerzní olej (Olympus, Tokyo, Japonsko)

Reagencie

- dH₂O (vyrábí si HOK), metanol, kyselina octová (obojí Lach-Ner, Neratovice, ČR), 20x SSC (saline-sodium citrate buffer), DAPI, NP40 (obojí Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), Tween20 (Serva, Heidelberg, SRN), 70%, 80%, 90% a 96% etanol (Fagron, Nieuwerkerk a/d IJssel, Nizozemí), 24-barevná sonda (MetaSystems, Altlussheim, SRN)

Příprava roztoků

- 20x SSC: 132 g 20x SSC je rozpuštěno v 500 ml dH₂O a upraveno na pH 7, uchovává se při RT
- 2x SSC: naředění zásobního roztoku 20x SSC dH₂O
- 2x SSCT: 50 ml 20x SSC, 450 ml dH₂O, 0,25 ml Tween
- 0,07M NaOH: naředění zásobního roztoku 1M NaOH dH₂O
- 0,4x SSC: naředění zásobního roztoku 20x SSC dH₂O
- 0,1x SSC: naředění zásobního roztoku 20x SSC dH₂O
- 70%, 80%, 90% EtOH: naředění 96% EtOH, uchováváno při -20°C

Příprava sondy

Sonda na mnohobarevnou fluorescenční *in situ* hybridizaci je uložena v mrazáku. Je již připravená z výroby. Po rozmražení je pouze vortexována a centrifugována a 10 µl sondy je ze zásobního kitu přepipetováno do PCR zkumavky.

Pracovní postup

Nejdříve dochází k přípravě roztoků, které mohou být použity během jednoho dne a maximálně dvakrát: 0,07M NaOH, 2x SSC a 0,1x SSC. Dále je připravena alkoholová řada (30%, 50%, 70%), alkoholy mohou být uchovány v lednici pro další použití (maximálně třikrát).

Nejdříve je biologický materiál promýván, to začíná centrifugací (1000 rpm, 4°C, 10 min), následuje odsátí supernatantu a doplnění zkumavky fixační směsí (metanol:ledová kyselina octová, 3:1). Po protřepání je materiál opět centrifugován (1000 rpm, 4°C, 10 min). Po odsátí supernatantu je k buňkám přidávána fixační směs po kapkách do té doby, než dojde k mléčnému zabarvení suspenze, což svědčí pro optimální hustotu buněk. Suspenze je nasáta Pasteurovou pipetou a než je kápnuta na nadýchnuté podložní sklo, nechá se materiál v pipetě chvíli sedimentovat, aby se na podložním skle vyskytovalo co nejvíce mitóz. Po uschnutí je preparát zkontrolován v mikroskopu. Je-li přítomen dostatečný počet mitóz, je sklo umístěno do vlhké umělohmotné nádoby, která se vloží na 20 minut do inkubátoru při 37°C. Po 20 minutách je preparát hydratován v sestupné alkoholové řadě, v každém alkoholu je po dobu 1 minuty (96%, 70%, 50% a 30% etanol). Následně je podložní sklo vloženo do 0,1x SSC při RT. Poté je vloženo na 30 minut do 2x

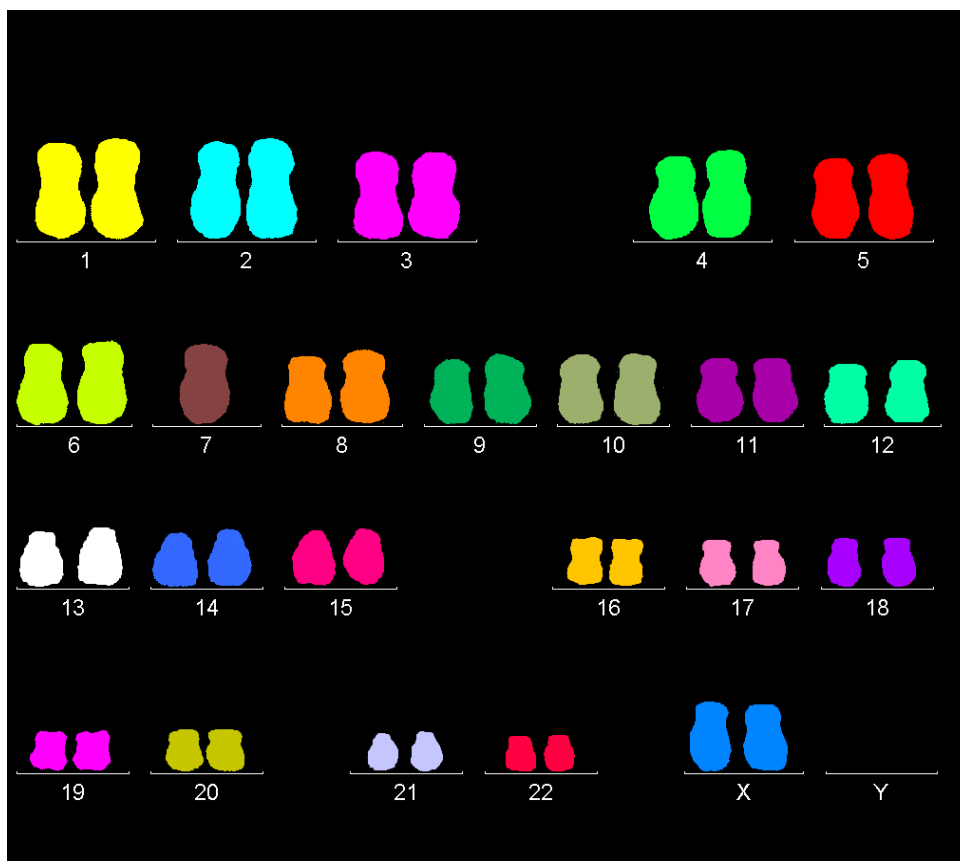
SSC při 70°C. Mezitím je nachystána sonda (viz výše) a ponechána v lednici. Zhruba 6 minut před tím, než uplyne doba 30 minut, kdy je podložní sklo ve 2x SSC při 70°C, je připravená sonda vložena do cycleru, kde je za doporučených podmínek denaturována. Po 30 minutách je roztok 2x SSC i s podložním sklem přemístěn do lázně, kde se inkubuje při 37°C po dobu 20 minut. Poté je podložní sklo přemístěno do roztoku 0,07M NaOH při pokojové teplotě, kde dochází k denuraci po dobu 1 minuty. Následuje 1 minuta v 0,1x SSC a poté 2x SSC (roztoky mají 4°C). Nakonec prochází preparát opět alkoholovou řadou, tentokrát ve vzestupném pořadí (30%, 50%, 70% a 96% etanol).

Hybridizace a její ukončení

Po uschnutí skla je na něj napipetována denaturovaná sonda, překryta krycím sklem, zalepena rubber cementem (aby nedošlo k vysychání sondy) a preparát je přes noc inkubován při 37°C v hybridizační peci. Druhý den je po odstranění krycího skla preparát vložen do 0,4x SSC při 73°C na 2 minuty a následuje 30 vteřin v SSCT při RT. Poté je na vlhké sklo napipetováno 10 µl DAPI, překryto krycím sklem a preparát může být vyhodnocen.

Vyhodnocení

Pro urychlení a zjednodušení práce jsou mitózy ve vzorku snímány pomocí přístroje Metafer, který mitózy vyhledává pomocí speciálního softwarového programu. Nasnímané metafáze jsou pak uloženy v digitální podobě v programu ISIS pracovní stanice. Pomocí ISIS programu s mFISH modulem je sestavován karyotyp u cca 10 mitóz. Každý chromozómový pár je značen sondou s různou kombinací maximálně 5 fluorochromů a po snímání 5 filtry získává každý chromozómový pár specifickou kombinaci barevných spekter. Jelikož všechny výsledné barvy nejsou od sebe rozeznatelné lidským okem, počítač každému z chromozómových párů přiřazuje tzv. pseudobarvu. Díky tomu lze detekovat translokace, komplexní přestavby a marker chromozómy (Tosi *et al.*, 1999; Veldman *et al.*, 1997). Intrachromozómové přestavby (duplikace, delece, inverze) ovšem neodhalí (Uhrig *et al.*, 1999).



Obr. 14 mFISH, karyotyp: 45,XX,-7 (obrázek získán z Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoře HOK)

9 VÝSLEDKY

Pomocí cytogenetiky a FISH (panel MDS) bylo vyšetřeno 57 pacientů s diagnózou MDS. Práce se detailněji zabývá dvěma skupinami nemocných, pacienty s diagnózou 5q-syndrom (15 pacientů) a pacienty s komplexními změnami karyotypu (14 pacientů, pacientka č. 47 se vyskytuje i v souboru 5q-syndrom).

Celkem 29 pacientů s diagnózou MDS bylo klasifikováno jako: RA (4 pacienti), RC (1 pacient), RA/RARS (1 pacient), RARS (3 pacienti), RCMD (6 pacientů, u jednoho z nich se jednalo o sRCMD, které předcházela CML), RAEB-I (2 pacienti), RAEB-II (4 pacienti), AML (2 pacienti, u jednoho progresse z RAEB-I, u druhého z RCMD), 1 pacient s hraničním množstvím blastů byl diagnostikován jako RAEB-II/AML, 2 pacienti byli diagnostikováni jako CMML (subtyp MDS dle FAB klasifikace, WHO klasifikace zařazuje CMML do myelodysplastických/myeloproliferativních neoplazií), 2 pacienti byli diagnostikováni jako AA/hypoplastická MDS a u 1 pacienta nebyl subtyp MDS uveden. U všech těchto 29 pacientů bylo alespoň jednou provedeno cytogenetické vyšetření a vyšetření panelu MDS metodou FISH. Cytogenetika i metoda FISH prokázaly u většiny pacientů normální karyotyp. U 4 pacientů prokázala cytogenetika změny chromozómů, které korespondovaly s nálezem z FISH: 1 pacient s trizomií chromozómu 8, 1 pacient s delecí dlouhého ramene chromozómu 20, 1 pacient s delecí dlouhého ramene chromozómu 5 a 1 pacient s monozomií chromozómu 7 a trizomií chromozómu 8 (u tohoto pacienta cytogenetika prokázala kromě zmíněných změn i translokaci mezi chromozómy 9 a 22 v době dg. CML, tato změna byla prokázána metodou FISH pomocí příslušné sondy, která se nepoužívá pro vyšetření panelu MDS). U 3 pacientů prokázala cytogenetika přítomnost klonálních změn chromozómů, které se nevyšetřují v panelu MDS sond. U jednoho z nich byly změny potvrzeny metodou mFISH. V souboru 29 nemocných s MDS byly metodou klasické cytogenetiky a molekulární cytogenetiky nalezeny změny u 7 (24,1 %) nemocných.

9.1 SOUBOR PACIENTŮ S 5q- SYNDROMEM

Soubor byl reprezentován 15 pacienty, u kterých byl na základě cytogenetiky diagnostikován 5q- syndrom. Jedná se o 12 žen a 3 muže. K datu 27. 2. 2014 10 pacientů žije (8 žen, 2 muži), 5 zemřelo (4 ženy, 1 muž). Věkový medián pacientů je 65,4 roků. Medián přežívání je 80 měsíců.

Cytogenetické vyšetření

U všech pacientů bylo provedeno cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření KD. Obě tato vyšetření potvrdila u celého souboru výskyt delece dlouhého ramene chromozómu 5, na jehož základě lze soubor definovat. U 10 pacientů byl pomocí FISH vyšetřen pouze chromozóm 5 (ověření přítomnosti delece). U 2 pacientů byl vyšetřen celý panel, u dalších 3 pacientů byl navíc kromě chromozómu 5 vyšetřen i chromozóm 7. V 1 případě byla detekována delece dlouhého ramene chromozómu 20 (viz Tab. III, Tab. IV: pacient č. 14), v dalším monozomie 7 (viz Tab. III, Tab. IV: pacient č. 40).

Diagnóza

Všichni pacienti byli primárně diagnostikováni jako 5q- syndrom. U 2 pacientek došlo k progresi z 5q- syndromu do akutní myeloidní leukémie (pacientka č. 38 a 47, u druhé pacientky došlo ke vzniku přídatných změn karyotypu). 1 pacientka byla diagnostikována jako RAEB-I-II (vývoj z 5q- syndromu) (č. 42), u 1 pacientky došlo k vývoji sekundární myelofibrózy (č. 43). U 2 nemocných došlo v průběhu onemocnění ke klonálnímu vývoji. U 1 nemocné byla potvrzena další chromozómová změna, delece dlouhého ramene chromozómu 20 (č. 14) a u 1 nemocného byla potvrzena monozomie chromozómu 7 (č. 40). Kromě pacientky, u které vznikla přídatná změna delece dlouhého ramene chromozómu 20, všichni pacienti, u nichž došlo k progresi onemocnění, zemřeli (4 ženy, 1 muž) (viz Tab. III, Tab. IV).

Velikost delece u pacientů ze souboru

Na základě cytogenetiky byly u pacientů orientačně stanoveny 3 velikosti delece. Velká delece, kdy je deletováno dlouhé rameno chromozómu 5 v blízkosti centromery, se vyskytovala u 7 pacientů. Středně velká delece, kdy se zlom nachází asi v polovině dlouhého ramene, byla určena u 6 pacientů a malá delece, kde je deletována pouze terminální část dlouhého ramene, byla pozorována u 2 pacientů. Mapování oblasti delece metodou FISH nebylo detailně provedeno.

Léčba

U 5 pacientů byla indikována podpurná léčba (erythropoetin, transfúze, chelatační léčba). U 6 pacientů byla indukována podpurná i paliativní léčba, u 1 z těchto pacientek byl indikován lenalidomid, u 1 azacytidin, u dalších 2 pacientů infliximab (bez efektu), 2 pacienti byli transplantováni, 2 pacienti byli v dané chvíli pouze pozorováni bez substituce (viz Tab. III). Příčina úmrtí je známa pouze u pacientky č. 47, jednalo se o febrilní neutropenii. U ostatních pacientů nejsou data o příčině úmrtí dohledatelná (jedná se o pacienty ze spádových ambulancí).

Vyhodnocení

13 % pacientů progredovalo do AML (2 pacienti z 15). U dalších 13 % došlo v průběhu onemocnění ke vzniku přídatné cytogenetické změny. U 1 pacientky došlo k vývoji sekundární myelofibrózy a u 1 k vývoji do RAEB-I-II. Medián přežívání u pacientů činil 80 měsíců.

