

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Cytogenetika a molekulární cytogenetika  
myelodysplastického syndromu (MDS) - diagnostický  
a prognostický význam.**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Petra Lužná</b>
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Molekulární a buněčná biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.</b>
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

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

V Olomouci dne 20. 4. 2012

#### Poděkování:

Na prvním místě děkuji paní prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc. za vedení celé bakalářské práce a za příležitost pracovat na špičkovém pracovišti, jakým Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice Olomouc je. Dále děkuji RNDr. Mileně Holzerové, Mgr. Silvii Reptové, Mgr. Radce Nedomové, 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 cenné rady a připomínky. V neposlední řadě děkuji své rodině za vynikající zázemí, které mi po celou dobu studia poskytla.

## **OBSAH**

SOUHRN.....	5
SUMMARY .....	6
1 ÚVOD.....	7
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	8
2.1 Krvetvorba (hematopoéza).....	8
2.2 Cytogenetika .....	17
2.3 Molekulární cytogenetika .....	20
2.4 Myelodysplastický syndrom (MDS).....	23
3 CÍL PRÁCE.....	33
4 MATERIÁL A METODIKA .....	34
4.1 Zpracování buněk KD pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření... .....	34
4.2 Cytogenetické vyšetření.....	37
4.3 Molekulárně cytogenetické vyšetření FISH s lokusově specifickými (LSI) a centromerickými (CEP) sondami .....	38
5 VÝSLEDKY.....	45
5.1 Klasická cytogenetika .....	45
5.2 Molekulární cytogenetika - FISH .....	48
6 DISKUZE .....	52
7 ZÁVĚR.....	53
8 LITERATURA .....	54
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	59

## SOUHRN

Bakalářská práce se zabývá cytogenetickými a molekulárně cytogenetickými změnami, které se vyskytují u jednoho z klonálních onemocnění krvetvorby - myelodysplastického syndromu. Zároveň věnuje pozornost těmto změnám v souvislosti s diagnózou a prognózou samotného onemocnění.

V první části práce jsou shrnuty základní poznatky a informace vyplývající z dostupné literatury. Druhá část je zaměřena na praktickou stránku - popis práce s biologickým materiálem (kostní dřeň), který je pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření nezbytný. V závěru jsou uvedeny výsledky cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření pacientů s myelodysplastickým syndromem nebo s podezřením na něj.

## **SUMMARY**

This bachelor thesis deals with cytogenetic and molecular cytogenetic changes, which are found in one of the clonal diseases of haemopoiesis - myelodysplastic syndrome. It is also concerned with these changes in connection with diagnosis and prognosis of the disease.

The first section of the thesis contains a summary of basic principles and general information resulting from a review of available literature. The second part focuses on practical aspects, specifically a description of work with biological material (i.e., bone marrow) necessary for cytogenetic and molecular cytogenetic examination. The final section of the thesis displays the results of cytogenetic and molecular cytogenetic examination of patients with, or suspected of having, myelodysplastic syndrome.

## 1 ÚVOD

V dnešní uspěchané době plné moderních přístrojů, technologií, v době, kdy dochází k obrovskému rozvoji, jsou na nás kladeny čím dál větší nároky. Jsme vystaveni vlivům, které na nás zanechávají spoustu negativních následků. V době, kdy kvantita mnohokrát převažuje nad kvalitou, nám nezbyvá někdy nic jiného, než dýchat vzduch plný jedovatých zplodin a jiných nežádoucích látek, které ne ojediněle přesahují povolené limity. Jíme potraviny ošetřené konzervanty, potraviny se zbytkem herbicidů nebo plísní. A nakonec, ale ne na posledním místě, jsme vystaveni obrovskému stresu, ať už v zaměstnání, ve škole či doma. Všechny tyto faktory působí negativně na naše zdraví. Při jejich spolupůsobení na nás se jejich škodlivé účinky znásobují. Není tedy divu, že jsou lidé čím dál více sužováni spoustou nemocí. Některé z nich jsou již v dnešní době považovány za běžné (př. alergie, nedostatek vitamínů nebo astma). Hemato-onkologická onemocnění reprezentují soubor jak nenádorových, tak zejména nádorových chorob krvine tvorby. Incidence hematologických maligních onemocnění je dle WHO klasifikace kolem 10 % všech maligních onemocnění (Vardiman *et al.*, 2002).

Všechny nádory, včetně těch hematologických, jsou definovány jako genetické onemocnění, jež je následkem kumulace řady genetických změn (Snustad *et Simmons*, 2009b). Jedná se jak o mutace, které jsou určitelné metodami molekulární genetiky, tak o změny chromozómů určitelné metodami klasické cytogenetiky a molekulární cytogenetiky. Z toho důvodu jsou tyto metody součástí diagnostiky, prognostické stratifikace a léčby hemato-onkologických onemocnění (Kuglík *et Oltová*, 2008).

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Krvetvorba (hematopoéza)**

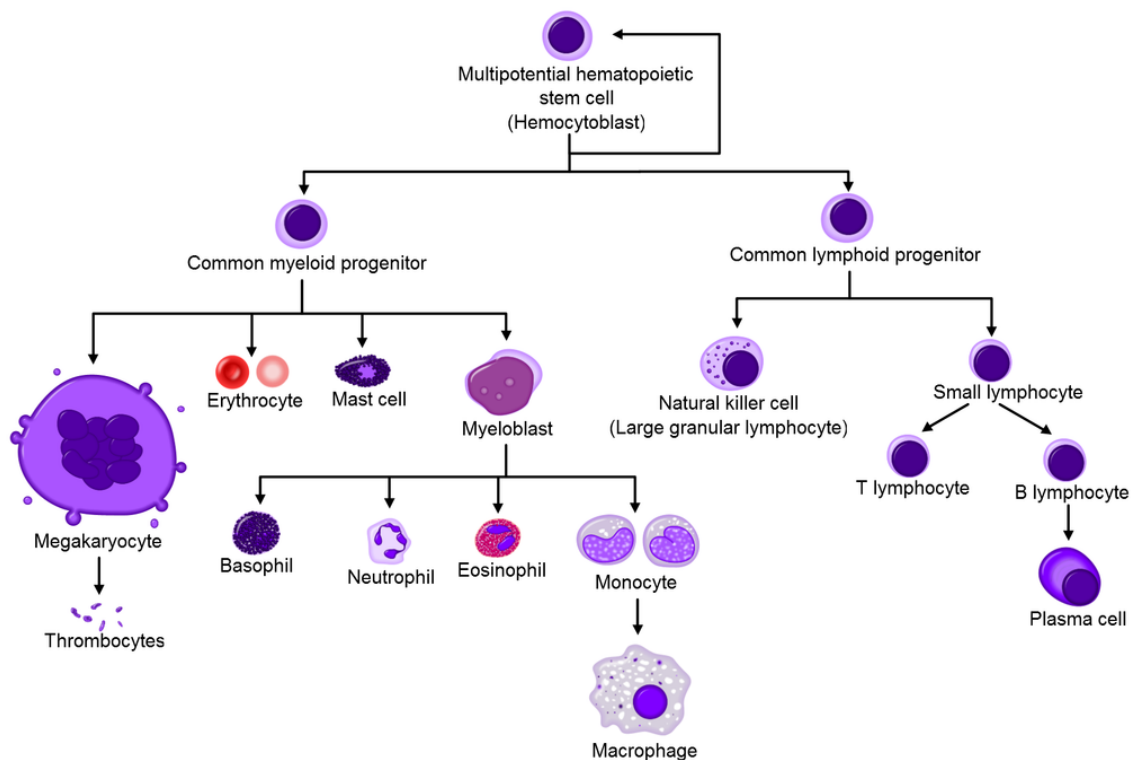
Krvetvorba je složitý a významný proces, který probíhá celý život, kdy v krvetvorných orgánech dochází k produkci krevních elementů. O tom, že jde o velice komplikovaný a komplexně řízený sled dějů, sám o sobě vypovídá fakt, že i přes to, že žijeme ve 21. století, není tento proces zcela dobře prozkoumán. Krvetvorbu lze rozdělit na 2 odlišné fáze. První fáze je prenatalní (předporodní), kdy u embrya a později u plodu dochází k tvorbě základů tkání a orgánů, které se nadále až do porodu vyvíjejí. Následuje fáze postnatalní (poporodní), která trvá až do smrti. Jednotlivá období se od sebe liší místem krvetvorby a jiným způsobem tvorby krvinek (Pecka, 2002).

K zahájení prenatalní krvetvorby dochází již mezi 14. a 19. dnem nitroděložního života (IUD) a dělí se na 3 období: mezoblastové, hepatolineální a medulární. Prvotně dochází k tvorbě krevních ostrůvků ve žloutkovém vaku, tedy mimo vlastní plod (extraembryonálně). Ve stěně žloutkového vaku vzniká síť primitivních buněk, které dávají vzniknout krevním ostrůvkům. Kromě žloutkového vaku dochází taktéž k tvorbě cévního systému v embryu a ve 4. týdnu IUD dochází k propojení obou systémů. Tehdy se žloutkový vak stává zdrojem prvních krevních buněk, které budou cirkulovat v krevním oběhu embrya. Po jeho vzniku do něj vstupují mateřské buňky červených krvinek (primitivní velké erytroblasty). Období trvá asi 6 týdnů (od 3. do 10. týdne IUD). Zhruba v polovině tohoto období dochází k tvorbě základu brzlíku (thymu), jež je osídlován kmenovými buňkami krvetvorby, z nichž se krok za krokem vyvíjejí mateřské buňky lymfocytů. Jelikož se jednotlivé fáze vývoje mezi sebou prolínají, již po 6. týdnu začíná fáze hepatolineální, kdy dochází v mezenchymu mezi jaterními buňkami k tvorbě krvetvorných buněk, které vznikají z buněk kmenových, jež byly rozneseny po celém zárodku. Tvoří se jak normoblasty, které vyzárají v erytrocyty, tak i mateřské buňky bílých krvinek a krevních destiček. Později se začne na krvetvorbě podílet taktéž slezina, jejíž základy se formují od 12. týdne IUD. Hepatolineální období trvá až do porodu. Játra jsou stěžejním místem produkce krvinek do poloviny zárodečného života. Posledním prenatalním obdobím je období medulární (dřeňové). Začíná od 20. týdne IUD. Dochází k medulární krvetvorbě, to znamená, že se krvinky začínají tvořit i v kostní dřeni. A to všechny jejich druhy. Čím více je do krvetvorby zapojena kostní dřeň, tím méně se do



tohoto procesu zapojuje krvetvorba mimodřeňová (extramedulární), která ve 2.-3. týdnu po narození zaniká úplně. Druhou fází je fáze postnatální. Všechny krvinky, jež cirkulují v krvi, jsou za normálních fyziologických podmínek tvořeny v kostní dřeni. Avšak některé lymfocyty vznikají také v lymfatické tkáni, a to v lymfatických uzlinách, ve slezině a brzlíku, dojde-li ke zvýšeným nárokům na kostní dřeň, a to například při krvácení nebo nemoci krvetvorby, může docházet k produkci krevních elementů třeba ve slezině nebo i v játrech (Pecka, 2002).