Tab. III Základní údaje o pacientech s **5q- syndromem** (uvedená data se vztahují k 27. 2. 2014)

Pořadí/ č. pac.	Pohlaví	Rok nar.	Věk při dg.	Přežívání (měsíce)	Transformace (nové cytogenetické změny)	Léčba
1/14	Ž	1956	57	102	5q- syndrom + delece dlouhého ramene chromozómu 20	EPO (s efektem), substituce erytrocyty
2/37	Ž	1927	86	152	X	infiximab (remise nedosaženo), přechodně EPO (bez efektu), chelatační terapie
3/38	Ž	1935†	76	78	akutní myelomonocytární leukémie, AML	podpůrná a paliativní léčba (hydroxyurea + interferon) (pro léčbu azacytidinem nevhodný pacient)
4/39	Ž	1939	74	66	X	chelatační léčba
5/40	M	1940†	72	120	5q- syndrom + monozomie 7	symptomatická terapie, EPO (bez efektu), substituční terapie, chelatační léčba, infiximab (studie - bez efektu)
6/41	Ž	1940	74	71	X	EPO, transfúzní dependence, chelatační terapie
7/42	Ž	1942†	69	39	5q- syndrom, vývoj do RAEB-I-II	transfúzní závislost, azacytidin
8/43	Ž	1942†	68	130	sekundární myelofibróza	substituce erytrocyty
9/44	Ž	1944	69	139	X	EPO
10/45	Ž	1946	67	41	X	ESP, lenalidomid (transplantace odložena - rozhodnutí na základě zhodnocení efektu imunomodulační léčby), dosažena transfúzní nezávislost
11/46	Ž	1979	34	83	X	EPO (bez efektu), závislost na transfúzích erymasy, chelatační terapie → alogenní nepřibuzenská transplantace (dosaženo remise - kompletní chimerismus)

Pořadí/ č. pac.	Pohlaví	Rok nar.	Věk při dg.	Přežívání (měsíce)	Transformace (nové cytogenetické změny)	Léčba
12/47	Ž	1951†	55	19	AML (+ vznik přídatných změn karyotypu)	EPO, (relaps onemocnění), paliativní terapie (cytozinarabinosid, hydroxyurea)
13/49	M	1962	51	8	X	bez nutnosti substituce
14/56	Ž	1948	65	47	X	bez nutnosti substituce
15/57	M	1949	64	107	X	závislost na transfúzích → příbuzenská alogenní transplantace KB (remise), rejekce štěpu (relaps)→ 2. alogenní příbuzenská transplantace

Ž - žena, M - muž, RAEB - refrakterní anémie s nadbytkem blastů, AML - akutní myeloidní leukémie, EPO - erythropoetin, ESP - erythropoézu stimující hormony, KB - kmenové buňky, dg. - diagnóza, X - bez klinické nebo cytogenetické změny, † - úmrtí

Tab. IV Výsledky cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření pacientů s **5q- syndromem** (uvedená data se vztahují k 27. 2. 2014)

Pořadí/ č. pacienta	Datum vyšetření	Dg. v době vyšetření	Cytogenetický nález	FISH			
				5	7	20	8
1/14	23. 8. 2005	5q-sy	46,XX,del(5)(q?12q?33)[8]/46,XX[12]	2	ND	ND	ND
	3. 12. 2007	5q-sy	46,XX,del(5q)[9]	2	ND	ND	ND
	17. 6. 2013	5q-sy, vývoj karyotypu (20q-)	46,XX,del(5q)[13]/46,XX[1]	2	1	2	1
2/37	23. 2. 2006	5q-sy	46,XX,del(5q)[4]/46,XX[16]	2	1	ND	ND
	8. 6. 2006	5q-sy	neúspěšná cytogenetika	2	ND	ND	ND
	26. 9. 2006	5q-sy	46,XX[23]	2	ND	ND	ND
3/38	2. 7. 2009	5q-sy	46,XX,del(5)(q31)[18]	2	1	1	1
	17. 10. 2011	akutní myelomonocytární leukémie/AML	46,XX,del(5)(q31)[14]	ND	ND	ND	ND
4/39	2. 3. 2009	5q-sy	46,XX,del(5q)[8]/46,XX[15]	2	ND	ND	ND
5/40	16. 7. 2002	5q-sy	46,XY,del(5q)[4]/46,XY[2]	2	ND	ND	ND
	4. 11. 2003	5q-sy	neúspěšná cytogenetika	2	ND	ND	ND
	26. 9. 2005	5q-sy	46,XY[12]	2	ND	ND	ND
	17. 1. 2006	5q-sy	46,XY[17]	2	ND	ND	ND
	15. 1. 2007	5q-sy	jen FISH	2	ND	ND	ND
	13. 2. 2007	5q-sy	bylo nalezeno pouze 7 mitóz s počtem 46 chromozómů	ND	ND	ND	ND
	23. 1. 2012	5q-sy, vývoj karyotypu (-7)	45,XY,del(5q),-7[10]/46,XY,del(5q)[2]/46,XY[1]	2	3	ND	ND

Pořadí/ č. pacienta	Datum vyšetření	Dg. v době vyšetření	Cytogenetický náález	FISH			
				5	7	20	8
6/41	1. 10. 2009	5q-sy	46,XX,del(5q13)[25]	2	ND	ND	ND
	22. 11. 2010	5q-sy	46,XX,del(5q)[23]/46,XX[1]	ND	ND	ND	ND
7/42	3. 11. 2009	RAEB-I-II	46,XX,del(5q)[4]/46,XX[12]	2	ND	ND	ND
	29. 3. 2010	RAEB-I-II	46,XX,?del(5q)[2]/46,XX[5]	2	ND	ND	ND
	2. 8. 2010	RAEB-I-II	neúspěšná cytogenetika	2	ND	ND	ND
8/43	27. 8. 2002	5q-sy	46,XX,del(5q)[25]	2	ND	ND	ND
	29. 10. 2007	5q-sy	46,XX,del(5q)[21]	ND	ND	ND	ND
9/44	11. 2. 2002	5q-sy	46,XXdel(5q)[24]/46,XX[6]	2	ND	ND	ND
10/45	22. 11. 2010	5q-sy	46,XX,del(5)(q31)[11]/46,XX[10]	2	ND	ND	ND
	17. 10. 2011	5q-sy	46,XX,del(5)(q31)[9]/46,XX[2]	ND	ND	ND	ND
	25. 7. 2012	5q-sy	46,XX,del(5q)[11]/46,XX[7]	ND	ND	ND	ND
	18. 3. 2013	5q-sy	46,XX,del(5q)[25]	ND	ND	ND	ND
11/46	12. 11. 2007	5q-sy	46,XX,del(5q) [cp19]/46,XX[1]	2	ND	ND	ND
	3. 6. 2008	5q-sy	46,XX,del(5q)[3]/46,XX[1]	2	ND	ND	ND
	3. 12. 2008	5q-sy	FISH neprovedena, molekul. biol. potvrdila 99 % dárcovský chimerizmus	ND	ND	ND	ND
12/47	22. 12. 2005	5q-sy	46,XX,del(5q)[8]/46,XX[19]	2	ND	ND	ND
	21. 11. 2006	AML	43,XX,?-5,?+7,?-8,?-9,?-13,?-14,+mar[cp16]/46,XX[14]	2	ND	ND	ND
	5. 12. 2006	AML	46,XX,del(5q)[2]/43,XX,?-5,?+7,?-8,?-9,?-13,?-14,+mar[cp5]/46,XX[3]	ND	ND	ND	ND

Pořadí/ č. pacienta	Datum vyšetření	Dg. v době vyšetření	Cytogenetický nález	FISH			
				5	7	20	8
13/49	1. 7. 2013	5q-sy	46,XY,del(5q)[9]/46,XY[2]	2	ND	ND	ND
14/56	19. 5. 2011	5q-sy	46,XX,?del(7q),?der(17)[3]/46,XX[24]	2	1	ND	ND
15/57	23. 3. 2005	5q-sy	46,XY,?del(5q)[2]/46,XY[19]	2	ND	ND	ND
	8. 12. 2005	5q-sy	nehodnotitelné mitózy	ND	ND	ND	ND
	23. 6. 2008	5q-sy	neúspěšná cytogenetika	2	ND	ND	ND
	23. 9. 2008	5q-sy	pouze FISH	2	ND	ND	ND
	3. 11. 2008	5q-sy	pouze FISH	1	ND	ND	ND
	12. 12. 2011	5q-sy	pouze FISH	2	ND	ND	ND
	2. 2. 2012	5q-sy	pouze FISH	1	ND	ND	ND

1 - normální nález, 2 - delecce, 3 - monozomie, ND - vyšetření neprovedeno, AML - akutní myeloidní leukémie, RAEB - refrakterní anémie s nadbytkem blastů, 5q-sy - 5q-syndrom, dg. - diagnóza

9.2 SOUBOR PACIENTŮ S KOMPLEXNÍM KARYOTYPEM

Soubor byl reprezentován 14 pacienty s komplexními změnami karyotypu. Jedná se o 10 žen a 4 muže. K datu 27. 2. 2014 3 pacientky žijí, 11 pacientů zemřelo. Věkový medián pacientů je 65,4 roků. Medián přežívání činí 17 měsíců (viz Tab. XIII).

Diagnóza

Pacienti ze souboru jsou zařazeni do různých subtypů MDS (viz Tab. V). U 8 pacientů došlo v průběhu onemocnění k progresi do jiného hematologického onemocnění. Z nich 6 pacientů zemřelo, u 5 došlo k transformaci do AML, u 1 pacientky do akutní megakaryocytární leukémie. 2 pacientky s akutní leukémií doposud žijí.

Tab. V Základní údaje o pacientech s **komplexním karyotypem** (uvedená data se vztahují k 27. 2. 2014)

Pořadí/ č. pac.	Pohlaví	Rok nar.	Věk při dg.	Přežití (měsíce)	Diagnóza → vývoj	MK	léčba
1/5	Ž	1940†	73	2	RAEB-I	x	CyA, azacytidin (ukončeno pro G+ sepsi)
2/11	Ž	1948†	65	11	RAEB-II → AML	ano	azacytidin, paliativní symptomatická a substituční terapie
3/15	Ž	1938	75	12	RARS → RAEB-I → akutní hemoblastóza	ano	azacytidin, (→ akutní hemoblastóza) → paliativní substituční terapie
4/19	M	1949†	63	3	RAEB-I	ano	transfúzní závislost
5/25	Ž	1948	65	5	RAEB-I s fibrózou	x	azacytidin
6/36	M	1948†	64	7	AML (před tím RAEB-II)	x	terapie azacytidinem kontraindikována
7/47	Ž	1951†	55	19	5q-sy → AML	ano	EPO, (relaps onemocnění) → paliativní terapie (cytozinarabinosid, hydroxyurea)
8/48	Ž	1931†	77	10	RAEB-II	ano	bez terapie
9/50	Ž	1937	77	8	AML	ano	paliativní terapie (hydroxyurea)
10/51	Ž	1953†	57	62	5q-sy → RA/RARS → RAEB-I → AML	x	EPO (s efektem), závislost na transfúzích, kortikoterapie +G-CSF+ESP (s efektem), nepřibuzenská alogenní transplantace periferních KB
11/52	Ž	1939†	66	13	5q-sy	x	sledování, při progresi paliativní a substituční terapie
12/53	Ž	1964†	48	74	RCMD → RAEB-II → akutní megakaryocytární leukémie	x	EPO, transfúzní závislost, syngenní transplantace periferních krvetvorných KB (relaps) → alogenní nepřibuzenská transplantace periferních KB, zvažována retransplantace
13/54	M	1949†	59	13	RCMD → RAEB-I → AML	x	paliativní a substituční terapie
14/55	M	1939†	72	3	RAEB-I/II	x	transfúzní závislost

Ž - žena, M - muž, RA - refrakterní anémie, RARS - refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty, RAEB - refrakterní anémie s nadbytkem blastů, RCMD - refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií, AML - akutní myeloidní leukémie, 5q-sy - 5q- syndrom, EPO - erytropoetin, ESP - erytropoézu stimulující hormony, X - bez klinické změny, KB - kmenové buňky, MK - monozomální karyotyp, dg. - diagnóza, CyA - cyklosporin A, CSF - kolonie stimulující faktor, † - úmrtí

Cytogenetické vyšetření

U každého pacienta bylo alespoň jednou provedeno cytogenetické vyšetření. Dále bylo u většiny nemocných provedeno vyšetření celého nebo jen části „panelu“ MDS sond pomocí FISH. mFISH vyšetření bylo provedeno u všech pacientů (u pacientky č. 11 3x, u pacientky č. 53 2x), dohromady tedy bylo u 14 pacientů provedeno 17 vyšetření pomocí metody mFISH. (viz Tab. VI).