Základním mechanismem hematopoézy je dělení buněk v hematopoetických orgánech, které jsou následně transportovány do periferní krve. Tyto zralé buňky vznikají díky proliferaci a maturaci mateřských buněk a od nich se odlišují svojí morfologií, funkcí a strukturou. Krvetvorbu rozlišujeme na 2 typy: myelopoézu (granulomonocytovou, červenou, megakaryocytovou řadu) a lymfopoézu, tzn., že kmenová pluripotentní buňka se může vydat dvěma různými směry, jak také ukazuje Obr. 1. (Pecka, 2002).



Obr. 1 Zjednodušené schéma hematopoézy (Wikipedia, 2012)

## **Kostní dřev (KD)**

Kostní dřev je krvetvorný orgán, který je vysoce organizován. Jedná se o gelovitou tkáň, která v kosti vyplňuje tzv. dřevnou dutinu. Obsahuje krvetvornou tkáň, podpurnou tkáň (vazivo), cévy, nervová vlákna, lymfatickou a tukovou tkáň. Krvetvorná tkáň, která tvoří významnou část kostní dřev, je tvořena kmenovými buňkami, progenitorovými buňkami jednotlivých řad, prekuzory jednotlivých řad a zralými krvinkami, jež plynule přechází do obvodové krve (Pecka, 1995a). U dospělého zdravého člověka se KD vyskytuje v tělech obratlů, pánvi, lebce, žebrech, sternu, klíčcích, lopatkách a v určité části proximálních humerů a femurů (Pecka, 2002).

Kostní dřev se dělí na aktivní a inaktivní (tukovou) kostní dřev. V dospělém věku se nejlépe zachovaná KD nachází v obratlích a hrudní kosti. Přestup zralých krvinek z parenchymu kostní dřev do obvodové krve se uskutečňuje skrze tenkou vrstvu endotelových buněk sinusoid. Způsob přechodu jednotlivých krevních elementů se od sebe liší. Červené krvinky díky schopnosti měnit tvar a díky jejich pružnosti snadno prostupují mezi endotelovými buňkami do drobných cév (kapilár), a tímto způsobem se dostávají do nitra cévy. Pro bílé krvinky je typická tzv. diapedéza, totiž průchod do cév aktivním pohybem, kdy krvinka vytváří výběžek cytoplazmy a ten vniká mezi endotelové buňky a za ním se protáhne do cévy i jádro. Leukocyty jsou dokonce schopny měnit tvar jádra v závislosti na formě celé krvinky po dobu jejího pohybu. Dozrávající krevní destičky se ještě v podobě megakaryocytů díky výběžkům protahují mezi endotelovými buňkami do nitra cév, kde protékající krev uvolňuje a odplavuje trombocyty (Pecka, 2002).

## **Myelopoéza**

Myelopoéza zahrnuje myeloidní krevní buňky, buňky eryteroidní, granulocytární a megakaryocytární linie. Vznikají z mateřské progenitorové buňky *CFU-GEMM* (*Colony Forming Unit; G - granulocyte, E - erythrocyte, M - macrophage, M - megakaryocyte*). Celý proces buněčné diferenciaci za vzniku zralých elementů krvetvorby je řízen řadou faktorů, jako jsou cytokiny, interleukiny nebo interferony. V průběhu diferenciaci a zrání dochází také k řadě morfologických změn v buňce (ztráta bazofilie cytoplazmy, u myeloidních buněk objevení se specifických granul). Zralé elementy červené krevní řady jsou bezjaderné (Pecka, 1995a).

## **Lymfopoéza**

Při lymfopoéze jsou produkovány lymfoidní krevní buňky, které představují různé typy lymfocytů, plazmocyty a další buňky, které jsou prvky podpůrných tkání (Pecka, 2002).

## **Vývoj krevních elementů**

### Kmenové buňky

Kmenové buňky byly poprvé popsány roku 1909 (Pecka, 1995a). Kmenová buňka je taková, ze které vzniká buněčný klon. Jejich morfologie není nějak nápadná, vypadají jako malý či větší lymfocyt. Struktura jaderného chromatinu je jemná. Vyskytují se u nich jadérka, velký nukleo/cytoplazmatický poměr a cytoplazma bez granule (Buliková, 2000). Nachází se v kostní dřeni. Na přibližně 1000 jaderných buněk připadá 1 buňka kmenová. Taktéž se v malém množství vyskytují ve slezině, játrech a lymfatických uzlinách (Pecka, 1995a). Na jejich povrchu se vyskytuje antigen CD34 (Pecka, 2002).

Všechny krvinky pochází ze stejné výchozí buňky, jíž je buňka mezenchymu. Ta se diferencuje v buňku retikulární, která se stává základem celého systému, jenž slouží pro tvorbu krvinek. Retikulární buňka se nadále mění v hemocytoblast, který se v zárodečném období stává buňkou kmenovou (Muirhead *et al.*, 1995, cit. Pecka, 2002). Poté dochází k vývoji buněk kmenových přes buňky progenitorové až k buňkám diferencovaným, jejichž úkolem je transport kyslíku (erytrocyty), srážení krve (trombocyty) a obranyschopnost organismu (lymfocyty, monocyty, granulocyty) (Pecka, 2002).

Kostní dřeň patří mezi tkáň, kde dochází během života organismu k obnově již opotřebovaných buněk. Pro realizaci tohoto děje je využíváno stálé proliferační aktivity nediferencovaných kmenových buněk. Rozsáhlý komplex procesů, který se podílí na obnově buněk kostní dřene, závisí tedy na početně malé populaci hematopoetických kmenových buněk (*Hematopoietic Stem Cells - HSCs*). Typická a nutná pro jejich funkci je proto schopnost sebeobnovy a schopnost dát vzniknout všem dalším typům buněk krvetvorby. Při mitóze kmenové buňky většinou dochází k tomu, že jedna nově vzniklá dceřinná buňka se diferencuje dále, naopak druhá dceřinná buňka zůstává buňkou kmenovou. Tímto způsobem dochází k zachování „poolu“ kmenových buněk. V současné

době je za buňku, která je schopna vyvíjet se v kteroukoli buňku organismu, považována tzv. totipotentní kmenová buňka. Pluripotentní kmenová buňka označovaná jako *CFU-S* (*Colony Forming Unit - Spleen*) je často používána jako synonymum totipotentní kmenové buňky (Pecka, 2002).

### Pluripotentní kmenová buňka

Všechny krevní elementy, jež se vyskytují v periferní krvi po narození člověka až do jeho smrti, mají společnou jednu jedinou hematopoetickou pluripotentní kmenovou buňku. Pluripotentní kmenová buňka je mononukleární buňka o velikosti 7-10  $\mu\text{m}$ , její chromatin je jemně rozptýlen, obsahuje 1-3 jadérka. Od diferencovaných progenitorových buněk se liší přítomností většího množství antigenů. Prvním stádiem buněk, které vznikají po prvních pár děleních pluripotentní kmenové buňky, jsou krvetvorné buňky *LTC-IC* (*Long Term Culture - Initiating Cells*), jež jsou schopny dát vzniknout dlouhodobé kultuře (Pecka, 2002). Následně, po několika dalších děleních a diferenciaci, vznikají buňky progenitorové (unipotentní) (Pecka, 2002; Vácha *et al.*, 2010). Tyto buňky jsou sice způsobilé k další proliferaci, avšak jejich vývoj je předurčen a směřuje k určitému typu krevní buňky. Posledním stupněm jsou nejdříve nezralé, a poté již zralé krvinky či destičky (Vácha *et al.*, 2010).

### Progenitorové kmenové buňky

Progenitorové buňky se značně liší od buněk pluripotentních (Pecka, 2002). Jejich vývoj je předurčen k určitému typu krevní buňky (Pecka, 1995a). Přesto jsou schopné diferencovat se do jedné nebo více krevních řad. Jsou neschopné sebeobnovy a taktéž většina z nich prochází buněčným cyklem. Dalším typickým znakem je jejich citlivost na růstové faktory (Pecka, 2002).

Do skupiny progenitorových buněk patří: *CFU-GEMM* (*Colony Forming Unit - Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte*) - dávají vzniknout buňkám myelopoézy, *CFU-GM* (*Colony Forming Unit - Granulocyte Macrophage*) - skupina bipotentních buněk, jež dává vzniknout makrofágům a granulocytům, *BFU-E* (*Burst Forming Unit - Erythroid*) a *CFU-E* (*Colony Forming Unit - Erythroid*) - buňky pro vznik

červené krevní řady, *CFU-G (Colony Forming Unit - Granulocyte)* - buňky pro vznik granulocytární řady, *CFU-Eos (Colony Forming Unit - Eosinophil)* - pro buňky eozinofilů, *CFU-M (Colony Forming Unit - Monocyte)* - buňky pro vznik monocytární řady, *CFU-Meg (Colony Forming Unit - Megakaryocyte)* - pro buňky megakaryocytové řady (Pecka, 2002).

### Identifikace pluripotentních a progenitorových buněk

Schopnost identifikovat pluripotentní a progenitorové buňky je důležitá pro stanovení jejich počtu v krvetvorné tkáni. Problémem je, že pluripotentní a progenitorové buňky se pro svoji podobnost s lymfocyty morfologicky rozpoznat nedají. Je možno je identifikovat díky přítomnosti antigenu CD34 (Pecka, 2002).