Tab. VI Výsledky cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření pacientů s **komplexním karyotypem** (uvedená data se vztahují k 27. 2. 2014)

Pořadí/ č. pac.	Datum vyšetření	Dg.	Cytogenetický nále z	FISH				Závěr (mFISH + FISH)
				5	7	20	8	
1/5	23. 7. 2013	RAEB-I	43-46,XX,komplexní změny[cp16]/46,XX[4]	1	2	2	1	40-44,XX,der(7)t(7;21)(p?;?),+der(9)del(9)(p11pter)del(9)(q11qter),der(14)t(14;20)(p?;?)-16,-18,der(19)t(19;21)(?;?),der(21)t(21;22)(?;?)-21,der(22)t(20;22)(?;?)-22,+mar[cp5]
2/11	19. 11. 2012	RAEB-II	41-45,XX,komplexní změny[16]/46,XX,5q-[1]/46,XX[3]	2	3	1	1	47,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),t(7;11)(q?31;?),der(10)?del(10)(p?)add(10)(?)-14,der(17)t(14;17)(?;?),der(18)t(10;18)(q?;?)t(17;18)(?;?)+21,+21,+22[2]/46,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),t(7;11)(q?31;?),der(10)?del(10)(p?)add(10)(?)-14,der(17)t(14;17)(?;?),der(18)t(10;18)(q?;?)t(17;18)(?;?)+21,+22[2]/44,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3q?27::7?q?→?q?),t(6;12)(q;p?)-7,t(7;11)(q?31;?),der(9)t(3;9)(q;q?31),?dic(12;18)(?;?)+mar[2]
	15. 7. 2013	RAEB-II	44-45,XX,komplexní přestavby[cp11]/46,XX[9]	2	1	1	1	45,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),der(7)t(7;11)(?q;?),der(10)t(1;10)(?q;?)cp3]/46,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),der(7)t(7;11)(?q;?)-10,der(17)t(5;17)(?;p?12),der(18)t(17;18)(?;p?)t(10;18)(q;q?23)ins(18;14)(q?23;q?)+21,+22[cp3]/46,XX[8]
	21. 10. 2013	AML	42-48,XX,komplexní změny[16]/80-88,XX,komplexní změny[3]/46,XX[1]/nalezeny četné chromozómové zlomy	2	3	ND	ND	41,X,-X,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter)-7,der(10)t(10;18),der(11)t(7;11)-14,-16,der(17)t(14;17),der(18)t(17;18)(?;p?)t(10;18)(q;q?23)ins(18;14)(q?23;q?),der(21)t(7;21)ins(21;16)[10]/45,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),t(7;11)(q?31;?),i(8)(q10),der(10)t(10;18),der(16)t(16;21)-14,der(17)t(14;17),der(18)t(17;18)(?;p?)t(10;18)(q;q?23)ins(18;14)(q?23;q?)+22[9]

pozn. nále z dle ISCN je zobrazen v části: Závěr (mFISH + FISH)

Pořadí/ č. pac.	Datum vyšetření	Dg.	Cytogenetický náleží	FISH				Závěr (mFISH + FISH)
				5	7	20	8	
3/15	27. 5. 2013	RARS	44-48 chromozómů, komplexní změny[cp31]	2,4	2	2	5	44- 49,XX,dic(1;7)(?p10;p10)[9],del(5)(q31)[9],der(8)t(1;8)(q?;q?)t(7;8)(q?;q?)[2],- 15[2],der(16)t(11;1;16)(?;q?;q?)[6],der(17)t(3;17)(q?;?p)t(15;17)(q?;?p)[5],der(20)t(15;20)(q?;q?)[5],+der(20)t(15;20)(q?;q?)[2], +mar[8],+mar[4]
	5. 11. 2013	RAEB-I	44-49,XX,-1,-3,-5,-7,- 10,-13,-15,-16,-17,- 20,+8-13+mar[cp30]/ nalezeny 2 mitózy s počtem 79 a 84 chromozómů	ND	ND	ND	ND	ND
4/19	19. 11. 2012	RAEB-I	45,XY,del(5q),-7[5]/ 44-46,XY,komplexní změny[cp15]	2	2,3	1	1	46,XY,del(5)(q31),der(12)del(12)(p?13)del(12)(q?13),der(?)t(?;12)(p?;p?)[4]/45,XY,del(5)(q31),- 7,der(12)del(12)(p?13)del(12)(q?13),der(?)t(?;12)(p?;p?)[4]/44, X,-Y,del(5)(q31),- 7,der(12)del(12)(p?13)del(12)(q?13),der(?)t(?;12)(p?;p?)[2]/44, XY,del(5)(q31),-7,-12,der(?)t(?;12)(p?;p?)[2]
5/25	23. 9. 2013	RAEB-I s fibrózou	45,XX,?dic(2;8)[2]/ 46,XX[30]	2	3	1	1	42,XX,der(1)t(1;13)(q?;q?),dic(4;17)(q?;p?13?),der(5)t(4;5)(q?;q?31)ins(5;20)(q?31q?31,q12q12),-7,- 13,?dic(17;20)(p?13;?),2dmin[6]/46,XX[10]
6/36	3. 12. 2012	AML	48-58,XY,komplexní změny[cp15]	ND	ND	ND	ND	58,XY,+1,+2,del(5)(q?),+6,+8,+9,+10,+11,+13,+13,der(17)del(17)(p13.1)t(5;17)(q?;p?13),+19,+21,+22

Pořadí/ č. pac.	Datum vyšetření	Dg.	Cytogenetický nále z	FISH				Závěr (mFISH + FISH)
				5	7	20	8	
7/47	22. 12. 2005	5q-sy	46,XX,del(5q)[8]/46,XX[19]	2	ND	ND	ND	ND
	21. 11. 2006	AML	43,XX,?-5,?+7,?-8,?-9,?-13,?-14,+mar [cp16]/46,XX[14]	2	ND	ND	ND	ND
	5. 12. 2006	AML	46,XX,del(5q)[2]/43,XX,?-5,?+7,?-8,?-9,?-13,?-14,+mar [cp5]/46,XX[3]	ND	ND	ND	ND	43,XX,-9,-13,-15[cp5]/46,XX[3]
8/48	5. 8. 2008	RAEB-II	45,XX,del(5q),-7,-18,+r [6]/46,XX,del(5q),-7,der(12),-18,+2mar[2]/45,XX,del(5q),-18 [6]	2	2,3	ND	ND	45,XX,del(5q),-7,r(18)/45,XX,del(5q),-7/ 46,XX,del(5q),-7,del(18q),+18/ 46,XX,del(5q),-7,r(18),+18/46,XX,del(5q),der(7)t(7;16)(q?21;q?),+8,-16
9/50	13. 11. 2013	AML	43-45,XX,add(1q),?-3,del(5q),der(7)[cp11]/45,XX,add(1q),del(5q),-7,?der(16),?del(17p)[2]/46,XY[7]	2	2,3	ND	ND	46,XX,der(1)t(1;10)(p?;?),der(1)t(1;17)(p?36;?),del(3)(p?)(q?),der(4)t(1;4)(p?;?),del(5)(q31),der(10)t(4;10)(?;p?),del(7)(q31),der(12)t(X;12)(?q;?q),der(14)t(14;16)(q?31;?p)ins(14;17)(q?31;?),der(17)t(14;17)(?;?),der(18)t(X;18)(?;p?),der(18)t(7;18)(?q;p?) [2]/43,XX,der(1)t(1;17)(p?36;?),-3,del(5)(q31),-7,-12,der(14)t(14;16)(q?31;?p)ins(14;17)(q?31;?),der(17)t(14;17)(?;?),der(18)t(X;18)(?;p?) [2]/45,XX,der(1)t(1;17)(p?36;?),del(3)(p?)(q?),del(5)(q31),del(7)(q22q31),-12,der(14)t(14;16)(q?31;?p)ins(14;17)(q?31;?),der(17)t(14;17)(?;?),der(18)t(X;18)(?;p?) [2]
10/51	9. 3. 2005	5q-sy	47,XX,?5q,-,-11,+2mar[8]	2	ND	ND	ND	47,XX,t(5;11)(q?15;q?21),+der(5)t(5;11)(q?15;q?21 [8] Prokázána amplifikace genu MLL (11q23).
	4. 2. 2008	RA/RARS	47,XX,?del(5q),der(11),+mar[1]/46,XX [1]	2,4	ND	ND	ND	ND
	27. 4. 2009	AML	47,XX,t(5;11)(q?15;q?21),+der(5)t(5;11)(q?15;q?21)[11]	2,4	ND	ND	ND	ND

Pořadí/ č. pac.	Datum vyšetření	Dg.	Cytogenetický nálezn	FISH				Závěr (mFISH + FISH)
				5	7	20	8	
10/51	24. 8. 2009	AML	47,XX,t(5;11)(q?15;q?21),+der(5)t(5;11)(q?15;q?21)[12]	2,4	ND	ND	ND	ND
	29. 10. 2009	AML	47,XX,t(5;11)(q?15;q?21),+der(5)t(5;11)(q?15;q?21)[29]	ND	ND	ND	ND	ND
	7. 12. 2009	AML	47,XX,t(5;11)(q?15;q?21),+der(5)t(5;11)(q?15;q?21)[1] (původní klon)/46,XX[12]	ND	ND	ND	ND	ND
	11. 1. 2010	AML	46,XX[8] (dárcovská dřeň)	1	ND	ND	ND	ND
11/52	15. 12. 2004	5q-sy	46,XX,del(5q),der(9),der(12)[15]	2	1	ND	ND	46,XX,del(5)(q?),t(9;12)(p?22;q?15) V mitózách byly nalezeny dmin.
12/53	2. 1. 2007	RCMD	44-46,XX,-4,del(7q),-10,-11,-12,-17,-18,+4-6mar[16]	3	1	ND	ND	44,XX,-4,-5,del(7)p(?)q(?),der(10)t(4;10)(q?:p?12),+der(10)t(4;10)(?q;q?)ins(10;5)(q?:?q)t(5;10)(?q;p?),der(12)ins(12;18)(q?:q?)-18,der(20)t(4;20)(?q;q?)t(5;20)(?q;p?)[10]
	21. 6. 2007	RCMD	pouze FISH	1	1	ND	ND	ND
	19. 7. 2007	RCMD	pouze FISH	1	ND	ND	ND	ND
	2. 10. 2007	RCMD	pouze FISH	1	ND	ND	ND	ND
	13. 6. 2008	RAEB-II	nalezeny 3 mitózy s počtem 41-45 chromozómů s komplexním karyotypem	3	ND	ND	ND	ND
	6. 10. 2008	RAEB-II	47,XX,der(4),der(7),-10,-11,-12,-18,+19,-20,+5mar[4]/46,XX[2]	3	ND	ND	ND	47,XX,?dup(4p),-5,del(7)p(?)q(?),der(10)t(4;10)(q?:p?12),+der(10)t(4;10)(?q;q?)ins(10;5)(q?:?q)t(5;10)(?q;p?),der(12)ins(12;18)(q?:q?)-18,+19,+der(20)t(4;20)(?q;q?)t(5;20)(?q;p?)[2]/46,XX[2] Byla nalezena 1 mitóza s karyotypem původního klonu.

Pořadí/ č. pac.	Datum vyšetření	Dg.	Cytogenetický náleží	FISH				Závěr (mFISH + FISH)
				5	7	20	8	
12/53	14. 1. 2009	RAEB-II	nediagnostický vzorek	ND	ND	ND	ND	ND
	12. 3. 2009	RAEB-II	pouze FISH	1	ND	ND	ND	ND
	10. 12. 2012	RAEB-II	100% chimerizmus	ND	ND	ND	ND	ND
	31. 1. 2013	RAEB-II	46,XY[20] (dárcovská dřeň)	ND	ND	ND	ND	ND
	14. 2. 2013	RAEB-II, AMegL	46,XY[8] (dárcovská dřeň)	ND	ND	ND	ND	ND
13/54	10. 9. 2007	RAEB-I	46,XY,del(5),i(8q),der(16),der(17),der(21)[7]/46,XY,del(5),der(17)[5]/46,XY,del(5),+8,-16,der(17),der(21)[3]	ND	ND	ND	5	46,XY,del(5)(q?),i(8)(q10),del(16)(q?),der(17)t(X;17)(q;p?),der(21)t(1;21)(?q;p?)[7]/46,XY,del(5)(q?),der(16)t(1;16)(?q;q?),der(17)t(X;17)(q;p?)[2]/46,XY,del(5)(q?),der(17)t(X;17)(q;p?)[2]
14/55	18. 6. 2012	RAEB-I-II	43,X,-Y,der(5),?der(9),?-16,?-18,?+19,?-20,-22,+2mar[cp7]/46,X,Y,?del(5q),+19,der(20),der(22)[5]/47,XY,der(5),?der(16),+19,?der(22)[2]/46,XY[1]	2	1	2	1	47,XY,del(5)(q31?q?),der(18)t(18;22)(q?:?),+19,del(20)(q12),der(20)t(20;22)(?:?),der(22)t(20;22)(?:?)[2]/43,X,-Y,del(5)(q31?q?),der(6)ins(6;Y)(q?21;?)ins(6;16)(q?22;?),-16,-18,del(20)(q12),der(20)t(20;22)(?:?),der(22)t(20;22)(?:?)[cp8]

1 - normální náleží, 2 - delece, 3 - monozomie, 4 - zmnožení oblasti 5p15, 5 - trizomie, RA - refrakterní anémie, RARS - refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty, RAEB - refrakterní anémie s nadbytkem blastů, RCMD - refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií, AML - akutní myeloidní, 5q-sy - 5q- syndrom, AmegL - akutní megakaryocytární leukémie, dg. - diagnóza

Nejčastější cytogenetické změny a nejčastěji postižené chromozómy u pacientů ze souboru pacientů s komplexním karyotypem

Hodnocení zařazení jednotlivých chromozómů do komplexních změn ukázalo, že součástí komplexních změn mohou být všechny chromozómy.

Mezi nejčastěji postižené chromozómy patří chromozóm 5 (21 změn = 10,3 %), 7 (21 změn = 10,3 %), 18 (14 změn = 6,9 %), 20 (13 změn = 6,4 %), 16 a 17 (12 změn = 5,9 %). Součástí 11 změn byly chromozómy 1 a 21 (5,4 %). Součástí 10 změn je chromozóm 10 (4,9 %). Každý z chromozómů 4, 12 a 22 byly 8x součástí změn (3,9 %). Chromozómy 8 a 14 byly součástí 7 změn (3,4 %). 6 změn postihlo chromozómy 3 a 11 (= 2,9 %). Chromozómy 9 a 13 byly součástí 5 změn (2,5 %). Nejméně často byly cytogeneticky postiženy chromozómy 15, 19 a X (4 změny = 2 %), chromozómy 6 a Y (3 změny = 1,5 %) a chromozóm 2 (1 změna = 0,5 %) (viz Tab. VI).