### **Regulace hematopoézy**

Krvetvorba je vysoce regulovaný proces, který je ovlivňován tak, aby mohly buňky vyskytující se v periferní krvi důsledně vykonávat svoji funkci. Tzv. hemopoetické mikroprostředí kostní dřeně a růstové faktory jsou právě proto nepostradatelnými regulátory krvetvorby. Udržují ustálený počet efektorových buněk v periferní krvi, popřípadě jsou schopny jejich množství dle požadavků organismu zvyšovat (Buliková, 2000).

### **Červená vývojová řada**

#### Erytropoéza

Erytropoéza je biologický děj, při kterém se tvoří a vyvíjí červené krevní elementy. Jedná se o erytroidní vývojovou řadu. Základním mechanismem je tvorba jaderných prekurzorů červených krvinek, které vznikají z kmenových buněk. Následně je jádro vypuzeno nebo fragmentováno, přičemž dochází ke vzniku tzv. retikulocytů. Z nich se zráním v průběhu 2 dnů vytváří erytrocyty. Za tvorbu červených krvinek je zodpovědný hormon, který je produkován převážně ledvinami - erythropoetin (Pecka, 2002).

## Erytrocyt

Erytrocyty jsou bezjaderné buňky bikonkávního tvaru, zaujímají nejpočetnější skupinu krvinek (Pecka, 1995b). Jejich průměr je 7,4  $\mu\text{m}$ , výška 2,1  $\mu\text{m}$  (Vácha *et al.*, 2010). Tvoří 40-45 % objemu krve (Pecka, 1995b). V důsledku nepřítomnosti jádra i jiných buněčných organel má červená krvinka snížen svůj metabolismus, jelikož v ní dochází pouze k některým enzymatickým reakcím (Pecka, 1995b; Vácha *et al.*, 2010). Obsahuje velké množství červeného krevního barviva hemoglobinu. Počet erytrocytů se u mužů pohybuje okolo  $5 \times 10^{12}/\text{l}$  krve, u žen v průměru  $4,5 \times 10^{12}/\text{l}$  krve (Vácha *et al.*, 2010).

## Normoblastová vývojová řada

Erytropoetin působí na určité typy kmenových buněk, tzv. *BFU-E* a *CFU-E*, kterým se říká erytroidní kmenové buňky. Jejich množství není tak velké, jako konečné množství nově vzniklých erytrocytů, protože tyto buňky během svého vývoje proliferují. Nejdříve dochází k produkci prekurzorů z progenitorových kmenových buněk. Mezi ně patří proerytoblast, z něj se vytváří bazofilní normoblast, dále polychromní normoblast, ortochromní normoblast, retikulocyt a na závěr konečné stádium erytrocyt. Během tohoto vývoje dochází k celé řadě změn, jak morfologických, tak biochemických. Retikulocyt je považován za mladý erytrocyt. Jeho velikost je 7-9  $\mu\text{m}$ . Je ještě stále schopen produkovat hemoglobin, i když došlo k vypuzení jádra, jelikož v cytoplazmě ještě nadále zůstávají zbytky některých původních organel. Konečným stádiem červené krevní řady je bezjaderná krvinka erytrocyt, také nazýván normocyt (Pecka, 2002).

## **Bílá krevní řada**

### Tvorba leukocytů (leukopoéza) - granulomonocytární vývojová řada

Jde o vývojovou řadu, kdy dochází k tvorbě granulocytů a monocytů. Jejich mateřskou buňkou je progenitorová buňka *CFU-GM*, která dává vzniknout čtyřem vývojovým liniím: neutrofilní, eozinofilní, bazofilní a monocytové. První buňkou granulocytární řady je myeloblast, následně promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, nesegmentovaný granulocyt, a dále segmentovaný granulocyt, jež může být neutrofilní,

eosinofilní či bazofilní. První buňkou vývojové linie monocytů (makrofágů) je monoblast, dále promonocyt a monocyt, jež je stádiem posledním (Pecka, 2002).

### Tvorba lymfocytů (lymfopoéza)

Lymfocyty jsou buňky, které jsou nezbytnou součástí imunitního systému. Jejich úkolem je produkce protilátek, interakce mezi buňkami, nebo také buněčná imunita. 15 % lymfocytů přežívá krátce, 3-4 dny. Naopak velká část lymfocytů plní svoji funkci 4 roky, některé přežívají až 10 let (Buliková, 2000). Největší množství lymfatické tkáně se vyskytuje u člověka ve 12. roku života, u dospělého tvoří už jen přibližně 1 % tělesné hmotnosti (Pecka, 2002). Lymfopoéza se odehrává v primárních lymfopoetických orgánech - v kostní dřeni a thymu, kde lymfocyty vznikají z mateřských lymfoidních kmenových buněk (Buliková, 2000). B-lymfocyty, které vznikají v kostní dřeni a T-lymfocyty vznikající v thymu, jsou pomocí periferní krve transportovány do sekundárních lymfopoetických orgánů, kde se stýkají s antigeny (Pecka, 2002). Sekundární lymfatické orgány jsou lymfatické uzliny, slezina, lymfatické tkáně sliznic, tonzily (Buliková, 2000; Pecka, 2002).

Množství lymfocytů v periferní krvi je doplňováno díky kostní dřeni, kdy není třeba antigenní stimulace, naopak lymfocyty ze sekundárních lymfatických orgánů jsou lymfocyty závislé na antigenní stimulaci. Aby bylo působení některých lymfocytů (0,01 %) efektivní, musí dojít k jejich stimulaci, jelikož lymfocyty vyskytující se v periferní krvi se nacházejí v klidovém stavu (Pecka, 2002).

### B-lymfocyty

B-lymfocyty dávají vzniknout paměťovým a plazmatickým buňkám. Děje se tak po setkání s antigenem. Plazmocyty (plazmatické buňky), které vznikají po diferenciaci B-lymfocytů, produkují protilátky. Jednotlivá stádia po aktivaci antigenem jsou plazmoblast, proplazmocyt a plazmocyt, který hraje důležitou roli v humorální imunitě (Pecka, 2002).

## T-lymfocyty

T-lymfocyty jsou lymfocyty, k jejichž diferenciaci dochází v thymu. Jejich úkolem je tvorba buňkami zprostředkované imunity, což se děje díky rozlišovací schopnosti a schopnosti aktivních T-lymfocytů korigovat imunitní odpověď pomocí interakcí a signálů, které jsou umožněny díky přítomnosti receptorů (Pecka, 2002).

## NK-buňky

NK-buňky jsou lymfocyty, jejichž druh (B či T) nemůže být identifikován. Jejich hlavním úkolem je cytotoxické působení na určité typy buněk: na buňky infikované virem, nádorové buňky či buňky, na jejichž povrchu se vyskytuje xenoantigen. Detekují buňky s nedospělými a neúplnými povrchovými bílkovinami a ničí je (Pecka, 2002). Lze je určit pomocí povrchových znaků. Tyto buňky jsou pozitivní pro znak CD56 a negativní pro znak CD3 (Caligiuri, 2008).

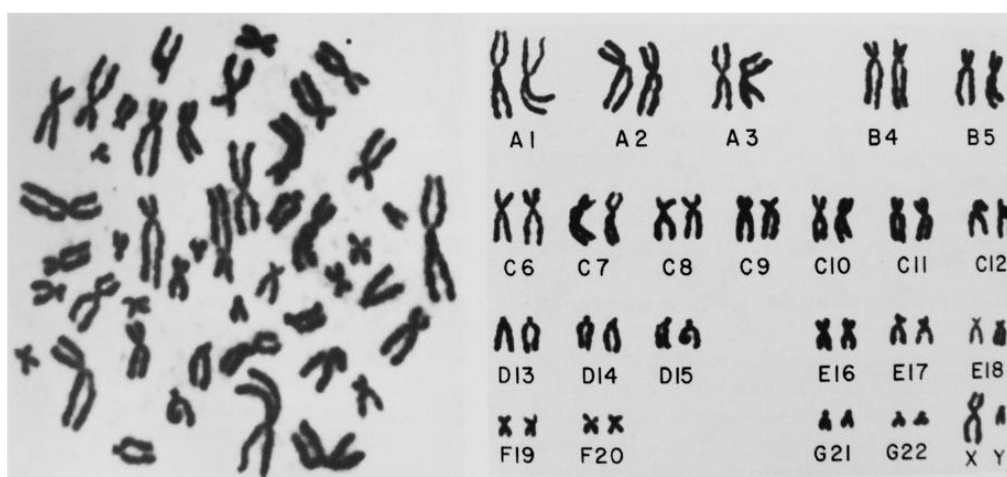
## **Tvorba krevních destiček (trombocytů)**

K jejich vzniku dochází v kostní dřeni z megakaryocytů. Děje se tak díky odštěpování periferní cytoplazmy nebo fragmentací megakaryocytů. Na celém procesu se podílí několik endogenních faktorů, růstový faktor fibroblastů, a také specifický růstový faktor trombopoetin (Pecka, 2002).



## 2.2 Cytogenetika

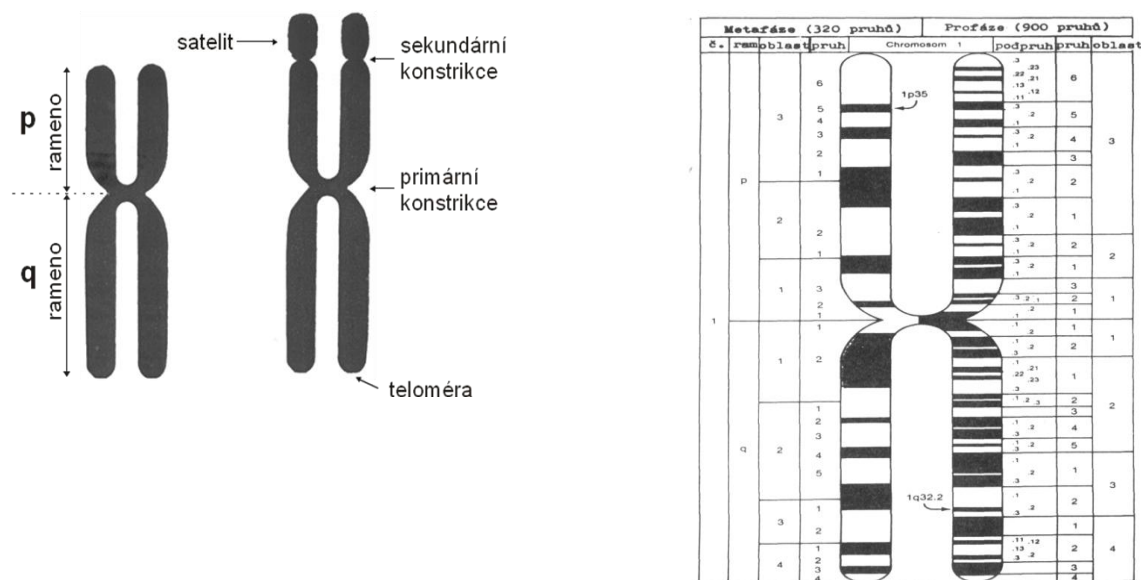
Cytogenetika je specializovaná vědecká disciplína, která zkoumá dědičnost na úrovni buňky, tj. chromozómů (Krahulcová, 2000). Studuje jejich počty a strukturu v dělicích se buňkách, protože bylo objeveno, že existují nenáhodné chromozomální aberace, které souvisejí s výskytem některých onemocnění (Snustad *et* Simmons, 2009a; Vallespí *et al.*, 1998). Chromozómy jsou sestavovány do tzv. karyotypů. Jedná se o uspořádání metafázních chromozómů do párů. Sestavený karyotyp umožňuje odhalit početní a strukturní změny vyskytující se v genetickém aparátu buňky (Snustad *et* Simmons, 2009a). Je využíván například při diagnostikování jedinců s vrozenými vývojovými vadami, v prenatalní diagnostice, ale i v onkologii, kde se stal nedílnou součástí vyšetření, které odhaluje početní i strukturní chromozomové aberace v nádorových buňkách (Michalová, 1999a). Informace vyplývající z tohoto vyšetření jsou nezbytné pro upřesnění diagnózy, určení prognózy a podílí se na správné volbě léčebných postupů. Nezastupitelnou roli hraje v kontrole účinnosti léčby a při detekci minimální zbytkové choroby (Kuglík *et* Oltová, 2008). Správný počet lidských chromozómů byl určen v roce 1956 (Michalová, 1999a). Cytogenetika do roku 1969 využívala metody barvení chromozómů Giemsovým barvivem nebo orceinem bez vzniku pruhů (Obr. 2). Studovat jejich morfologii bylo tedy možné pouze na základě několika poznatků, kterými byly například velikost chromozómu nebo typ chromozómu dle postavení centromery (Jarošová, 2000a).



Obr. 2 Giemsou barvené chromozómy sestavené do karyotypu (Orazi *et* Czader, 2009)

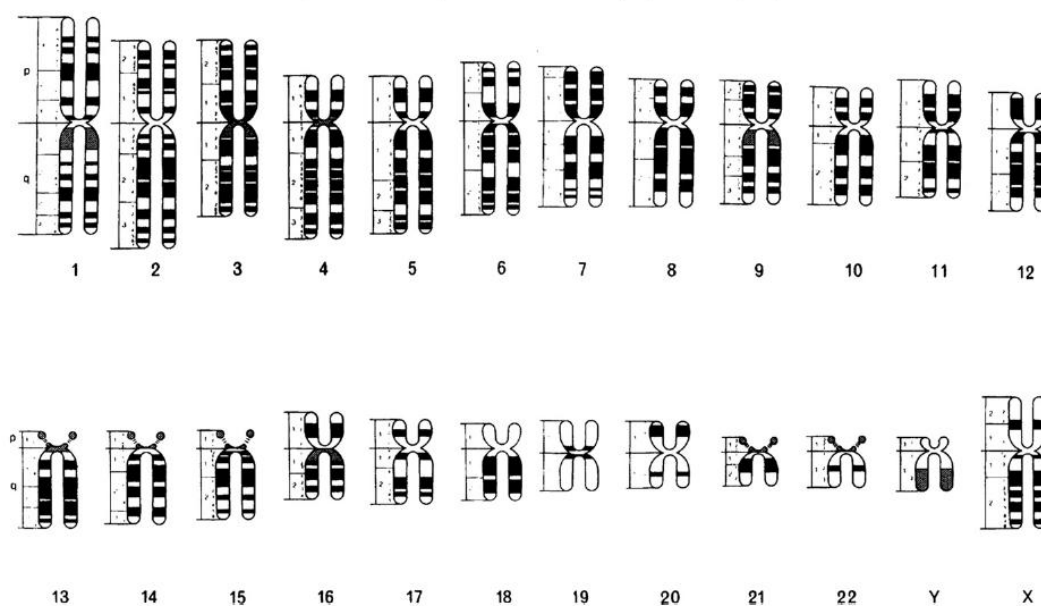
Později se začalo využívat tzv. pruhovacích technik (Kuglík *et* Oltová, 2008). Tou první bylo Q-pruhování pomocí chinakrinu, které vynalezl Torbjörn Oskar Caspersson roku 1968. Šlo o obrovský převrat v rámci studia chromozómů (Doležel, 2011a). Díky tomu bylo možno rozpoznat jak normální chromozómy, tak chromozómy, u nichž došlo ke strukturálním změnám (Sandberg *et* Meloni-Ehrig, 2010). Na struktuře pruhovaných chromozómů je totiž založena současně platná cytogenetická nomenklatura (Michalová, 1999b).

Cytogenetika se zabývá morfologií mitotických, tedy dvouchromatidových chromozómů. Jednotlivé chromozómy od sebe rozeznává díky znakům, jež jsou pro dané chromozómy typické. Mezi tyto patří například délka chromozómu, poloha centromery, výskyt a poloha sekundární konstriktce a typické vzory pruhování (Doležel, 2011a). Roku 1971 se v Paříži konal sjezd, na kterém byla ustanovena tzv. Pařížská nomenklatura pro řazení lidských chromozómů (Michalová, 1999b). Šlo o sjednocení pojmů popisujících jednotlivé chromozómy. Každý chromozóm je popsán číslem. Krátké raménko chromozómu dostalo označení „p“, dlouhé raménko „q“ (Obr. 3). Pro každý chromozóm je typické určité množství oblastí, pruhů a podpruhů, které se číslují směrem od centromery k teloméře (Obr. 3). Před číslem popisujícím oblast chromozómu je uvedeno písmeno p či q, podle toho, o jaké rameno se jedná (Doležel, 2011a).



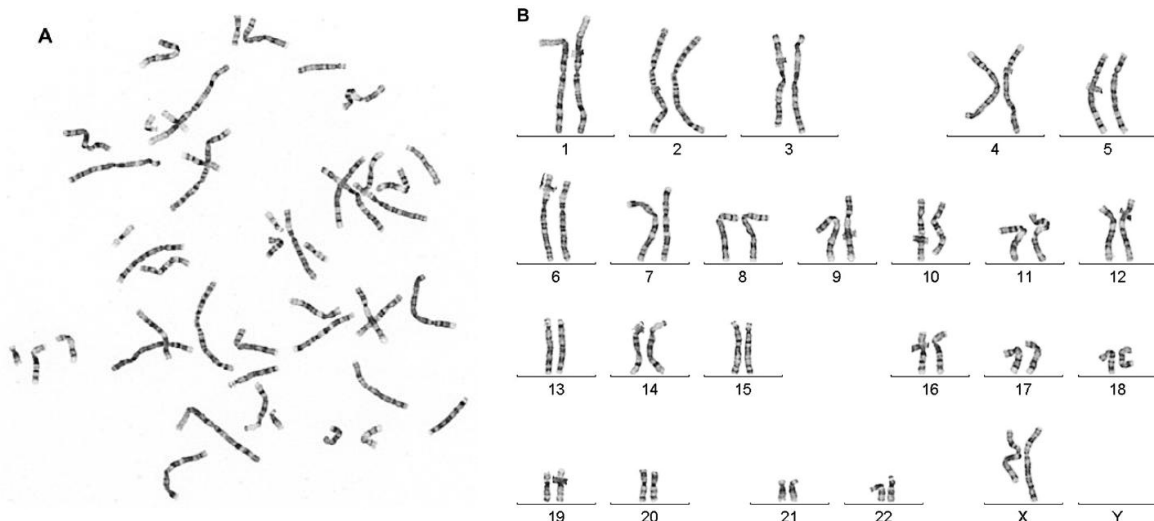
Obr. 3 Morfologie metafázního chromozómu a struktura chromozómu 1 označeného G-pruhováním, které umožňuje podrobně studovat jeho strukturu (Doležel, 2011a,b).

Existuje několik barvicích, tzv. pruhovacích technik. Pro všechny platí, že jednotlivé pruhy jsou zřetelně viditelné jen po kondenzaci chromozómů a posloupnost pruhů je závislá na stupni kondenzace (spiralizaci). Obyčejně se vyskytuje na chromozómech v metafázi cca 400-450 pruhů, které jsou počítány v haploidní sadě chromozómů. Nejpoužívanějším typem pruhování chromozómů je G-pruhování. Tato barvicí metoda je založena na schopnosti enzymu, např. trypsinu či solných roztoků za rozličných teplot denaturovat proteiny chromozómů, které se následně barví Giemsovým barvivem (Michalová, 1999b). Tmavými pruhy se barví oblasti bohaté na adenin a thymin (AT), nicméně celý mechanismus pruhování není ještě zcela znám. Známé je to, že vzniklé tmavé pruhy, kterým se říká G-pozitivní pruhy, jsou bohaté na disulfidové proteiny, naopak G-negativní pruhy vykazují přítomnost proteinů sulfhydrylových. G-pruhy jsou rovněž považovány za oblasti s vysokým stupněm kondenzace, které se replikují v pozdní syntetické fázi buněčného cyklu (Obr. 4) (Jarošová, 2000a).



Obr. 4 Ideogram chromozómů, G-pruhování (Orazi *et* Czader, 2009)

Na základě pruhovacího vzoru typického pro jednotlivé chromozómové páry je sestaven karyotyp. Karyotyp patří k jedné ze stěžejních charakteristik druhů, jak rostlinných, tak živočišných. Jedná se o rozdělení genomu na jednotlivé chromozómy (Doležel, 2011a) (Obr. 5A, B).



Obr. 5A) Metafázní chromozómy po G-pruhování, B) G-pruhované chromozómy seřazený do karyotypu (Orazi *et* Czader, 2009)

### **2.3 Molekulární cytogenetika**

Metody molekulární cytogenetiky zastávají hlavně doplňující vyšetření při nálezů chromozómových změn, při nedostatečné normální morfologii chromozómu či nízkém počtu metafází, které byly zjištěny klasickou cytogenetikou (Göhring *et al.*, 2011; Jarošová, 2000b). K metodám molekulární cytogenetiky patří FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), mFISH (mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace) a mBAND (mnohobarevné pruhování) (Jarošová, 2000b).