Tab. VII Údaje o četnosti všech změn postihující konkrétní chromozóm u 14 pacientů s komplexním karyotypem

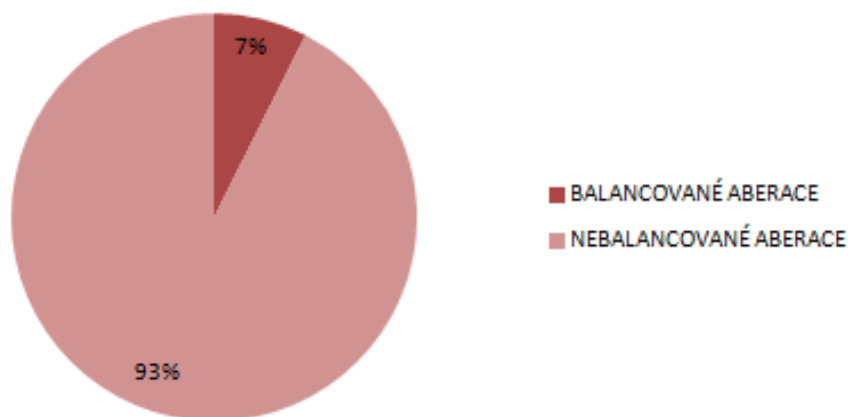
Chromozóm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
četnost	11	1	6	8	21	3	21	7	5	10	6	8
pořadí	5	13	9	7	1	12	1	8	10	6	9	7
%	5,4	0,5	2,9	3,9	10,3	1,5	10,3	3,4	2,5	4,9	2,9	3,9

Chromozóm	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
četnost	5	7	4	12	12	14	4	13	11	8	4	3
pořadí	10	8	11	4	4	2	11	3	5	7	11	12
%	2,5	3,4	2,0	5,9	5,9	6,9	2,0	6,4	5,4	3,9	2,0	1,5

Četnost = počet, kolikrát je daný chromozóm součástí cytogenetické změny, pořadí = pořadí chromozómů dle četnosti (1 - nejčastěji postižený chromozóm, 13 - nejméně často postižený chromozóm, % = četnost vyjádřená procentuálně)

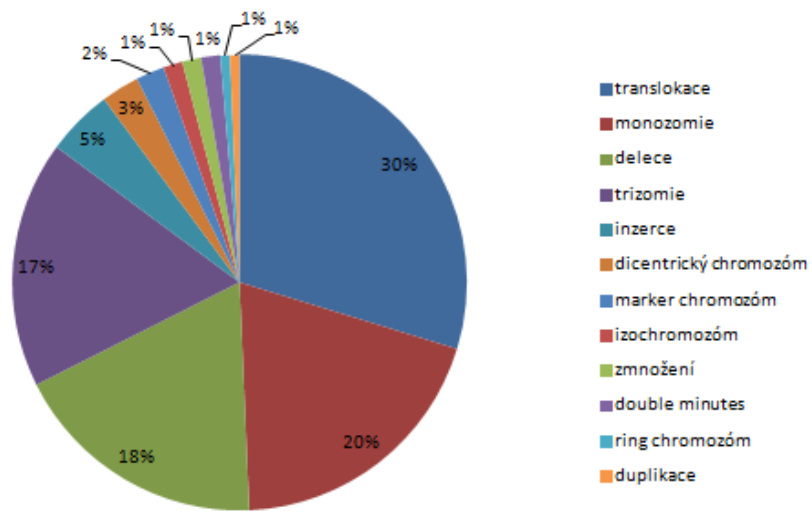
U pacientů s komplexním karyotypem bylo zaznamenáno 12 typů cytogenetických změn: translokace, inserce, delece, monozomie, dicentrické chromozómy, izochromozómy, ring chromozóm, zmnožené oblasti, duplikace, trizomie, marker chromozómy a double minutes.

Graf 1 Četnost výskytu balancovaných a nebalancovaných aberací u všech pacientů s komplexním karyotypem

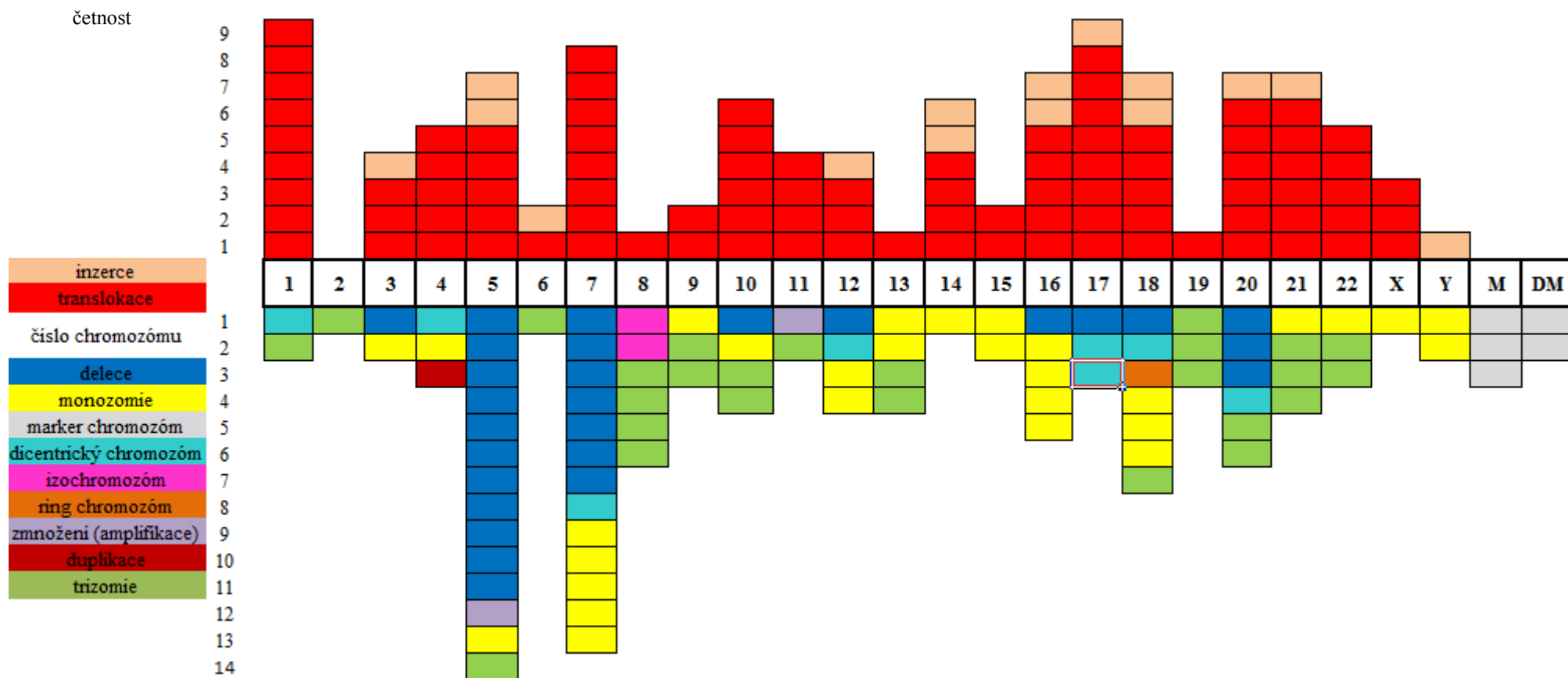


Nejčastější změnou byly translokace. Určili jsme celkem 44 translokací (30 %). 35 translokací, do kterých byly zapojeny 2 chromozómy, 4 reciproké translokace, do kterých bylo zapojeno 8 chromozómů a 5 translokací, do kterých byly zapojeny 3 chromozómy. Druhou nejčastější změnou byla monozomie (29x = 20 %), následovala delece (27x = 18 %), trizomie (26x = 17 %), 15 chromozómů bylo součástí insercí (= 7 insercí, do jedné inserce zapojeny 3 chromozómy = 5 %) 8 chromozómů tvořilo dicentrické chromozómy (3 %), 3x byl přítomen marker chromozóm, 2x byl přítomen izochromozóm, 2x double minutes a jednou došlo ke vzniku ring chromozómu a duplikace (viz Graf 2).

Graf 2 Údaje o procentuálním zastoupení konkrétních změn u pacientů s komplexním karyotypem



Tab. VIII Údaje o tom, které chromozómy a jakou změnou byly postiženy



M - marker, DM - double minutes

A) Balancované abnormality

Inzerce

Bylo zaznamenáno 7 inzercí, kterých se účastnilo 15 chromozómů (v jednom případě 3 chromozómy), 2x chromozómy 5, 14, 16 a 18, 1x chromozómy 3, 6, 12, 17, 20, 21 a Y.

Reciproké translokace

U pacientů se dohromady vyskytovaly 4 reciproké translokace, kterých se účastnilo 8 chromozómů, 2x chromozómy 11 a 12, 1x chromozómy 5, 6, 7 a 9.

B) Nebalancované abnormality

Translokace

Součástí nebalancované translokace byl nejčastěji chromozóm 1 9x (9,7 %). Následovaly chromozómy 7 a 17 8x (8,6 %), chromozóm 10, 20 a 21 6x (6,5 %), chromozómy 4, 5, 16, 18 a 22 5x (5,4 %). Chromozómy 11 a 14 byly 4x součástí translokace (4,3 %). Další v pořadí byly chromozómy 3, 12 a X 3x (3,2 %). Chromozómy 9 a 15 byly součástí dvou translokací (2,2 %). Zbývající chromozómy (6, 8, 13, 19) vstoupily do translokace pouze jednou (1 %). Chromozómy 2 a Y nebyly ani jednou součástí translokace.

(pozn. V kapitole Nebalancované abnormality - Translokace i v Tab. IX je početní a procentuální vyjádření, kolikrát se chromozóm zúčastnil translokace, uvedeno pro balancované a nebalancované translokace dohromady)

Tab. IX Údaje o tom, kolikrát byl konkrétní chromozóm u pacientů ze souboru součástí translokace (balancované a nebalancované translokace dohromady)

Chromozóm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
četnost	9	0	3	5	5	1	8	1	2	6	4	3
pořadí	1.	9.	6.	4.	4.	8.	2.	8.	7.	3.	5.	6.
%	9,7	0	3,2	5,4	5,4	1,0	8,6	1,0	2,2	6,5	4,3	3,2

Chromozóm	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
četnost	1	4	2	5	8	5	1	6	6	5	3	0
pořadí	8.	5.	7.	4.	2.	4.	8.	3.	3.	4.	6.	9.
%	1,0	4,3	2,2	5,4	8,6	5,4	1,0	6,5	6,5	5,4	3,2	0

Tab. X Údaje o chromozómech vstupujících do translokace

Derivovaný chromozóm	Chromozómy, které s chromozómem vstupovaly do translokace	Frekvence translokace	Pořadí (1-5) na základě frekvence translokace
1	10, 13, 17	3	3
3	7	1	5
4	1	1	5
5	4, 11	2	4
6	12	1	5
7	11, 16, 21, 11	4	2
8	1, 7	1	5
9	3, 12	2	4
10	1, 4, 4, 18	4	2
11	5, 7,	3	3
12	6, 9, X	3	3
14	16, 20	2	4
16	1, 1, 21	3	3
17	3, 5, 5, 14, 14, 15, X	6	1
18	7, 10, 17, 22, X	4	2
19	21	1	5
20	4, 5, 15, 22	3	3
21	1, 7, 22	3	3
22	20, 20	2	4

Tučně zvýrazněné číslo chromozómu poukazuje na reciprokovou translokaci (v tabulce je zapsána u obou příslušných chromozómů). Žlutě označená čísla chromozómů znamenají, že tyto chromozómy jsou translokovány na konkrétní chromozóm u jednoho pacienta v jednom klonu, tudíž „nositel“ translokace je považován za jednu translokováný (to se projeví v kolonce: kolikrát byl chromozóm translokován, kdy součet je o 1 jednotku nižší než počet chromozómů, které s konkrétním chromozómem vstupovaly do translokace).

Monozomie

Nejčastěji monozomický byl chromozóm 7 (5x = 17,2 %), dále chromozóm 16 (4x = 13,8 %) a chromozóm 18 (3x = 10,3 %). U 2 pacientů byla monozomie nalezena u chromozómů 12, 13, 15 a Y (6,9 %). Monozomie chromozómů 3, 4, 5, 9, 10, 14, 21, 22 a X byla u všech pacientů dohromady pozorována pouze 1x (3,4 %). Monozomie nebyla nikdy pozorována pro chromozómy 1, 2, 6, 8, 11, 17, 19 a 20.

Tab. XI Údaje o tom, jaké chromozómy a kolikrát byly monozomické

chromozóm	3	4	5	7	9	10	12	13	14	15	16	18
četnost	1	1	1	5	1	1	2	2	1	2	4	3
pořadí	5	5	5	1	5	5	4	4	5	4	2	3
%	3,4	3,4	3,4	17,2	3,4	3,4	6,9	6,9	3,4	6,9	13,8	10,3

Chromozóm	21	22	X	Y
četnost	1	1	1	2
pořadí	5	5	5	4
%	3,4	3,4	3,4	6,9

Delece

Delece byla pozorována ve 27 případech. V 11 případech se jednalo o delecii chromozómu 5 (40,7 %). V 7 případech o delecii chromozómu 7 (25,9 %), ve 3 případech o delecii chromozómu 20 (11,1 %). Jednou byl deletován chromozóm 3, 10, 12, 16, 17 a 18 (3,7 %).

Tab. XII Údaje o tom, které chromozómy a kolikrát byly deletovány

Chromozóm	3	5	7	10	12	16	17	18	20
četnost	1	11	7	1	1	1	1	1	3
pořadí	4	1	2	4	4	4	4	4	3
%	3,7	40,7	25,9	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	11,1

Trizomie

Trizomie byla potvrzena ve 26 případech. Ve 4 případech postihovala chromozóm 8 (15,4 %), ve 3 případech chromozóm 19 a 21 (11,5 %). 2x byla nalezena u chromozómu 9, 10, 13, 20 a 22 (7,7 %). Jednou se vyskytovala trizomie chromozómů 1, 2, 5, 6, 11 a 18 (3,8 %).

Tab. XIII Údaje o tom, jaké chromozómy a kolikrát byly nadpočetné (trizomie)

Chromozóm	1	2	5	6	8	9	10	11	13	18	19	20	21	22
četnost	1	1	1	1	4	2	2	1	2	1	3	2	3	2
pořadí	4	4	4	4	1	3	3	4	3	4	2	3	2	3
%	3,8	3,8	3,8	3,8	15,4	7,7	7,7	3,8	7,7	3,8	11,5	7,7	11,5	7,7

Dicentrický chromozóm

Dicentrický chromozóm byl tvořen ve 2 případech chromozómem 17. Jednou byl do tvorby dicentrického chromozómu zapojen chromozóm: 1, 4, 7, 12, 18 a 20.

Izochromozóm, zmnožení

Izochromozóm byl přítomen 2x, v obou případech se jednalo o izochromozóm dlouhých ramen chromozómu 8. Zmnožení bylo taktéž přítomno ve 2 případech. Jednou se jednalo o chromozóm 5 (5p15), ve druhém případě o chromozóm 11 (11q23).

Ring chromozóm, duplikace

Ring chromozóm byl přítomen v 1 případě, jednalo se o ring chromozóm 18. V 1 případě také došlo k duplikaci u chromozómu 4 (oblast 4p).

U pacientů byly ve 3 případech nalezeny marker chromozómy, jejichž původ nebyl určen a ve 2 případech double minutes.

Monozomální karyotyp

6 ze 14 pacientů disponovalo monozomálním karyotypem, z toho 4 pacienti nežijí (2 pacienti žijí, délka jejich přežívání je z důvodu nedávné diagnostiky zatím nižší, než průměrná). Délka přežívání 4 již nežijících pacientů byla u 3 z nich výrazně nižší, než je průměrné přežívání u pacientů s komplexními změnami, u jednoho pacienta se délka přežívání rovnala přibližně průměru. V souboru se vyskytovalo dalších 5 pacientů, kteří

zemřeli, délka jejich přežívání byla kratší, než je průměr, ale monozomálním karyotypem nedisponovali. Jelikož se jedná o malý soubor pacientů, nelze z něj vyvozovat důsledky, zda MK předznamenává horší prognózu než přítomnost komplexních změn.