#### **FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace)**

Metoda FISH je využívána pro důkaz přítomnosti specifické nukleotidové sekvence v morfologicky zachovalých chromozómech buněk nebo tkání. Princip metody FISH se opírá o možnost jednořetězcové DNA sondy hybridizovat s komplementárními úseky jednořetězcové cílové DNA. Vlastním mechanismem metody je dočasné tepelné přerušení vodíkových můstků mezi vlákny DNA u sondy, čímž dochází k jejich oddělení. Aby nedošlo k denaturaci nevratné, je třeba vše uskutečňovat za určitých daných podmínek. Stejně tak je denaturována i cílová DNA. Pokud dojde k navázání komplementárních

vláken cílové DNA a DNA sondy, je opět dosaženo vzniku dvouřetězcové DNA molekuly. Jelikož jsou komplementární vlákna DNA sondy označena fluorochromem, mohou být detekována fluorescenčním mikroskopem. FISH slouží ke stanovování numerických a strukturních chromozómových aberací a je využívána pro určení přítomnosti minimální reziduální choroby (Jarošová, 2000b).

### Typy sond

První skupinou jsou sondy centromerické. Ty hybridizují s  $\alpha$  a  $\beta$ -satelitní DNA (Jarošová, 2000b). Jedná se o vysoce repetitivní sekvence s tandemovým uspořádáním, jejichž výskyt je typický pro centromerické oblasti lidských chromozómů (Jarošová, 2000; Michalová, 1999c). Signál většiny sond je velice specifický, zároveň také silný a dobře odečitatelný. Není třeba jeho amplifikace, jelikož tandemová organizace „okupuje“ oblast čítající až 4000 kb (Michalová, 1999c). Vlastností centromerických sond je využito jak v mitózách, tak v interfázních buňkách, u MDS nejvíce pro detekci numerických anomálií, např. monozomie chromozómu 5 a 7 nebo trizomie chromozómu 8, ale také pro stanovení původu buněk u pacienta po transplantaci kostní dřeně, jehož dárce byl dárce opačného pohlaví. Druhou skupinou jsou sondy celochromozómové (malovací, paintingové). Sonda tohoto typu hybridizuje s celým chromozómem. Tento způsob značení je využit pro detekci chromozomálních přestaveb (Jarošová, 2000b). Třetí významnou skupinou jsou sondy genové, které jsou komplementární k jedinečným sekvencím DNA (Michalová, 1999c). Velikost sondy je limitujícím faktorem pro zabudování do genomu. Pro klonování sondy o velikosti 500-5000 bp je využit plazmid, bakteriofág  $\lambda$  je využit pro sondy o velikosti 8-15 kb, sondy o velikosti 20-50kb jsou klonovány v kosmidu, a konečně klonovacím vektorem pro velké sondy o 50-100 kb jsou umělé kvasinkové chromozómy (Jarošová, 2000b).

### **M-FISH (mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace)**

Tato metoda vyřešila problém s využitím limitovaného počtu fluorochromů použitých současně na jednom mikroskopickém preparátu s rozdílnými emisními spektry, jako tomu je u techniky FISH (Kuglík *et* Oltová, 2008). Principem mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace je aplikace celochromozómových sond, které jsou

značeny kombinací 5 různých fluorochromů (Jarošová, 2000b). Jde o tzv. kombinatorní značení sond, vycházející z principu kombinace podle vzorce  $2^N-1$ , kdy N je počet fluorochromů. Při kombinaci 5 fluorochromů můžeme získat až 31 možných barevných kombinací. Pro obarvení lidského genomu je tato kombinace dostačující, protože využíváme 24 odlišných sond. V jediné hybridizaci je tedy možno vyšetřit celý lidský genom. Každý lidský chromozómový pár tímto způsobem získává jinou barvu, která je pro něj typická. Avšak lidské oko není schopno od sebe všechny vzniklé barvy odlišit, proto je ke každé vzniklé barvě přiřazena díky počítačovému softwaru barva klasifikační, tzv. pseudobarva, kterou už lidské oko rozeznat dokáže (Kuglík *et Oltová*, 2008).

### **M-BAND FISH (mnohobarevné pruhování)**

Tato metoda je modifikací metody M-FISH. Liší se v tom, že jsou zde využívány tzv. parciální sondy. Díky nim je možno objevit intrachromozómové přestavby karyotypu. Parciální sondy vznikají díky technice nazývané mikrodisekce a jsou opět kombinatorně značené pomocí 5 fluorochromů. Tento typ sond hybridizuje k odpovídajícím úsekům chromozómů. Tak vznikají signály, které jsou pomocí počítačového programu analyzovány a díky pseudobarvám vytváří obrazy barevně pruhovaných chromozómů, jejichž poloha je určena pomocí speciálního softwarového programu (Kuglík *et Oltová*, 2008).

## **2.4 Myelodysplastický syndrom (MDS)**

### **Charakteristika MDS**

Myelodysplastický syndrom je klonální onemocnění krvetvorby (Mayer *et al.*, 2002). Studium patogeneze MDS ukázalo, že se jedná o postižení genomu časně kmenové hematopoetické buňky, která získá proliferační výhodu. Tak vzniká patologický klon, který působí jako antigenní podnět. Na tento podnět odpovídá imunitní systém aktivací cytotoxických T-lymfocytů. Cílem jsou zralejší formy jednotlivých krevních řad, což vede k apoptóze těchto buněk, tím pádem k obrazu pancytopenie (snížení počtu krevních elementů v periferní krvi). U postižených buněk navíc může docházet k mutacím, které zapříčiňují abnormální proliferaci a potlačují normální krvetvorbu (Čermák, 2010). MDS je také označována jako doutnající leukémie, hematopoetická dysplazie, preleukémie, či preleukemická anémie (Mayer *et al.*, 2002). Naopak může docházet k rychlé progresi, kdy dochází ke dřevému selhání, a dokonce až k leukemické transformaci (Delforge, 2003). Jedná se o velmi heterogenní onemocnění, protože morfologické, cytogenetické i klinické znaky provázející MDS se vyskytují i u jiných maligních či nemaligních onemocnění. Základní rozdělení MDS je následující:

Primární MDS postihuje spíše starší populaci. Hlavními klinickými znaky jsou periferní anémie, nebo může být postiženo více řad a vzniká obraz pancytopenie. Charakteristické jsou chromozómové aberace, o kterých bude pojednáno později.

Sekundární MDS, označovaná jako t-MDS, je spíše výsledkem předcházejících chemoterapií, radioterapií, či expozic toxickým látkám. Z hlediska cytogenetiky je častý nález komplexních změn, které jsou známkou nepříznivé prognózy (Chen, 2001; Delforge, 2003; Garcia-Manero, 2010; Krahulcová, 2000).

### **FAB klasifikace**

FAB klasifikace je zkratka pro mezinárodní Francouzsko-Americko-Britskou klasifikaci. Vznikla v roce 1982. Jedná se o první klasifikační schéma, díky kterému byli pacienti s MDS rozděleni na základě nálezů v PK a KD do 5 podskupin. Díky morfologickým kritériím mohla takto být oddělena AML od MDS (Krahulcová, 2000).

Dokonce i dnes je stále upotřebena jako základní schéma pro rozdělení postižených s MDS (Mayer *et al.*, 2002). Nicméně, v roce 1999 došlo ke korektuře stávající klasifikace a ke vzniku nových schémat, a to díky světové zdravotnické organizaci (Krahulcová, 2000).

## WHO (World Health Organization) klasifikace

Světová zdravotnická organizace spolupracuje s celou řadou jiných institucí. Jejich úkolem je dát vzniknout celosvětově uznávané klasifikaci tumorů (Vardiman *et al.*, 2009). Poprvé jí bylo využito v roce 1999 (Krahulcová, 2000). Dnes se tato klasifikace opírá o veškerá doposud známá fakta, kterými jsou: morfologie, cytochemie, imunofenotypizace, genetika a klinické znaky. Nová verze WHO klasifikace týkající se akutní myeloidní leukémie a myeloidních neoplazií, která platí od roku 2008, vznikla díky cca 30 lékařům a klinickým vědcům z celého světa. Poté, co se tito klinici sešli s patology, dali dohromady všechny své znalosti a vědomosti, a ty byly začleněny do nové verze klasifikace pro klinické použití. MDS je dle WHO považován za jednu z myeloidních neoplazií, jež patří mezi obtížně diagnostikovatelné a klasifikovatelné. Přesto byla vypracována kritéria pro jednotlivé WHO podskupiny MDS (Tab. I) (Orazi *et Czader*, 2009).

Tab. I Přehled jednotlivých subtypů MDS s klasifikačními kritérii (Orazi *et Czader*, 2009)

Disease	Blood Findings	Bone Marrow Findings
Refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RA, RN, RT) RARS	Cytopenia <sup>±</sup> ; no or rare blasts (<1%); monocytes, ≤1,000/μL (1 × 10 <sup>9</sup> /L) Anemia; no blasts; monocytes, ≤1,000/μL (1 × 10 <sup>9</sup> /L)	Dysplasia (≥10%) in 1 lineage only; <5% blasts; <15% ring sideroblasts Erythroid dysplasia only; <5% blasts; ≥15% ring sideroblasts
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia RAEB-1	Cytopenia(s); no or rare blasts (<1%) <sup>±</sup> ; monocytes, ≤1,000/μL (1 × 10 <sup>9</sup> /L); no Auer rods Cytopenias; <5% blasts <sup>±</sup> ; monocytes, ≤1,000/μL (1 × 10 <sup>9</sup> /L); no Auer rods <sup>§</sup>	Dysplasia in >10% of the cells of ≥2 myeloid lineages; <5% blasts; <15% ring sideroblasts; no Auer rods Unilineage or multilineage dysplasia; 5%-9% blasts; no Auer rods <sup>§</sup>
RAEB-2	Cytopenias; 5%-19% blasts; monocytes, ≤1,000/μL (1 × 10 <sup>9</sup> /L); Auer rods +/-	Unilineage or multilineage dysplasia; 10%-19% blasts; Auer rods +/-
MDS with isolated del(5q)	Anemia; usually normal or slightly increased platelets; <5% blasts; no Auer rods	Normal to increased megakaryocytes with hypolobated nuclei; <5% blasts; del (5q) is sole cytogenetic abnormality; no Auer rods

### Refrakterní cytopenie s dysplazií jedné vývojové řady

Refrakterní anémie (RA) by měla být normocytická/normochromická, ale převážně je makrocytická. Do této skupiny patří pacienti s žádnými či s méně než 1 % blastů v PK



a méně než 5 % blastů v KD. Kostní dřev je hypercelulární a je také přítomna dyserythropoéza. Prstenčité sideroblasty tvoří méně než 15 % erytroidních buněk (Orazi *et Czader*, 2009). Musí se zde však vyskytovat více jak 10 % dysplastických buněk v jedné myeloidní vývojové řadě (Vardiman *et al.*, 2009). Pouze 5-10 % případů dospěje do fáze AML (Orazi *et Czader*, 2009). Refrakterní neutropenie (RN) je dalším podtypem, který vykazuje neutropenii a dysgranulopoézu. Poslední skupinou je refrakterní trombocytopenie (RT), jež vzniká díky trombocytopenii a morfologické dysplazii megakaryocytární linie. RN a RT jsou klasifikovány jako vzácné, tvoří 1-2 % všech MDS (Orazi *et Czader*, 2009).

#### Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)

Typickým nálezem u RARS je anémie. V periferní krvi se nevyskytují blasty, v kostní dřevě je jich méně než 5 % a je zde přítomna dysplazie buněk erytroidní linie a prstenčité sideroblasty, které tvoří nejméně 15 % erytroidních prekurzorů. Dysplazie granulocytární a megakaryocytární řady je menší než 10 %. Je klasifikována jako low-grade MDS. Přežití činí cca 7-9 let. Jen u nízkého počtu pacientů (asi 5 %) dochází k přechodu do AML (Orazi *et Czader*, 2009).

#### Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií (RCMD)

U RCMD je přítomna 1 nebo více cytopenií v PK. Dysplazie buněk se vyskytuje ve 2 či více myeloidních liniích. Počet blastů v PK je menší než 1 % a v KD menší než 5 %. Jestliže prstenčité sideroblasty tvoří více jak 15 % erytroidních prekurzorů, lze tento nález stále považovat za RCMD (Orazi *et Czader*, 2009).

#### Refrakterní anémie s nadbytkem blastů (RAEB)

Pro tuto podskupinu je charakteristické množství 5-19 % blastů v PK či KD. Dělí se na dvě podskupiny. Typ RAEB-1 vykazuje méně než 5 % blastů v KD a 2-4 % blastů v PK. Druhým podtypem je RAEB-2, kde se vyskytuje více jak 10 % blastů v KD a/nebo 5 % a více v PK. RAEB-2 je rizikovější z hlediska transformace do AML. Celkově je diagnóza tohoto subtypu MDS nepříznivá. Přežití bývá kratší než 2 roky. 30-40 % pacientů dospěje až k AML, většinou však umírají na doprovázející komplikace (Orazi *et Czader*, 2009).

### MDS asociovaná s izolovanou chromozomální abnormalitou del(5q)

Příznačná je přítomnost anémie s či bez doprovázející cytopenie. Myeloblasty tvoří méně než 5 % buněk s jádry KD a méně než 1 % leukocytů PK. Typickým cytogenetickým nálezem je intersticiální delece dlouhého ramene chromozómu 5. Vyskytuje-li se 5q-syndrom u starších žen, je typický přítomností makrocytární anémie. Krevní destičky jsou v normě či zvýšené. U megakaryocytů jsou pozorována jedno či více laločnatých jader. Množství blastů je menší než 5 %, jak v PK, tak v KD. U pacientů s delecí 5q je dobrá odpověď na léčbu lenalidomidem (Orazi *et* Czader, 2009).

### MDS, neklasifikovatelná

Do této podskupiny patří jedinci, kteří na základě veškerých výsledků nezapadají ani do jedné jmenované skupiny. První typický případ je ten, který by mohl být považován za refrakterní cytopenii s dysplazií jedné linie či RCMD s nálezem alespoň 1 % blastů v periferní krvi ve dvou opakovaných vyšetřeních. Poslední je případ, kdy jsou přítomny přetrvávající cytopenie, ovšem bez přítomnosti morfologických znaků typických pro MDS. Přesto jsou přítomny cytogenetické znaky podporující hypotézu přítomnosti MDS (Orazi *et* Czader, 2009).

### **Etiologie MDS**

Etiologie MDS není ještě zcela známa (Orazi *et* Czader, 2009). Nicméně se předpokládá, že příčinou, která podněcuje vznik MDS, je genetická nestabilita, která je základem pro hromadění somatických mutací (Maeck *et al.*, 2000). Buňka, u níž došlo k mutaci, dává vzniknout klonům, které rostou přednostně. Postupně se zvyšuje proliferační aktivita, avšak neefektivní hematopoézy (Krahulcová, 2000). Snahou mnoha vědeckých skupin je tyto mutace identifikovat. Zároveň je jejich úsilím zjistit, zda zapříčiňují výskyt onemocnění nebo jej pouze doprovází. Všechny tyto informace by totiž mohly přispět ke správné diagnóze, tím pádem i k léčbě MDS. Konkrétní mutace ovšem nejsou předmětem této bakalářské práce (Masuda, 2011).

## **Incidence**

MDS se objevuje převážně v pozdnější fázi života (Valent *et al.*, 2009). Střední věk pacientů se pohybuje mezi 70 a 75 lety (Garcia-Manero, 2010). Ročně dochází ke vzniku 2-5 nových případů MDS na 100 000 obyvatel. Přestože je výskyt MDS u lidí mladších 40 let vzácný, není vyloučitelný. Existují i případy dětí s diagnózou MDS (Mayer *et al.*, 2002). U nich se uvádí incidence 0,53-3,4 případů na 1 000 000 dětí (Vallespi *et al.*, 1998).

## **Diagnostika MDS**

Díky tomu, že je MDS velice heterogenní onemocnění, není jednoduché jej diagnostikovat (Vallespi *et al.*, 1998). Pro stanovení diagnózy MDS musí být využito i několika různých laboratorních vyšetření, včetně kombinací jednotlivých metod (Mayer *et al.*, 2002). Primárním vyšetřením je vyšetření morfologické, které se opírá o přítomnost dysplastických rysů v PK a KD (Vallespi *et al.*, 1998). Dalším typem diagnostického vyšetření je imunofenotypizace použitím průtokové cytometrie. Podstatou je detekce povrchových antigenů, a to prostřednictvím monoklonálních protilátek. Cytogenetické vyšetření se stalo základní metodou pro potvrzení klinické diagnózy MDS. Kromě klasického cytogenetického vyšetření buněk kostní dřeně je rutinně využíváno vyšetření metodou FISH. Díky této technice je možno zkoumat velké množství buněk, tudíž detekovat chromozomální změny vyskytující se pouze v malém počtu buněk i v nepřítomnosti mitóz (Mayer *et al.*, 2002).

## **Cytogenetické změny u MDS**

Nejen z hlediska klinického, ale i z hlediska cytogenetického představuje MDS heterogenní onemocnění, které se vyznačuje obrovskou škálou cytogenetických abnormalit (Haase, 2008). O tom svědčí fakt, že Haase (2008) popsal ve své studii zahrnující 2072 pacientů s MDS 684 odlišných cytogenetických kategorií. A to se cytogenetické změny vyskytovaly u cca 50 % z nich (Tab. II) (Haase, 2008). Velké množství těchto genetických změn tvoří tzv. nebalancované abnormality, kdy dochází ke kvantitativním změnám genetické informace v genomu. Především se jedná o ztrátu genetické informace díky delecii či monozomii, naopak v některých případech množství genetické informace narůstá,

například formou trizomie (Haase, 2008). Ne tak často dochází k vyváženým translokacím, tzv. balancovaným abnormalitám (Mayer *et al.*, 2002).

Tab. II Přehled nejčastěji se vyskytujících chromozómových změn u MDS, výsledky pochází ze studie 2072 vyšetřených pacientů (Haase, 2008)

Anomaly	total, n (% of all cases)	Isolated, n (% <sup>a</sup> )	With one additional abnormality, n (% <sup>a</sup> )	As part of complex abnormalities, n (% <sup>a</sup> )
5q-	312 (15.1)	146 (47)	52 (17)	114 (36)
-7/7q-	230 (11.1)	86 (37.5)	31 (13.5)	113 (49)
+8	173 (8.4)	81 (46.8)	37 (21.4)	55 (31.8)
-18/18q-	78 (3.8)	3 (3.8)	2 (2.6)	73 (93.6)
20q-	74 (3.6)	36 (48.6)	10 (13.5)	28 (37.8)
-5	69 (3.3)	1 (1.4)	4 (5.8)	64 (92.8)
-Y	58 (2.8)	41 (70.7)	5 (8.6)	12 (20.7)
+21	45 (2.2)	5 (11.1)	18 (40)	22 (48.9)
-17/17p-	42 (2.0)	1 (2.4)	1 (2.4)	40 (95.2)
inv/t(3q)	41 (2.0)	16 (39)	8 (19.5)	17 (41.5)
-13/13q-	40 (1.9)	5 (12.5)	6 (15)	29 (72.5)
+1/+1q	37 (1.8)	3 (8.1)	6 (16.2)	28 (75.7)
-21	33 (1.6)	3 (9.1)	4 (12.1)	26 (78.8)
+11	28 (1.4)	6 (21.4)	4 (14.3)	18 (64.3)
-12	26 (1.3)	0	2 (7.7)	24 (92.3)
12p-	25 (1.2)	7 (28)	6 (24)	12 (48)
t(5q)	24 (1.2)	6 (25)	3 (12.5)	15 (62.5)
11q-	23 (1.1)	8 (34.8)	4 (17.4)	11 (47.8)
9q-	23 (1.1)	8 (34.8)	3 (13)	12 (52.2)
t(7q)	22 (1.1)	6 (27.3)	6 (27.3)	10 (45.5)
-20	22 (1.1)	0	0	22 (100)

Množství přítomných abnormalit závisí na genomické nestabilitě, která je důsledkem akumulace genetických poruch a poškození reparačních mechanismů (Haase, 2008). U pacientů s primární MDS jsou klonální změny karyotypu přítomny u více jak 50 % případů. U sekundární MDS je to cca 80 %. Tyto hodnoty zcela jednoznačně poukazují na to, že cytogenetické vyšetření je nutnou součástí diagnostiky a určení prognózy nemocných s MDS (Mayer *et al.*, 2002).