Léčba

U 2 pacientů byla indukována pouze podpůrná léčba (transfúze). 3 pacienti byli léčeni kombinací podpůrné a paliativní léčby. U 4 pacientů byla indukována pouze paliativní léčba. U 1 muže není léčba známa, u 2 žen terapie neprobíhala. 2 pacienti byli z důvodu závislosti na transfúzích transplantováni. Jako paliativní léčba byla 4x zvolena léčba azacytidinem, dále chemoterapeutiky cytozinarabinosidem, hydroxyureou a imunosupresivem cyklosporin A.

Progrese onemocnění, úmrtí

5 pacientů, u kterých došlo k progresi do AML a 1 pacientka, u které došlo ke vzniku akutní megakaryocytární leukémie, zemřeli, 2 pacientky s progresí do akutní leukémie žijí. Příčina úmrtí je známa u 3 pacientek, u 2 pacientek (č. 51, 53) došlo k multiorgánovému selhání, u pacientky č. 47 byla příčinou febrilní neutropenie. U dalších pacientů nám nejsou důvody známy (pacienti ze spádových ambulancí).

Vyhodnocení

Průměrný věk pacientů s komplexním karyotypem byl 65,4 roku. Přežívání činilo 17 měsíců. Literatura uvádí přežívání pacientů s CK na zhruba 10 měsíců. Rozdíl mezi hodnotami může způsobovat malý počet analyzovaných pacientů. Četnost balancovaných vs. nebalancovaných změn a typ nejčastěji aberovaných chromozómů korelují s daty z literatury (Greenberg *et al.*, 2012; Haase, 2008).

Ze 148 chromozómových změn bylo 93 % nebalancovaných abnormalit a 7 % abnormalit balancovaných. Nejčastěji byly přítomny translokace (30 %), poté monozomie (20 %), následovaly delecce (18 %), 17 % změn byly trizomie a 5 % inzerce. 3 % změn tvořily dicentrické chromozómy, 2 % marker chromozómy a 1 % bylo zastoupeno změnami: izochromozóm, zmnožení, double minutes, ring chromozóm, duplikace.

Nejčastěji byly součástí změn chromozómy 5 (10,3 %), 7 (10,3 %), 18 (6,9 %), 20 (6,4 %), 16 (5,9 %), 17 (5,9 %), 1 (5,4 %), 21 (5,4 %), 10 (4,9 %). Zbylé chromozómy byly součástí změn v méně jak 4 %.

Chromozóm 5 nejčastěji postihovala delecce oblasti 5q31 (52 %) a translokace (24 %), poté inzerce (10 %). V 5 % postihla chromozóm 5 monozomie, také trizomie a zmnožení (oblast 5p15). Chromozóm 7 byl nejčastěji součástí translokací (38 %) a delecí (33 %) a byl postižen monozomií (24 %), v jednom případě tvořil dicentrický chromozóm (5 %). Chromozóm 18 byl nejčastěji součástí translokace (36 %), poté monozomie (21 %) a inzerce (14 %). V 7 % byl chromozóm součástí dicentrického chromozómu, tvořil ring chromozóm, byl deletován anebo byl nadbytečný (trizomie). Chromozóm 20 byl také nejvíce derivován translokacemi (46 %) a delecí oblasti 20q12 (23 %), třetí nejčastější změnou byla trizomie (15 %). V 8 % byl chromozóm postižen inzercí a taktéž tvořil 1 dicentrický chromozóm. Chromozóm 16 byl nejvíce součástí translokace (42 %) nebo byl postižen monozomií (33 %), v 17 % se účastnil inzerce a v 8 % byl deletován.

Chromozóm 17 byl taktéž nejvíce postižen translokacemi (67 %), v 17 % byl součástí dicentrického chromozómu a v 8 % byl součástí inserce a také delece. Translokace postihovala chromozóm 1 v 82 %, v 9 % byl chromozóm součástí dicentrického chromozómu a byl nadbytečný (trizomie). Chromozóm 21 byl součástí translokace v 55 %, ve 27 % byl součástí trizomie a v 9 % byl součástí inserce a rovněž monozomie. Chromozóm 10 nejčastěji postihla translokace (60 %), ve 20 % monozomie a v 10 % delece a stejně tak monozomie.

Nejčastěji byl součástí translokace chromozóm 1, 7 a 17, poté chromozómy 10, 20 a 21. Delece nejvíce postihovala chromozóm 5 a 7. Monozomií byly postiženy nejčastěji chromozómy 7, 16 a 18. Trizomie postihla nejčastěji chromozómy 8, 19, 21.

Dohromady u všech pacientů bylo zaznamenáno 148 změn (44 translokací, 29 monozomií, 27 delecí, 26 trizomií, 7 insercí, 4 dicentrické chromozómy, 3 marker chromozómy, 2 double minutes, 2 izochromozómy a 2 zmnožení oblasti, 1 ring chromozóm a 1 duplikace). Celkem 23 chromozómů bylo součástí balancovaných abnormalit (15 chromozómů - inserce, 8 chromozómů - reciproké translokace) (= 7 %). 181 chromozómů bylo součástí nebalancovaných strukturních abnormalit nebo aneuploidií (85 chromozómů - nebalancované translokace, 29 monozomií, 27 delecí, 26 trizomií, 8 chromozómů - dicentrické chromozómy, 2 izochromozómy, 2 zmnožené oblasti, 1 ring chromozóm, 1 duplikace) + 3 marker chromozómy a 2 double minutes. (= 93 %). Jako příklad nemocných s komplexním karyotypem uvádím výsledky nemocné č. 11.

Klonální vývoj - pacientka č. 11

Pacientka č. 11 byla vyšetřována na hematologii v Opavě, do Olomouce na HOK byla odeslána k došetření. V průběhu 1 roku docházelo postupně ke změně klinického stavu a nemocná byla třikrát vyšetřena v cytogenetické laboratoři. V prvním a druhém odběru byl u pacientky vyšetřen celý MDS panel, v posledním odběru chromozóm 5 a 7. Pacientka v průběhu roku (12 měsíců) progredovala z RAEB-II do AML a zemřela. Výsledky opakovaného vyšetření jsou příkladem klonálního vývoje, a proto je pacientka uváděna podrobněji.

1. odběr - dg. RAEB-II

Cytogenetika

Cytogenetika prokázala přítomnost 16 mitóz s komplexními změnami, 3 s normálním karyotypem a 1 s delecí dlouhého ramene chromozómu:

1)41-45,XX,komplexní změny[16]

2)46,XX[3]

3)46,XX,5q-[1]

FISH

Pomocí metody FISH byla detekována delece dlouhého ramene chromozómu 5 (oblast 5q31) v 50 % buněk. U 32 % buněk byla nalezena delece krátkého i dlouhého ramene chromozómu 5 současně (oblast 5p15.2 a 5q31). Stejně tak byla detekována monozomie chromozómu 7 ve 21 % buněk a delece dlouhého ramene chromozómu 7 v 7 % buněk (oblast 7q31), což je hodnota na hranici cut off.

mFISH

Metoda mFISH odhalila přítomnost 3 klonů, které korespondují se zmíněnými výsledky z cytogenetiky a FISH. V prvním odběru byly u pacientky nalezeny 3 klony. Ve všech klonech byla zjištěna delece oblastí krátkého i dlouhého ramene chromozómu 5 a přítomnost inserce chromozómu 5 do chromozómu 3. Současně se ve všech klonech vyskytovala reciproká translokace mezi chromozómy 7 a 11. První a druhý klon se lišily přítomností nadpočetného chromozómu 21. Ve třetím klonu se pak navíc vyskytovaly změny, které se již v dalších odběrech nevyskytovaly: t(6;12), -7, t(3;9) a dic(12;18).

1. klon:

47,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),t(7;11)(q?31;?),der(10)?del(10)(p?)add(10)(?)-

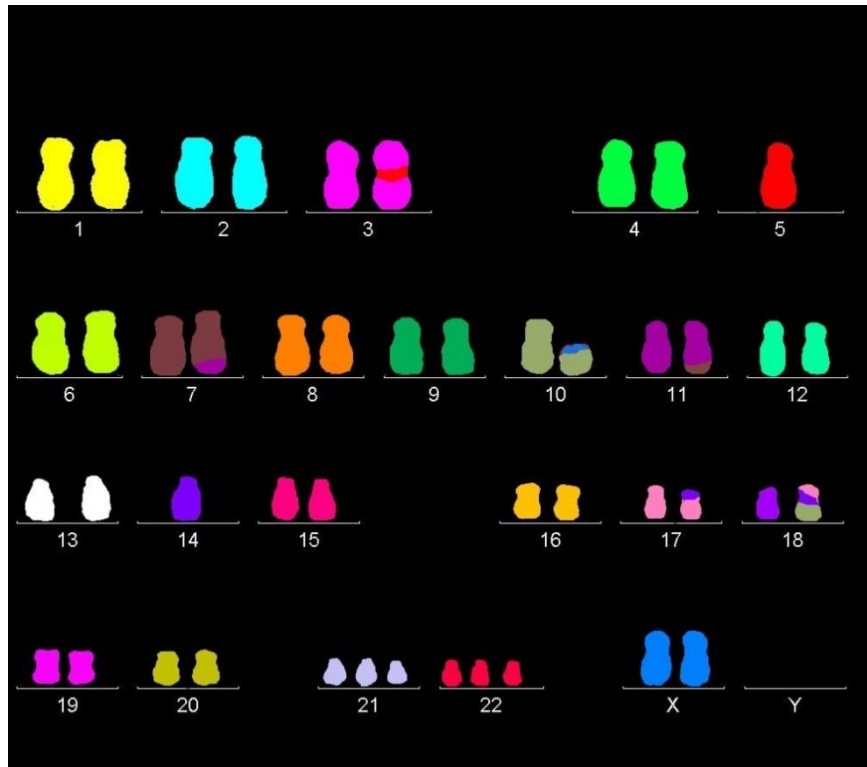
14,der(17)t(14;17)(?;?),der(18)t(10;18)(q?;?)t(17;18)(?;?),+21,+21,+22[2]

2. klon:

46,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),t(7;11)(q?31;?),der(10)?del(10)(p?)add(10)(?)-14,der(17)t(14;17)(?;?),der(18)t(10;18)(q?;?)t(17;18)(?;?),+21,+22[2]

3. klon:

44,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3q?27::7?q?→?q?),t(6;12)(q?;p?),-7,t(7;11)(q?31;?),der(9)t(3;9)(q?;q?31),?dic(12;18)(?;?),+mar[2]



Obr. 15 mFISH - 1. odběr, 2. klon (obrázek získán z Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoře HOK)

2. odběr - dg. RAEB-I, léčba azacytidinem

Cytogenetika

Cytogenetika opět potvrdila přítomnost komplexním změn, ale i přítomnost normálních karyotypů, které byly přítomny ve větší míře, než v prvním odběru:

1)44-45,XX,komplexní přestavby[cp11]

2)46,XX[9]

FISH

Metoda FISH detekovala delecii dlouhého ramene chromozómu 5 v 72 % buněk (oblast 5q31). Ve 2,6 % buněk byla nalezena delecce obou ramen chromozómu 5 (oblast 5p15.2 a 5q31). Delecce dlouhého ramene chromozómu 7 byla nalezena ve 4 % buněk, opět se jednalo o hranici cut off (oblast 7q31). Oproti prvnímu odběru nebyla monozomie chromozómu 7 prokázána.

mFISH

Metoda mFISH opět prokázala přítomnost 3 klonů se změnami, které korespondovaly s nálezy z cytogenetiky a FISH. Nápadná menší četnost a různorodost změn poukazuje zřejmě na to, že se jedná o důsledek léčby azacytidinem, kterou pacientka v době druhého odběru prodělávala. Byl dokonce nalezen klon s normálním karyotypem. V prvním a druhém klonu došlo k výrazné minimalizaci počtu změn. V žádném klonu nebyla přítomna monozomie chromozómu 7 ani delecce oblasti 7q31. V patologických klonech se nevyskytovala reciproká translokace mezi chromozómy 7 a 11, ale pouze translokace chromozómu 11 na chromozóm 7. Nález může odpovídat účinnosti léčby, a tedy snížení počtu komplexních změn v karyotypu.

1. klon:

45,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),der(7)t(7;11)(?q;?),der(10)t(1;10)(?q;?)[cp3]

2. klon:

46,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),der(7)t(7;11)(?q;?)-10,der(17)t(5;17)(?;p?12),der(18)t(17;18)(?;p?)t(10;18)(q?;q?23)ins(18;14)(q?23;q?),+21,+22[cp3]

3. klon:

46,XX[8]

3. odběr - dg. AML, paliativní symptomatická a substituční terapie

Cytogenetika

Cytogenetika odhalila přítomnost komplexních změn a čtených chromozómových zlomů, byl přítomen pouze 1 normální karyotyp:

1)42-48,XX, komplexní změny[16]

2)80-88,XX,komplexní změny[3]

3)46,XX[1]

Nalezeny četné chromozómové zlomy.

FISH

Vyšetření chromozómu 5 prokázalo delecí dlouhého ramene v 74 % buněk (oblast 5q31). Delece krátkého ramene chromozómu 5 nebyla oproti předchozím odběrům přítomna, chromozómy v metafázi však odhalily translokaci oblasti 5p15.2 krátkého ramene na jiný chromozóm. 10 % buněk vykazovalo monozomii chromozómu 7, kdy byly přítomny 2 signály pro oblast 7q31.

mFISH

Metoda mFISH prokázala přítomnost 2 klonů se změnami pozorovanými v cytogenetice a FISH. Výsledky svědčí o opětovné progresi, kdy byla již pacientka diagnostikována jako AML. Ve všech klonech byla opět přítomna inserce chromozómu 5 do chromozómu 3, kdy bylo deletováno pouze dlouhé rameno chromozómu 5. FISH odhalila přítomnost krátkého ramene chromozómu 5 (oblast 5p15.2) a jeho translokaci na jiný chromozóm. Ani přítomnost oblasti 5p15.2 ani lokalizaci translokace nebyla metoda mFISH schopna zaznamenat, mohlo se jednat o malou oblast pod limitem detekce metody. Oblast 5p15.2 byla pravděpodobně translokována na chromozóm 17, jako tomu bylo v předchozím odběru: der(17)t(5;17). V tomto odběru metoda mFISH prokázala translokaci chromozómu 14 na chromozóm 17: der(17)t(14;17), to mohlo znemožnit detekci přítomnosti malé části krátkého ramene chromozómu 5 s oblastí 5p15.2. „Nadbytečná oblast“ 7q31 v klonu s monozomií chromozómu 7 byla translokována na chromozóm 11. Dále byly přítomny změny, které byly v předchozích odběrech nalezeny, i změny nové.