### Prognózy nemocných s MDS

Nález normálního karyotypu u pacienta s MDS je spojen s dobrou prognózou (Haase, 2008). Medián přežití je odhadován na 42 měsíců (Malcovati *et Nimer*, 2008). Za střední prognózu je považována trizomie chromozómu 8, abnormality dlouhého ramene chromozómu 3, trizomie chromozómu 9, translokace 11q a delecce 17p. Existují i jiné

změny, které jsou některými skupinami považovány za středně těžké, nicméně tato domněnka nebyla potvrzena jinými skupinami (Haase, 2008). Špatnou prognózu představují komplexní změny karyotypu. Ty představují nález tří a více změn v karyotypu. Některé studie však považují za komplexní změny karyotypu nález 5 a více změn. Průměrné přežití pacientů se špatnou prognózou je kratší než jeden rok. Z 30 % abnormálních případů připadá právě 15 % případů na komplexní abnormality. Současné práce, které studují prognostický význam cytogenetických změn u nemocných s MDS, rozdělují nemocné s MDS na základě cytogenetiky do 5 prognostických podskupin, jak ukazuje Tab. III (Schanz *et al.*, 2012).

Tab. III Prognóza MDS odvíjející se od nálezu

NÁLEZ	PROGNÓZA
nemocní s izolovanou delecí 11q a chyběním chromozómu Y	velmi dobrá
nemocní s normálním karyotypem, izolovanou delecí 5q, 12p, 20q	dobrá
nemocní s izolovanou delecí 7q, +8, i(17q), +19 a izolovanou změnou nepatřící do žádné definované podskupiny	střední
inv(3q)/t(3q)/del(3q), -7	špatná
komplexní změny	velmi špatná

### Nejčastější typy cytogenetických aberací

#### Delece 5q

Delece dlouhých ramen chromozómu 5 (5q-) je tou nejtypičtější cytogenetickou změnou vyskytující se u pacientů s MDS a změnou karyotypu. Vyskytuje se u 30 %

případů. Dochází k delecí dlouhého ramene chromozómu 5 s variabilním rozsahem delecí. Díky studiu deletované oblasti byla stanovena minimální deletovaná oblast zahrnující pruh 5q31. Vyskytuje se jako součást komplexních změn karyotypu a tento nálezn predikuje velmi nepříznivou prognózu. Naopak, jako izolovaná změna je spojována s dobrou prognózou a v tomto případě se jedná o tzv. 5q- syndrom (Haase, 2008).

### 5q- syndrom

Pokud je delecí dlouhého ramene chromozómu 5 tou jedinou změnou v karyotypu, hovoříme o tzv. 5q- syndromu. Tvoří cca 1/3 případů MDS ze všech těch, kde se vyskytuje delecí 5q. Delecí má často charakter intersticiální delecí. U 70 % případů se vyskytuje zlom v oblasti 5q33, v 50 % v oblasti q13 nebo ve 20 % v oblasti q15. Je známo, že proximální body zlomů se vyskytují u starších pacientů blíže centromere, naopak bod zlomu v distální části chromozómu je na věku nezávislý. Současné studie se snaží identifikovat geny vyskytující se v nejčastěji deletované oblasti. Mezi kandidátní geny vyskytující se v deletovaném úseku patří gen EGR1, IRF1 a nebo RSP14 a SPARC. Jejich vliv a účast na patogenezi MDS je zatím předmětem studií (Cazzola, 2008; Vallespí *et al.*, 1998). Jiné morfologické znaky doprovázející tento syndrom jsou: množství blastů v KD < 5 %, trombocytóza, dysmegakaryopoéza a makrocytární anémie. Pacienty jsou převážně ženy (Malcovati *et Nimer*, 2008). Pro 5q- syndrom je typické malé riziko progresu do AML (Vallespí *et al.*, 1998). Pacienti jsou léčeni lenalidomidem. Ten byl schválen pro léčbu na transfúzi závislých jedinců s MDS s nízkým a středním rizikem. U více než 2/3 postižených dojde ke vzniku transfúzní nezávislosti, mnohdy také k cytogenetické remisi. Medián přežití je udáván 76 měsíců (Malcovati *et Nimer*, 2008).

### Delecí 20q

Jedná se o intersticiální delecí dlouhého ramene chromozómu 20. Obvykle je přítomna jako změna izolovaná. Cytogenetika sice tuto aberaci popsala jako intersticiální i terminální, nicméně molekulární biologie podporuje teorii o delecí intersticiální. Důležitou oblastí je úsek mezi lokusy D20S174 a D20S17. Předpokládá se, že se v dané oblasti vyskytují tumor supresorové geny, jejichž delecí by mohla mít podíl na vzniku MDS. Je-li izolovanou změnou, je spojena s dobrou prognózou (Schanz *et al.*, 2012).

### Monozomie chromozómu 7

Monozomie chromozómu 7 patří po delecí 5q k těm nejčastějším abnormalitám. Vyskytuje se ve 25 % abnormálních karyotypů (Haase, 2008). Velice často je přítomna u sekundárních MDS (Vallespí *et al.*, 1998). Může jít jak o ztrátu celého chromozómu, tak pouze o delecí dlouhého ramene. I přes to nebyly doposud nalezeny odlišnosti v závislosti na velikosti delecí. Vždy jsou deletovány oblasti 7q22, 7q31-32 a 7q36. Delecí je asociována se špatnou prognózou (Vallespí *et al.*, 1998). Přežití u samotné monozomie chromozómu 7 se uvádí 14 měsíců, u monozomie 7 a jedné další přidatné změny 11 měsíců. V případě, že je monozomie 7 součástí komplexu změn, přežití pacienta je 8 měsíců. Léčba chemoterapií není dostačující a pokud to stav a věk pacienta dovoluje, doporučuje se alogenní transplantace (Haase, 2008).

### Trizomie chromozómu 8

U primárních MDS se trizomie chromozómu 8 vyskytuje u 10-15 % případů, jak jako součást přidatných změn, tak i jako změna izolovaná. Je považována za střední prognózu, přežití se udává 25-57 měsíců (Vallespí *et al.*, 1998). Vliv a účast na patogenezi MDS je stále předmětem studií. Velmi významné pozorování bylo publikováno v práci Sloanda *et al.* (2007). Poukázalo na fakt, že se CD34+ buňky pacientů s MDS a izolovanou trizomií chromozómu 8 liší od ostatních MDS buněk, včetně normálních hematopoetických buněk. Rozdíl spočíval v expresi apoptických markerů. Docházelo k up-regulaci proteinu c-myc, CD1 a survivinu. Studie potvrdily, že buňky s trizomií 8 podstupují apoptózu, ale nekompletní. Jsou tedy stále schopné růstu a tvorby kolonií (Vallespí *et al.*, 1998).

### Chybění chromozómu Y u mužů

Ztráta pohlavního chromozómu Y ve většině případů koreluje s věkem pacientů. Tato změna se taktéž vyskytuje u jiných typů onemocnění. Nicméně, ukázalo se, že při tomto typu aberace vyskytujícího se u MDS nikdy nedochází k vývoji AML (Vallespí *et al.*, 1998). Nejnovější prognostické stratifikace spojují tuto změnu s dobrou prognózou nemocných. Problematika chybění chromozómu Y u maligních hematologických onemocnění není zatím zcela objasněna. Přestože chybění chromozómu Y může být věkovým fenoménem, existují pozorování, která ukázala, že chybění Y je

u hematologických malignit významně vyšší ve srovnání s jinými onemocněními, a že toto chybění je spojeno s neoplastickými změnami (Zhang *et al.*, 2007).

## **Léčba MDS**

Nejdůležitějším faktorem při léčbě MDS je léčba „šitá na míru“. Jedná se o individuální zhodnocení stavu každého pacienta, jeho věku, stádia onemocnění, rizikovosti a přídatných potíží (Cheson, 1997). U pacientů s nízkým a středním rizikem onemocnění existuje více variant volitelné léčby. Je-li onemocnění stabilní, je možné jej pouze pravidelně sledovat bez podání léčby (Červinek, 2009). Ovšem nejstandardnější péče je péče podpůrná (Cheson, 1997). Mezi podpůrnou léčbu patří transfúze červených krvinek a krevních destiček. Úkolem je zmírnit příznaky spojené s jejich nedostatkem. S tím souvisí indikace chelatační léčby, jejímž úkolem je odstranit z pacientova těla přebytečné železo, které se do něj dostává právě díky transfúzím. Pro léčbu doprovázejících infekčních onemocnění jsou aplikována antibiotika a antimykotika. Do podpůrné léčby dále patří i léčba růstovými faktory (erythropoetin, filgrastim). Ty podporují vznik jednotlivých krevních elementů. Dalším typem léčby je léčba pomocí imunosupresivních preparátů. Je indikována u pacientů trpících cytopeniemi, kteří nejsou vhodnými kandidáty pro transplantaci nebo pro příjem růstových faktorů. Posledním typem léčby u pacientů s nízkým a středním rizikem MDS je alogenní transplantace krvevorných buněk. Je doporučena mladším pacientům se sekundární MDS nebo těm, kteří vykazují těžkou cytopenii, hypoplazii nebo fibrózu KD a u nemocných se středním rizikem a množstvím blastů větším než 5 % v KD nebo při výskytu nepříznivého cytogenetického nálezu (Červinek, 2009).

Pro pacienty s vysokým rizikem MDS je volba léčby poměrně komplikovaná. Pacienti mohou být léčeni indukční chemoterapií, alogenní transplantací krvevorných buněk nebo léčbou využívající hypomethylačních látek a inhibitorů histondeacetylázy (Červinek, 2009).



### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo prakticky zvládnout přípravu a zpracování buněk kostní dřeně a naučit se karyotypovat - seřazovat jednotlivé chromozómy dle platné cytogenetické nomenklatury na základě G-pruhování a využít znalosti pro sestavení karyotypů alespoň 5 nemocných s MDS. Dalším cílem bylo prakticky zvládnout metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a vyšetřit touto metodou alespoň 5 pacientů s diagnózou MDS.