1.klon:

41,X,-X,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),-

ý7,der(10)t(10;18),der(11)t(7;11),-14,-

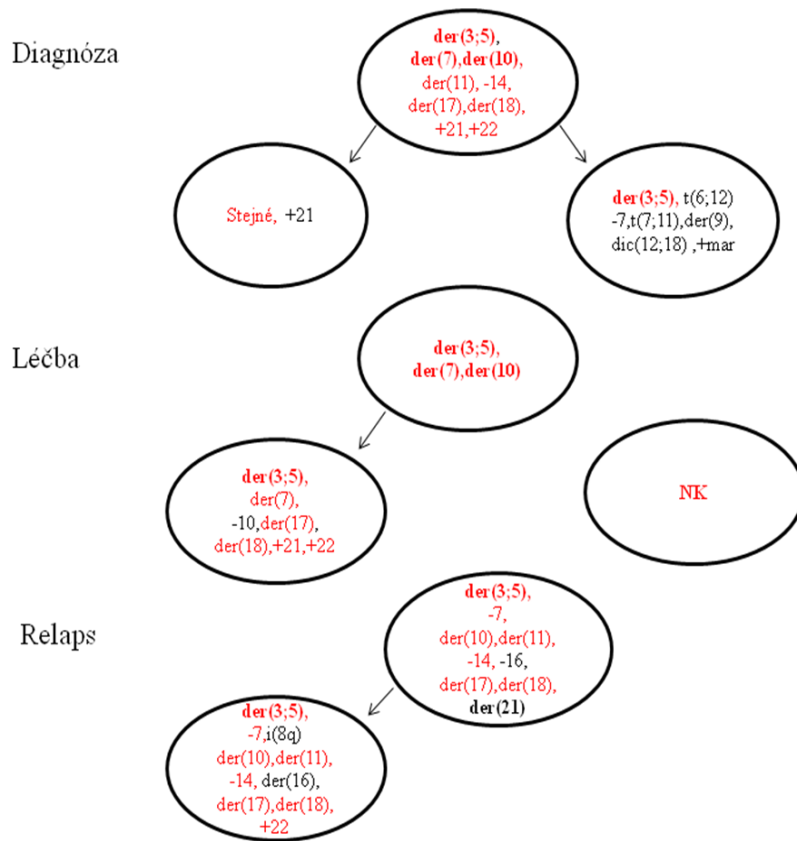
16,der(17)t(14;17),der(18)t(17;18)(?;p?)t(10;18)(q?;q?23)ins(18;14)(q?23;q?),der(21)t(7;21)ins(21;16)[10]

2.klon:

45,XX,der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter),t(7;11)(q?31;?),i(8)(q10),der(10)t(10;18),der(16)t(16;21),-

14,der(17)t(14;17),der(18)t(17;18)(?;p?)t(10;18)(q?;q?23)ins(18;14)(q?23;q?),+22[9]

Výskyt několika klonů s rozsáhlými přestavbami karyotypu svědčí o klonálním vývoji a progresi onemocnění.



Obr. 16 Schematické zobrazení klonálního vývoje v průběhu onemocnění pacientky č. 11 (červeně jsou popsány změny, které jsou společné v klonu, černě jsou změny nové, spojené s klonálním vývojem)

10 DISKUZE

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění pluripotentní kmenové buňky. Mutace v pluripotentní kmenové buňce způsobí chybnou diferenciaci buněk, a to vede k neefektivní hematopoéze (Vondráková, 2010). Různorodost klinických, morfologických i cytogenetických znaků, kterými se MDS vyznačuje, řadí toto onemocnění mezi značně heterogenní. 20-30 % pacientů progreduje do akutní myeloidní leukémie (AML) (Krejčí *et al.*, 2008). Pokud není známa příčina vzniku MDS, je označována jako primární (p-MDS) (Vondráková, 2010). U 50-70 % takových pacientů jsou přítomny cytogenetické změny (Delforge, 2003). Sekundární MDS (t-MDS) vzniká po předchozím vlivu mutačních látek (benzen, pesticidy, organická rozpouštědla aj.) nebo po předchozí radioterapii či chemoterapii (Vondráková, 2010). U 90 % pacientů s t-MDS jsou taktéž přítomny cytogenetické změny (Delforge, 2003).

5q- syndrom

Charakteristika

WHO klasifikace rozděluje MDS na 7 subtypů, jedním z nich je 5q- syndrom, kterým se práce detailněji zabývá (FAB klasifikace tento subtyp MDS nedefinuje) (Malcovati *et Nimer*, 2008). 5q- syndrom je pozorován u 10 % nemocných MDS (Orazi *et Czader*, 2009). Je definován jako: Primární myelodysplastický syndrom (MDS) s del(5q) jako jedinou změnou karyotypu a se zvýšeným množstvím blastů (Boulwood *et al.*, 1994). Prognóza je u tohoto subtypu MDS dle IPSS příznivá, do AML progreduje „pouze“ 5-16 % pacientů (Malcovati *et Nimer*, 2008). Medián přežívání se udává na 5,3 roku (tj. přibližně 64 měsíců) (Greenberg *et al.*, 2012).

Srovnání našich dat a výsledků s literaturou

Cytogeneticky, molekulárně cytogeneticky a klinicky jsme hodnotili soubor celkem 15 nemocných s diagnózou 5q- syndrom. Jednalo se o 12 žen a 3 muže. K datu 27. 2. 2014 10 pacientů žilo (8 žen, 2 muži), 5 zemřelo (4 ženy, 1 muž). Nálezy jsme porovnali s údaji v literatuře. Zjistili jsme, že ve shodě s literárními údaji nemocní s 5q- syndromem mají mírný průběh onemocnění a pouze u 4 došlo ke klinickému vývoji, u 2 pacientů (13 %) došlo k progresi do AML, což se shoduje s daty v literatuře (Malcovati *et Nimer*, 2008), u 1 pacientky se vyvinula sekundární myelofibróza a u 1 pacientky došlo k vývoji do

RAEBI-II. U dalších 13 % pacientů došlo ke klonálnímu vývoji a ke vzniku jedné přídavné změny. Kromě jedné pacientky s jednou přídavnou změnou (delecí dlouhého ramene chromozómu 20), všichni pacienti, u kterých došlo k progresi onemocnění, zemřeli.

Věkový medián pacientů byl 65,4 roků. Medián přežívání činil 80 měsíců. Tento údaj zcela nekoresponduje s daty uváděnými v literatuře (Greenberg *et al.*, 2012), což může být zapříčiněno tím, že se jedná o malý soubor pacientů. U všech pacientů byla přítomna delece dlouhého ramene chromozómu 5. Na základě cytogenetiky byla velikost delece stanovena u 7 pacientů jako velká, středně velká delece se vyskytovala u 6 pacientů a malá delece u 2 pacientů. Vyšetření FISH prokázalo, že delece zahrnovala vždy minimálně deletovanou oblast v pruhu 5q31. Velikost delece byla studována v práci Malloa *et al.* (2011), kteří vztah velikosti delece a prognózy nemocných nepotvrdili. Přesto je určení rozsahu delece významné z hlediska velikosti deletované oblasti genů v ní lokalizovaných (Jerez *et al.*, 2012).

Komplexní karyotyp

Charakteristika

Druhá skupina pacientů, která je v práci detailněji popsána, jsou pacienti s komplexním karyotypem. Komplexní karyotyp (CK) je obecně definován jako nález 3 a více změn v karyotypu nemocného (Haase *et al.*, 2007). FAB klasifikace ani WHO klasifikace nezařazují pacienty s komplexním karyotypem do konkrétního subtypu MDS. I přesto je nezbytně nutné takový karyotyp stanovit, jelikož má rozhodující význam při určování prognózy. Dle IPSS je prognóza v případě CK velmi špatná (Greenberg *et al.*, 2012). Medián přežívání se udává na 0,8 roku (tj. přibližně 10 měsíců). Riziko progresu do AML je velké (Trost *et al.*, 2006). CK se vyskytuje u 15 % p-MDS a u 50 % t-MDS (Barouk-Simonet *et al.*, 2005).

Srovnání našich dat a výsledků s literaturou

Soubor nemocných s CK byl reprezentován 14 pacienty, 10 ženami a 4 muži. K datu 27. 2. 2014 3 pacientky žily, 11 pacientů zemřelo. Věkový medián byl 65,4 roků. Medián přežívání byl 17 měsíců, což neodpovídá údajům z literatury (Greenberg *et al.*, 2012), ale hodnocený soubor je velmi malý. U 8 ze 14 pacientů došlo k progresi do jiného hematologického onemocnění, 6 z těchto pacientů již zemřelo (5 pacientů s AML, 1

pacientka s akutní megakaryocytární leukémií), 2 pacientky s progresí do akutní leukémie žily. U všech pacientů dohromady bylo pozorováno 12 typů cytogenetických změn: translokace, inserce, delece, monozomie, dicentrické chromozómy, izochromozómy, ring chromozóm, zmnožené oblasti, duplikace, trizomie, marker chromozómy a double minutes. Bylo nalezeno 93 % nebalancovaných a 7 % balancovaných abnormalit, což se shoduje se studií Martínez-Ramírez *et al.* (2004) i s daty uváděnými v literatuře (Haase, 2008; Haase *et al.*, 2007). V souboru se vyskytovalo 6 pacientů s monozomálním karyotypem, délka jejich přežívání se od délky přežívání pacientů, kteří neměli monozomální karyotyp, nelišilo, ale jednalo se opět o malý počet nemocných. Naše výsledky nelze tedy porovnat s pozorováními v literatuře (Breems *et al.*, 2008; Schanz *et al.*, 2011).

Nejčastěji byly v chromozómových aberacích u pacientů s CK zahrnuty tyto chromozómy: 5 (10,3 %), 7 (10,3 %), 18 (6,9 %), 20 (6,4 %), 16 (5,9 %), 17 (5,9 %), 1 (5,4 %), 21 (5,4 %), 10 (4,9 %). To koresponduje se studií Barouk-Simonet *et al.* (2005), kde jsou uváděny jako nejčastěji postižené chromozómy: 5, 17, 7, 20, 18. Stejně tak koresponduje fakt, že nejčastěji byl deletován chromozóm 5 nebo byl součástí translokace, a že pokud jsou přítomny změny chromozómu 17, téměř ve všech případech byla nalezena také delece dlouhého ramene chromozómu 5. Oproti studii byl v našem souboru chromozóm 5 postižen insercí, monozomií, trizomií a zmnožením oblasti 5p15.2. U jednoho pacienta byla pozorována amplifikace oblasti 11q23 (gen *MLL*), která byla přítomna u 20 % případů MDS (Barouk-Simonet *et al.*, 2005). Se studií Martínez-Ramírez *et al.* (2004) korespondují naše výsledky, co se týče nejčastěji postižených chromozómů, tj. chromozómů 5, 7 a 18. Ve studii byly však nejčastěji popsány jako monozomické, zatímco v našem souboru pacientů byl chromozóm 5 nejčastěji deletován, chromozómy 7 a 18 byly nejčastěji součástí translokací.

Nálezy reciprokových translokací odpovídají literárním údajům a zastupovaly v našem souboru 9 % všech translokací, ve studii Martínez-Ramírez *et al.* (2004) tvoří 8 % translokací.

Nejčastěji se u nemocných s CK vyskytovaly: translokace (30 %), dále monozomie (20 %), delece (18 %), 17 % změn byly trizomie a 5 % inserce. 3 % změn tvořily dicentrické chromozómy, 2 % marker chromozómy a 1 % bylo zastoupeno změnami: izochromozóm, zmnožení, double minutes, ring chromozóm, duplikace. Tyto nálezy

souhlasí s pozorováním Martínez-Ramírez *et al.* (2004), Barouk-Simonet *et al.* (2005) a Trost *et al.* (2006), které nejčastěji popisují přírůdnost translokací, monozomií a delecí.

Chromozóm 5 byl nejčastěji deletován, a to v oblasti 5q31 (52 %), do translokace byl zahrnut ve 24 %, inzerce byla pozorována v 10 %, v 5 % byla přítomna monozomie chromozómu. Barouk-Simonet *et al.* (2005) pozorovali ve své analýze MDS nemocných ve 41 % delecce, 55 % translokace, 3 % monozomie, inzerce chromozómu popsána nebyla. Dalším často aberovaným chromozómem byl chromozóm 7. Byl nejčastěji součástí translokací (38 %) a delecí (33 %) a byl postižen i monozomií (24 %), v jednom případě tvořil dicentrický chromozóm (5 %). Studie Barouk-Simonet *et al.* (2005) nejčastěji popisuje jako změny chromozómu 7 delecce (63 %), poté translokace (31 %) a monozomie (6 %), dicentrický chromozóm popsán nebyl. Co se týče četnosti změn, trochu lépe s daty z našeho souboru korespondují data ze studie Trost *et al.* (2006), kteří popisují monozomie a nebalancované translokace postihující chromozóm 7, oboje ve 44 % a delecce v 11 %, dicentrický chromozóm studie rovněž nepopisuje. Chromozóm 18 byl nejčastěji součástí translokace (36 %), poté monozomie (21 %) a inzerce (14 %) V 7 % byl chromozóm součástí dicentrického chromozómu, tvořil ring chromozóm, byl deletován, anebo byl nadbytečný (trizomie). Studie Barouk-Simonet *et al.* (2005) taktéž popisuje jako nejčastější změny pro chromozóm 18 translokace (55 %), následně monozomie (36 %). Inzerce, dicentrický chromozóm, delecce nebo trizomii nepopisuje, tyto změny nepopisuje ani studie Trost *et al.* (2006). Obě zmíněné studie však popisují přítomnost 1 ring chromozómu 18, který byl také v našem souboru pacientů jednou přítomen. Chromozóm 20 byl nejvíce derivován translokacemi (46 %) a delecí oblasti 20q12 (23 %), třetí nejčastější změnou byla trizomie (15 %). Studie Barouk-Simonet *et al.* (2005) popisuje také jako nejčastější změnu chromozómu 20 translokace (64 %), delecce (27 %), trizomii nepopisuje, v 9 % navíc popisuje přítomnost duplikace, která se v našem souboru nevyskytovala. Podobné změny pozorovali i Trost *et al.* (2006), translokace, monozomii a delecce, ovšem ne trizomii chromozómu nebo duplikace. Studie Barouk-Simonet *et al.* (2005) změny chromozómu 16 popisuje pouze v 1 případě (translokace), v našem souboru se vyskytovaly nejčastěji translokace (42 %), monozomie (33 %), inzerce (17 %) a delecce (8 %). Trost *et al.* (2006) naopak změny chromozómu 16 popisují, nejčastěji monozomie, se stejnou četností delecce a translokace. Častou chromozómovou změnou pozorovanou u nemocných s MDS byl izochromozóm dlouhých ramen chromozómu 17 (Malcovati *et Nimer*, 2008). V našem souboru však chromozóm 17 vstupoval nejčastěji do translokace (67 %), v 17 % byl

součástí dicentrického chromozómu a v 8 % byl součástí inserce a taktéž delece. Studie Barouk-Simonet *et al.* (2005) popisuje jako aberaci chromozómu 1 pouze translokace, Trost *et al.* (2006) popisují nejčastěji změny, kdy chromozóm 1 vstupuje do translokací a se stejnou četností ho postihuje trizomie, monozomie, inverze nebo duplikace. V našem souboru byl v 82 % chromozóm součástí translokace, v 9 % tvořil dicentrický chromozóm a v 9 % byl nadbytečný. Chromozóm 21 byl součástí translokace v 55 %, ve 27 % byl součástí trizomie a v 9 % byl součástí inserce a taktéž monozomie. Trost *et al.* (2006) popisují zmnožení části chromozómu, delece a pouze 1 translokaci. Chromozóm 10 nejčastěji postihla translokace (60 %), ve 20 % monozomie a v 10 % delece. Studie Barouk-Simonet *et al.* (2005) chromozóm 10 mezi často aberované chromozómy neřadí, studie Trost *et al.* (2006) popisuje u chromozómu 10 pouze translokace.

Výsledky naší analýzy ukázaly, že cytogenetika a molekulární cytogenetika jsou významným nástrojem studia získaných chromozómových změn i u nemocných s MDS. Dovolují potvrdit klinickou diagnózu a stratifikovat pacienty do prognostických podskupin. Nově navržená prognostická stratifikace autorů Schanze *et al.* (2012) založená na přesném určení chromozómových změn je dalším důkazem významu cytogenetiky u nemocných s MDS.

11 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá myelodysplastickým syndromem, jeho základní charakteristikou, klasifikací, chromozómovými a genovými změnami a léčbou. Detailněji pak popisuje klinické a cytogenetické nálezy souborů nemocných s 5q- syndromem a MDS s komplexním karyotypem. Všechna dostupná data z literatury i z praxe při studiu dvou zmíněných skupin potvrzují, že cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření jsou nezbytnou součástí diagnostiky, určování prognózy a volby léčby u nemocných s diagnózou myelodysplastického syndromu.

12 LITERATURA

Abdel-Wahab, O., Figueroa, M.E. (2012): Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012:56-64.

Adès, L., Fenaux, P. (2011): Immunomodulating drugs in myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:556-560.

Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F., Gray, J.W. (2003): Chromosome aberrations in solid tumors. *Nature Genetics* 34(4):369-376.

Barouk-Simonet, E., Soenen-Cornu, V., Roumier, C., Cosson, A., Lai, J.L. *et al.* (2005): Role of multiplex FISH in identifying chromosome involvement in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias with complex karyotypes: a report on 28 cases. *Cancer Genet and Cytogenet* 157(2):118-126.

Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B. *et al.* (2011): Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 364(26):2496-2506.

Boulwood, J., Lewis, S., Wainscoat, J.S. (1994). The 5q- syndrome. *Blood* 84(10):3253-3260.

Boulwood, J., Pellagatti, A., McKenzie, A.N.J., Wainscoat, J.S. (2010): Advances in the 5q- syndrome. *Blood* 116(26):5803-5811.

Breems, D.A., Van Putten, W.L.J., De Greef, G.E., Van Zelderen-Bhola, S.L., Gerssen-Schoorl, K.B.J. *et al.* (2008): Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: A better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 26(29):4791-4797.

Bulíková, A. (2000): Krvetvorba. In: Lexová, S., Bourková, L., Bulíková, A., Jarošová, M., Krahulcová, E.: *Hematologie pro zdravotní laboranty*, pp. 15-21, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Caligiuri, M.A. (2008): Human natural killer cells. *Blood* 112(3):461-469.

Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C. (1970): Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60(3):315-319.

Cazzola, M. (2008): Myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion (5q- syndrome). A clonal stem cell disorder characterized by defective ribosome biogenesis. *Haematologica* 93(7):967-972.

Chen, Y.H., Su, W.L., Liou, S.H. (2001): Benzene-induced myelodysplastic syndrome. *J Am Board Fam Pract* 14(1):71-74.

Chun, K., Hagemeijer, A., Iqbal, A., Slovak, M.L. (2010): Implementation of standardized international karyotype scoring practices is needed to provide uniform and systematic evaluation for patients with myelodysplastic syndrome using IPSS criteria: An International Working Group on MDS Cytogenetics Study. *Leuk Res* 34(2):160-165.

Cordoba, I., González-Porras, J.R., Nomdedeu, B., Luño, E., de Paz, R. *et al.* (2012): Better prognosis for patients with del(7q) than for patients with monosomy 7 in myelodysplastic syndrome. *Cancer* 118(1):127-133.

Čermák, J. (2010): Myelodysplastický syndrom - novinky v diagnostice a léčbě. *Postgraduální medicína* 06:712-719.

Čuřík, N., Burda, P., Vargová, K., Pospíšil, V., Krivjanská, M. *et al.* (2012): Nové technologie v medicíně pomáhají pacientům s MDS. *Medical Tribune* 6.

Davids, M.S., Steensma, D.P. (2010): The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biology & Therapy* 10(4):309-319.

Delforge, M. (2003): Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Hematol J* 4(5):303-309.

Doležel, J. (2011): Typy chromozómů, Cytotaxonomie a cytogenetika, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, říjen 2011.

Duong, V.H., Komrokji, R.S., List, A.F. (2012): Efficacy and safety of lenalidomide in patients with myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Ther Adv Hematol* 3(2):105-116.

Ebert, B.L. (2009): Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer. *Leukemia* 23(7):1252-1256.

Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P. *et al.* (2008): Identification of RPS14 as 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451(7176):335-339.

Fenaux, P., Kelaidi, C. (2006): Treatment of the 5q- syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:192-198.

Ford, C.E., Hamerton, J.L. (1956): A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol* 31(6):247-251.

Fuchs, O. (2012): Important genes in the pathogenesis of 5q- syndrome and their connection with ribosomal stress and the innate immune system pathway. *Leuk Res Treatment* 179402.

Garcia-Manero, G. (2010): Prognosis of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010:330-337.

Germing, U., Kobbe, G., Haas, R., Gattermann, N. (2013): Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International* 110(46):783-790.

Germing, U., Lauseker, B., Hildebrandt, A., Symeonidis, A., Cermak, J. *et al.* (2009): Survival, prognostic factors, and rates of leukemic transformation in a multicenter study of 303 untreated patients with MDS and del(5q). *Blood* 114(22):945.

Giagounidis, A., Mufti, G.J., Fenaux, P., Germing, U., List, A. (2014): Lenalidomide as a histone-modifying agent in patients with del(5q) myelodysplastic syndromes: linking mechanism of action to clinical outcomes. *Ann Hematol* 93(1):1-11.

Göhring, G., Giagounidis, A., Büsche, G., Hofmann, W., Kreipe, H.H. *et al.* (2011): Cytogenetic follow-up by karyotyping and fluorescence in situ hybridization: implications for monitoring patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q treated with lenalidomide. *Haematologica* 96(2):319-322.

Graubert, T., Walter, M.J. (2011): Genetics of myelodysplastic syndromes: New insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:543-549.

Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G. *et al.* (2012): Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120(12):2454-2465.

Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S. *et al.* (2010): Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 116(3):354-365.

Haase, D. (2008): Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 87(7):515-526.

Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T. *et al.* (2007): New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110(13):4385-4395.

Haferlach, C., Bacher, U., Schnittger, S., Alpermann, T., Zenger, M. *et al.* (2012): ETV6 rearrangements are recurrent in myeloid malignancies and are frequently associated with other genetic events. *Genes, Chromosomes & Cancer* 51(4):328-337.

ISCN (1978): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978). *Cytogenet Cell Genet* 21(6):309-404.

ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, L.G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid (eds); S. Karger, Basel 2013.

Jarošová, M. (2000a): Metody molekulární cytogenetiky. In: Lexová, S., Bourková, L., Buliková, A., Jarošová, M., Krahulcová, E.: Hematologie pro zdravotní laboranty, pp. 153-155, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Jarošová, M. (2000b): Metody molekulární cytogenetiky. In: Lexová, S., Bourková, L., Buliková, A., Jarošová, M., Krahulcová, E.: Hematologie pro zdravotní laboranty, pp. 156-159, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Jerez, A., Gondek, L.P., Jankowska, A.M., Makishima, H., Przychodzen, B. *et al.* (2012): Topography, clinical, and genomic correlations of 5q myeloid malignancies revisited. *J Clin Oncol* 30(12):1343-1349.

Joslin, J.M., Fernald, A.A., Tennant, T.T., Davis, E.M., Kogan, S.C. *et al.* (2007): Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* 110(2):719-726.

Juráňová, J., Faber, E. (2012): Popis jednotlivých druhů normálních buněk v periferní krvi a kostní dřeni. In: Faber, E. *et al.*: Základy hematologické diagnostiky, pp. 33-46, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Kantarjian, H., O'Brien, S., Ravandi, F., Cortes, J., Shan, J. *et al.* (2008): Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer* 113(6):1351-1361.

Kearney, L. (2006): Multiples-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenet Genome Res* 114(3-4):189-198.

Krahulcová, E. (2000): Myelodysplastický syndrom. In: Lexová, S., Bourková, L., Buliková, A., Jarošová, M., Krahulcová, E.: Hematologie pro zdravotní laboranty, pp. 115-118, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Krejčí, M., Šmardová, J., Adam, Z., Mayer, J. (2008): Myelodysplastický syndrom (MDS). In: Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J. *et al.*: Hematologie: Přehled maligních

hematologických nemocí, 2., doplněné a zcela přepracované vydání, pp. 19-27, Grada Publishing, Praha.

Kuglík, P., Oltová, A. (2008): Současné možnosti cytogenetických vyšetření u hematologických malignit. In: Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J. *et al.*: Hematologie: Přehled maligních hematologických nemocí, 2., doplněné a zcela přepracované vydání, pp. 349-358, Grada Publishing, Praha.

Liehr T., Starke H., Heller A., Kosyakova N., Mrasek K. *et al.* (2006): Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. *Cytogenet Genome Res* 114(3-4):240-244.

List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A. *et al.* (2006): Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 355(14):1456-1465.

Maassen, A., Strupp, C., Giagounidis, A., Kuendgen, A., Nacht kamp, K. *et al.* (2013): Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res* 37(1):64-70.

Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M.G., Pascutto, C. *et al.* (2007): Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 25(23):3503-3510.

Malcovati, L., Hellström-Lindberg, E., Bowen, D., Adès, L., Cermak, J. *et al.* (2013): Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 122(17):2943-2964.

Malcovati, L., Nimer, S.D. (2008): Myelodysplastic syndromes: Diagnosis and Staging. *Cancer Control* 15:Suppl:4-13.

Mallo, M., Cervera, J., Schanz, J., Such, E., García-Manero, G. *et al.* (2011) Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia* 25(1):110-120.

Martínez-Ramírez, A., Urioste, M., Alvarez, S., Vizmanos, J.L., Calasanz, M.J. *et al.* (2004): Cytogenetic profile of myelodysplastic syndromes with komplex karyotypem: an analysis using spectral karyotyping. *Cancer Genet and Cytogenet* 153(1):39-47.

Masuda, S. (2011): Point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 365(12):1154-1155.

Mayer, J., Starý, J. (2002): Myelodysplastický syndrom. In: Mayer, J., Starý, J., Adam, Z., Buliková, A., Cetkovský, P., Čermák, J. *et al.*: *Leukemie*, pp. 221-239, Grada Publishing, Praha.

Michalová, K. (1999a): Úvod. In: Úvod do lidské cytogenetiky, pp. 7-12, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Michalová, K. (1999b): Úvod. In: Stavba chromozómu a jeho funkce, pp. 21-29, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Michalová, K. (1999c): Cytogenetické vyšetření - příprava preparátů a metody barvení chromozomů. In: Úvod do lidské cytogenetiky, pp. 33-40, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Michalová, K. (1999d): Molekulární cytogenetika. In: Úvod do lidské cytogenetiky, pp. 50-70, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Mitelman, F. Cancer cytogenetics update 2005. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* March 2005.

Mufti, G.J., Bennett, J.M, Goasguen, J., Bain, B.J., Baumann, I. *et al.* (2008): Daignosis and classification of myelodysplastic syndrome: Interational working group on morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) konsensus proposals for the definitiv and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica* 93(11):1712-1717.

Nimer, S.D. (2008): Myelodysplastic syndromes. *Blood* 111(10):4841-4851.

- Nowell, P.C., Hungerford, D.A. (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 142:1497.
- Orazi, A., Czader, M.B. (2009): Myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol* 132(2):290-305.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G. *et al.* (2013): Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122(22):3616-3627.
- Pardue, M.L., Gall, J.G. (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64(2):600-604.
- Pecka, M. (1995a). Krvetvorba. In: Přehled laboratorní hematologie I.: Krvetvorba, Červená krevní řada, pp. 41-55, Galén, Praha.
- Pecka, M. (1995b). Červená vývojová řada. In: Přehled laboratorní hematologie I.: Krvetvorba, Červená krevní řada, pp. 83-108, Galén, Praha.
- Pecka, M. (2002a). Krvetvorba. In: Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba, pp. 13, Finidr, Český Těšín.
- Pecka, M. (2002b). Krvetvorba. In: Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba, pp. 68-154, Finidr, Český Těšín.
- Raza, A., Reeves, J.A., Feldman, E.J., Dewald, G.W., Bennett, J.M. *et al.* (2008): Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood* 111(1):86-93.
- Rowley, J.D. (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 243(5405):290-293.

Sandberg, A.A., Meloni-Ehrig, A.M. (2010): Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments. *Cancer Genet Cytogenet* 203(2):102-126.

Schanz, J., Steidel, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T. *et al.* (2011): Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J Clin Oncol* 29(15):1963-1970.

Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E. *et al.* (2012): New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic Syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 30(8):820-829.

Schlegerberger, B., Göhring, G., Thol, F., Heuser, M. (2012): Update on cytogenetic and molecular changes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma* 53(4):525-536.

Schoch, C., Haferlach, T., Bursch, S., Gerstner D., Schnittger, S. *et al.* (2002): Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. *Genes, Chromosomes & Cancer* 35(1):20-29.

Sekeres, M., List, A., Cuthbertson, D., Paquette, R., Ganetsky, R. *et al.* (2010): Phase I combination trial of lenalidomide and azacitidine in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 28(13):2253-2258.

Silverman, L.R., Mufti, G.J. (2005): Methylation inhibitor therapy in the treatment of myelodysplastic syndrome. *Nature Clinical Practice Oncology* 2:Suppl 1:S12-S23.

Sloand, E.M., Pfannes, L., Chen, G., Shah, S., Solomou, E.E. *et al.* (2007): CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* 109(6):2399-2405.

Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009a): Změny v počtu chromozomů a ve struktuře chromozomů. In: Genetika, pp. 118-143, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno.

Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009b): DNA a molekulární struktura chromozómů. In: Genetika, pp. 214-247, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno.

Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009b): Genetická podstata rakoviny. In: Genetika, pp. 665-687, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno.

Speicher, M., Ballard, S.G., Ward, D.C (1996): Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12(4):368-375.

Speicher, M.R., Carter, N.P. (2005): The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6(10):782-792.

Steensma, D.P. (2009): The changing classification of myelodysplastic syndromes: what's in a name? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:645-655.

Tatic, A., Jordan, C., Georgescu, O., Stanca, O., Vasilica, M. *et al.* (2013): The importance of the new prognostic scoring system for evaluating patients with low-risk myelodysplastic syndrome at diagnosis. *Romanian Review of Laboratory Medicine* 21(3):343-351.

Tjio, J.H., Levan, A. (1956): The chromosome number of man. *Hereditas* 42(1-2):1-6.

Tosi, S., Giudici, G., Rambaldi, A., Scherer, S.W., Bray-Ward, P. *et al.* (1999): Characterization of the human myeloid leukemia-derived cell line GF-D8 by multiplex fluorescence in situ hybridization, subtelomeric probes, and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 24(3):213-221.

Trost, D., Hildebrandt, B., Beier, M., Müller, N., Germing, U., Royer-Pokora, B. (2006): Molecular cytogenetic profilig of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet and Cytogenet* 165(1):51-63.

Uhrig, S., Schuffenhauer, S., Fauth, C., Wirtz A., Daumer-Haas, C. *et al.* (1999): Multiplex-HISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 65(2):448-462.

Vácha, M., Fellnerová, I., Bičík, V., Petrásek, R., Šimek, V. (2010): Funkce tělních tekutin. In: Srovnávací fyziologie živočichů, pp. 56-63, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno.

Valent, P., Hofmann, W.K., Büsche, G., Sotlar, K., Horny, H.P. *et al.* (2009): Meeting report: Vienna 2008 workshop of the German-Austrian working group for studying prognostic factors in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 88(7):607-611.

Vallespí, T., Imbert, M., Mecucci, C., Preudhomme, C., Fenaux, P. (1998): Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 83(3):258-275.

Van den Berghe, H., Cassiman, J.J., David, G., Fryns, J.P., Michaux, J.L., Sokal, G. (1974): Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* 251(5474):437-438.

Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning, R.D. (2002): The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100(7): 2292-2302.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J. *et al.* (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasm and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114(5): 937-951.

Veldman, T., Vignon, C., Schrock, E., Rowley, J.D., Ried, T. (1997): Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolor spectral karyotyping. *Nat Genet* 15(4):406-410.

Vondráková, J. (2010) : Myelodysplastický syndrom, diagnostika a léčba. *Interní Med* 12(11): 535-539.

Vondráková, J. (2012): Myelodysplastický syndrom. In: Faber, E. *et al.*: Základy hematologické diagnostiky, pp. 144-152, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Wall, M., Rayeroux, K.C., MacKinnon, R.N., Zordan, A., Campbell, L.J. (2012): ETV6 deletion is a common additional abnormality in patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and monosomy 7. *Haematologica* 97(12):1933-1936.

Wei, S., Rocha, K., Williams, A., Chen, X., Burnette, P.K. *et al.* (2007): Gene dosage of the cell cycle regulatory phosphatases Cdc25C and PP2A determines sensitivity to lenalidomide in del(5q) MDS. *Blood* 110(11):118.

Weise, A., Mrasek, K., Fickelscher, I., Claussen, U., Cheung, S.W. *et al.* (2008): Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: First within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem* 56(5):487-493.

Wiktor A., Rybicki, B.A., Piao, Z.S., Shurafa, M., Barthel, B. *et al.* (2000): Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes, Chromosomes & Cancer* 27(1):11-16.

Wong, A.K., Fang, B., Zhang, L., Guo, X., Lee, S., Schreck, R. (2008): Loss of the Y Chromosome. *Arch Pathol Lab Med* 132(8):1329-1332.

Zhang, L.J., Shin, E.S., Yu, Z.X., Li, S.B. (2007): Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders. *Chin Med J (Engl)* 120(22):2002-2005.

Arizona pain stem cell institute. Treatments. Stem cell therapy. arizonaPain.com [online]. © 2013 [cit. 2014-01-02].

Dostupné z: <http://arizonapain.com/stemcell/treatments/stem-cell-therapy/>

Abbott Molecular. FISH Chromosome Search. Abbottmolecular.com [online]. ©2014 [cit. 2014-01-02].

Dostupné z:

<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-d7s486-7q31-spectrumorange-cep-7-spectrumgreen-probe.html>

<http://www.abbottmolecular.com/us/products/oncolgy/hematology/vysis-egr1-fish-probe-kit.html>

<http://www.abbottmolecular.com/us/chromosome/8.html>

<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-d20s108-20q12-spectrumorange-probe.html>

Kreatech Diagnostics. Chromosome index. Kreatech.com [online]. ©2014 [cit. 2014-01-02].

Dostupné z:

<http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/mds-5q-5q31-5q33-dual-color.html>

<http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/mds-7q-7q227q36-se-7-tc.html>

<http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/mds-20q-ptprt-20q12-20q11.html>

Buněčná terapie. O kmenových buňkách. Co jsou kmenové buňky. Bunecnaterapie.cz [online]. Únor 22, 2013a [cit. 2014-01-02].

Dostupné z:

<http://www.bunecnaterapie.cz/bunecna-terapie/o-kmenovych-bunkach/co-jsou-kmenove-bunky/>

Buněčná terapie. Historie výzkumu kmenových buněk. První polovina 20. století. Bunecnaterapie.cz [online]. Únor 23, 2013b [cit. 2014-01-02].

Dostupné z:

<http://www.bunecnaterapie.cz/bunecna-terapie/historie-vyzkumu-kmenovych-bunek/>

Sdružení diagnóza MDS. Co je MDS. Léčebný postup. diagnoza-mds.cz [online]. © 2008 [cit. 2014-01-02].

Dostupné z:

<http://www.diagnoza-mds.cz/index.php?typ=DGA&showid=51>

Wikipedie. Hematopoéza. wikipedia.org[online]. Duben 23, 2012 [cit. 2014-01-02].

Dostupné z:

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoeza.png>

13 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

5q-sy	5q- syndrom
aCGH	array comparative genomic hybridization; array komparativní genomová hybridizace
ALL	acute lymphoblastic leukemia; akutní lymfoblastická leukémie
AmegL	acute megakaryocytic leukemia; akutní megakaryocytární leukémie
AML	acute myeloid leukemia; akutní myeloidní leukémie
<i>AML1</i>	Acute myeloid leukemia 1
<i>ASXL1</i>	Additional sex comb like 1
BAC	bacterial arteficial chromosome; umělý bakteriální chromozóm
<i>BFU-E</i>	<i>Burst Forming Unit - Erythroid</i> ; velmi časná fáze vývoje červené krvinky
BM médium	bone marrow medium; médium pro kostní dřeň
bp	base pair; páry bazí
CCD kamera	charge-coupled device camera; kamera se speciální technologií snímání obrazu
CD	cluster of differentiation; diferenciační antigen
<i>CDC25C</i>	Cell division cycle 25 C
CDR	common deleted region; deletovaná oblast
CEP	označení pro centromerickou sondu
<i>CFU-Baso</i>	<i>Colony Forming Unit - Basophile</i> ; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají bazofily
<i>CFU-E</i>	<i>Colony Forming Unit - Erythroid</i> ; progenitorová kmenová buňka, z níž vzniká červená krevní řada
<i>CFU-Eos</i>	<i>Colony Forming Unit - Eosinophil</i> ; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají eozinofily
<i>CFU-G</i>	<i>Colony Forming Unit - Granulocyte</i> ; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají granulocyty
<i>CFU-GEMM</i>	<i>Colony Forming Unit, G - granulocyte, E - erythrocyte, M - macrophage, M - megakaryocyte</i>); progenitorové kmenové buňky, z nichž vznikají buňky myelopoézy

<i>CFU-GM</i>	<i>Colony Forming Unit, G – granulocyte, M – macrophage</i> ; bipotentní kmenová buňka pro makrofágovou a granulocytární řadu
<i>CFU-M</i>	<i>Colony Forming Unit - Monocyte</i> ; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají buňky monocytární řady
<i>CFU-Meg</i>	<i>Colony Forming Unit - Megakaryocyte</i> ; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají buňky megakaryocytové řady
<i>CFU-N</i>	<i>Colony Forming Unit - Neutrophile</i> ; progenitorová kmenová buňka, z níž vznikají neutrofilny
<i>CFU-S</i>	<i>Colony Forming Unit - Spleen</i> ; dřívější označení pro pluripotentní kmenovou buňku/jednotku vytvářející kolonie ve slezině
CK	complex karyotype; komplexní karyotyp
CML	chronic myeloid leukemia; chronická myeloidní leukémie
CMML	chronic myelomonocytic leukemia; chronická myelomonocytární leukémie
CSF	colony stimulating factor; kolonie stimulující faktor
<i>CSF1R</i>	Colony stimulating factor 1 receptor
<i>CTNNA1</i>	Catenin (cadherin associated protein), alpha 1
cut off	hraniční hodnota detekce sondy
<i>CUX1</i>	Cut-like homeobox 1
CyA	cyclosporin A; cyklosporin A
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
dg.	diagnóza
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
EBSS	Earle's balanced salt solution; Earlův oplachovací roztok
<i>EGR1</i>	Epidermal growth receptor 1; epidermální růstový faktor 1
EPO	erythropoietin; erytropoetin
ESP	erythropoiesis stimulating protein; erytropoézu stimulující protein
<i>ETV6</i>	Ets variant 6
<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste homolog 2
FAB klasifikace	French-American-British classification; Francouzsko-americko-britská klasifikace
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; granulocyty a makrofágy stimulující faktory
<i>HSCs</i>	<i>Hematopoietic Stem Cells</i> ; hematopoetické kmenové buňky
<i>IDH1</i>	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)
<i>IDH2</i>	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+)
<i>in situ</i>	„na místě“
<i>in vitro</i>	„ve zkumavce“
IPSS	International Prognostic Scoring System; Mezinárodní prognostický skórovací systém
ISCN	An international system for human cytogenetic nomenclature, Mezinárodní nomenklatura lidských chromozómů
K	kultivace
K24col	kultivace 24 hodin
kb	kilobase; kilobáze
KB	kmenová buňka
KD	kostní dřeň
<i>L(3)MBTL1</i>	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1
LSI	označení pro lokusově specifickou sondu
<i>MAPRE1</i>	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1
mBAND	multicolor band; mnohobarevné pruhování
MDS	myelodysplastic syndrome; myelodysplastický syndrom
MDS-u	myelodysplastic syndrome-unclassified; myelodysplastický syndrom-neklasifikovatelný
mFISH	multicolor FISH; mnohobarevná FISH
<i>miR-145</i>	MicroRNA-145
<i>miR-146a</i>	MicroRNA-146a
MK	monosomal karyotype; monozomální karyotyp
<i>MLL</i>	Mixed lineage leukemia
mRNA	messenger RNA; mediátorová RNA
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
ND	note done; vyšetření neprovedeno
NK-buňky	natural killer buňky; druh lymfocytu
NP40	nonyl phenoxypolyethoxylethanol
NPM1	nucleolar phosphoprotein B23

OS	overall survival; celkové přežití
p	krátké rameno chromozómu
PCR	polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce
<i>PDGFRA</i>	Platelet-derived growth factor receptor- α
<i>PDGFRB</i>	Platelet-derived growth factor receptor- β
PK	periferní krev
p-MDS	primary MDS; primární MDS
<i>PP2A</i>	Protein phosphatase 2a
PRC2	Polycomb repressive komplex 2
<i>PTPRT</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, T
q	dlouhé rameno chromozómu
RA	refractory anemia; refrakterní anémie
RAEB	refractory anemia with excess of blasts; refrakterní anémie s nadbytkem blastů
RAEB-T	refractory anemia with excess of blasts in transformation; refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci
RARS	refractory anemia with ring sideroblasts; refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RBC	red blood cell; červená krvinka
RC	refractory cytopenia; refrakterní cytopenie
RCMD	refractory cytopenia with multilineage dysplasia; refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií
RCUD	refractory cytopenia with unilineage dysplasia; Refrakterní anémie s unilineární dysplazií
R-IPSS	revised international prognostic scoring systém; revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém
RN	refractory neutropenia; refrakterní neutropenie
RNA	ribonucleic acid; ribonukleová kyselina
rpm	rounds per minute; otáčky za minutu
RPMI médium	roswell Park Memorial Institute 1640 medium; médium pro kultivaci lidských leukemických buněk v suspenzi
<i>RPS14</i>	Ribosomal protein S14
RT	refractory thrombocytopenia; refrakterní trombocytopenie
RT	room temperature; pokojová teplota

<i>RUNX1</i>	Runt-related transcription factor
SA	spectrum aqua; modré spektrum
SG	spectrum green; zelené spektrum
SNP	single nucleotide polymorphism; jednonukleotidový polymorfismus
SO	spectrum orange; oranžové spektrum
SOP	standardní operační postup
<i>SPARC</i>	Secreted protein, acidic, cystein-rich
SSC	saline-sodium citrate buffer; citrátový solný pufr
SSCT	saline-sodium citrate buffer + tween; citrátový solný pufr + tween
<i>TET2</i>	Tet methylcytosine dioxygenase 2
t-MDS	therapy-related MDS; sekundární MDS
<i>TP53</i>	tumor protein p53
WCP	označení pro celochromozómovou sondu
WHO	World Health Organization; Světová zdravotnická organizace