## **4 MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Zpracování buněk KD pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření**

#### **Biologický materiál**

Jak pro cytogenetické, tak pro molekulárně cytogenetické vyšetření jsou biologickým materiálem buňky kostní dřeně (KD). Od jednoho pacienta jsou vždy odebrány 2 vzorky. Jeden vzorek je zpracován přímo po odběru KD (jedná se o tzv. normální zpracování - N). Druhý vzorek je kultivován *in vitro* v kultivačním médiu při 37°C po dobu 24 hodin (K24). S biologickým materiálem musí být zacházeno dle standardních operačních postupů (SOP), včetně zachování sterilních podmínek.

#### **Přístroje a pomůcky**

- flowbox HERAsafe<sup>®</sup>, CO<sub>2</sub> inkubátor Function Line (obojí Heraeus Holding, Hanau, Německo), centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA), mraznička, lednička, stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), třepačka Heidolph Real top (Heidolph, Schwabach, Německo), laboratorní sklo

#### **Spotřební materiál**

- plastové kultivační láhve (40 ml) (Nunclon TM Δ Surface), centrifugační zkušavky Falcon (15ml) (obojí Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), centrifugační zkušavky Falcon (50 ml) (TPP<sup>®</sup>, Trasadingen, Švýcarsko), Pasteurovy pipety (10 ml) (Biosigma, Benátky, Itálie), sterilní injekční jehly (B. Braun, Melsungen, Německo)

#### **Reagencie**

- Karyomax Colcemid, telecí sérum, Giemsovo barvivo (vše Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), heparinum natricum (Zentiva, Praha, ČR), RPMI-1640 médium, Antibiotic Antimycotic solution (ATB = penicilin, streptomycin, amphotericin) (obojí Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 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 letáku výrobku nebo je možné jej najít na webových stránkách výrobce

## 1. FÁZE PŘÍPRAVY VZORKU

Nejdříve se připraví kultivační média. Existují 3 typy, podle typu kultivace. Médium, které slouží k přímému zpracování materiálu (normální=N), médium s heparinem (H) a médium pro 24hodinovou kultivaci (kultivace=K). Do médií N a H je odebírána KD (1-2 ml). Složení médií shrnuje následující Tab. IV.

Tab. IV Složení médií používaných pro inkubaci buněk KD

NORMÁL (N)	HEPARIN (H)	KULTIVACE (K)
10 ml RPMI	10 ml RPMI	12 ml BM média
2 kapky heparinu	2 kapky heparinu	
2,4 ml telecího séra		

## 2. FÁZE PŘÍPRAVY VZORKU

### a) NORMÁLNÍ ZPRACOVÁNÍ KD (N)

K médiu N se vzorkem odebrané KD jsou přidány 2 kapky kolcemidu a směs je vložena na 30 minut do inkubátoru (37°C). Kolcemid rozrušuje mitotické vřeténko, tím zastavuje proces buněčného dělení v metafázi (Kuglík *et* Oltová, 2008). Po 30 minutách se obsah kultivační láhve přelije do centrifugační zkumavky (15 ml) a materiál je centrifugován (1000 rpm, 37°C, 10 min). Po centrifugaci je supernatant odsát pomocí vývěvy v digestoři, pelet je vortexován a do zkumavky je přidáno cca 10 ml vytemperovaného 0,075M KCl, který způsobí lýzu buněk a uspořádání chromozómů v ekvatoriální rovině (Kuglík *et* Oltová, 2008). Tento proces probíhá při 37°C po dobu 25 minut. Dále jsou k biologickému materiálu přidány 3 kapky fixační směsi uložené

v mrazáku (metanol:ledová kyselina octová, 3:1; tzv. Carnoyův roztok), po promíchání následuje centrifugace (1000 rpm, 37°C, 10 min). Supernatant se opět odsaje a za protřepávání se do zkumavky přidá cca 10 ml čerstvé fixační směsi (první ml je přidáván po kapkách). Takto připravený vzorek se nechá 30 minut stát při laboratorní teplotě (RT), následně je centrifugován (1000 rpm, 4°C, 10 min). Po odsátí supernatantu se opět přidá cca 10 ml fixační směsi (ta již nemusí být vychlazená). Tento postup (centrifugace + odsátí supernatantu + přidání 10 ml fixační směsi) je ještě 5x opakován. V průběhu celého procesu se mění barva biologického materiálu z červené přes hnědou až na bílou. Po zpracování je biologický materiál nakapán na podložní sklo (pro kontrolu přítomnosti mitóz pod mikroskopem). Jsou-li mitózy přítomny, je vzorek obarven Giemsovým barvivem a ve stejný den je preparát vyhodnocen. Požadovaný počet mitóz v jednom cytogenetickém preparátu je minimálně 5.

#### b) KULTIVACE BUNĚK KD V K MÉDIU (K24)

Do média H jsou odebrány buňky KD (1-2 ml) určené pro kultivaci. Z kultivačních láhví jsou přelity do 15 ml centrifugačních zkumavek. Takto připravený materiál je centrifugován (1000 rpm, 37°C, 10 min). Po odstranění supernatantu je buněčná suspenze přenesena do nádob s kultivačním médiem K, kam jsou přidány 3 kapky kolcemidu. Kultivace probíhá při 37°C 24 hodin. Druhý den je vzorek přelit do 15 ml zkumavek. Následuje centrifugace (37°C, 1000 rpm, 10 min), odstranění supernatantu a je přidáno 10 ml 0,075M roztoku KCl (vytemperovaný na 37°C). Materiál je opět inkubován po dobu 25 minut (37°C). Po přidání cca 3 kapek fixáže (Carnoyův roztok) a promíchání následuje centrifugace opět za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu je přidáno 10 ml fixační směsi (vychlazená na -20°C). První ml směsi je přidáván po kapkách. Dalším krokem je inkubace biologického materiálu 30 minut při RT. Následuje centrifugace (1000 rpm, 4°C, 10 min), odstranění supernatantu, znova je přidána fixační směs (cca 10 ml) a vzorek je podroben další centrifugaci za stejných podmínek. Krok, kdy je po centrifugaci odsát supernatant a přidána fixační směs, je opakován tolikrát, dokud nemá buněčná suspenze mléčné zbarvení. Na závěr je zhodnocena kvalita kultivace (přítomnosti interfázních buněk, přítomnost mitóz). Suspenze je uchovávána v lednici a je připravena k dalšímu použití.

## **4.2 Cytogenetické vyšetření**

### **Biologický materiál**

- buněčná suspenze N pěti pacientů s diagnózou MDS

### **Přístroje, pomůcky, software**

- laboratorní sklo, laboratorní váhy Scaltec (Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Německo), magnetická míchačka (Schott Instruments, Mainz, Německo), centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA), digestoř, kahan, světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japonsko), CCD kamera, karyotypovací software Ikaros, Metafer Axioplan 2 Imaging (vše MetaSystems, Altlußheim, Německo), 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), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, kyselina citronová, metanol (vše Lach-Ner, Neratovice, ČR), dH<sub>2</sub>O (vyrábí si HOK), trypsin, Leishmann's stain (obojí Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### **Příprava roztoků**

- 0,14M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: rozpuštěním 25 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O v 500 ml dH<sub>2</sub>O
- 0,1M kyselina citronová: rozpuštěním 10,5 g kys. citronové v 500 ml dH<sub>2</sub>O
- Leishmannovo činidlo: rozpuštěním 0,6 g Leishmann's stain 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: rozpuštěním 0,04 g trypsinu v 1 ml PBS

Barvicí roztok I: 75 ml 0,14M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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 Gurrueva roztoku

## **Pracovní postup**

Na nadýchnuté podložní sklo je kápnuta buněčná suspenze (2-3 kapky) z výšky cca 50 cm. Sklo je protáhnuto nad plamenem kahanu a ponecháno při pokojové teplotě do uschnutí. Tímto způsobem je pro každého pacienta připraveno 5 podložních skel, jak z kultivace N, tak z K24. První sklo je vloženo do barvicího roztoku I na 2 minuty, pak opláchnuto v EBSS a přeneseno do barvicího roztoku II na 3 minuty. Následuje opláchnutí skla destilovanou vodou, uschnutí skla a pozorování ve světelném mikroskopu. Správně nakapaný preparát je připraven pro karyotypování. Karyotypování probíhá pomocí analýzy obrazu Ikaros (MetaSystems, Altusheim, Německo). Kamera umístěná na mikroskopu přenáší obraz do počítače. Speciální softwarový program následně analyzuje vytvořený digitální obraz a definuje pozadí a objekty - chromozómy. Ty jsou snadno sestaveny do karyotypu. U každého pacienta je hodnoceno celkem 30 metafází a 10 z nich je karyotypováno.

Nádorová cytogenetika definuje abnormální klon jako nález dvou a více mitóz se stejnou strukturální změnou nebo stejným nadpočetným chromozómem, nebo nález tří a více mitóz s delecí nebo chyběním chromozómu. Normální klon je definován jako nález jedné mitózy s normálním počtem a strukturou chromozómů.

### **4.3 Molekulárně cytogenetické vyšetření FISH s lokusově specifickými (LSI) a centromerickými (CEP) sondami**

#### **Biologický materiál**

- buněčná suspenze K24 od 11 pacientů, 6 žen a 5 mužů, u 3 pacientů bylo vyšetření FISH indikováno z důvodu kontroly dárcovské krevetvorby po transplantaci, 5 pacientů bylo podrobena tomuto vyšetření z důvodů potvrzení/vyloučení MDS, u zbylých 3 pacientů se jednalo o kontrolní vyšetření pacientů s diagnózou MDS

### **Přístroje, pomůcky, software**

- lednička, mraznička, centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA), pH metr Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), skleněné kyvety, pipety (Gilson, Middleton, WI, USA), vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, Německo), inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK), topná a sušící deska Medax (Nagel, Kiel, Německo), třepačka Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo), stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), mikroskop Olympus BX41, fluorescenční lampa U-RFL-T (obojí Olympus, Tokyo, Japonsko), CCD kamera, software ISIS (MetaSystems, Altlußheim, Německo)

### **Spotřební materiál**

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

### **Reagencie**

- dH<sub>2</sub>O (vyrábí si HOK), metanol, kyselina octová (obojí Lach-Ner, Neratovice, ČR), 20x SSC (saline-sodium citrate buffer), DAPI, NP40 (vše Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), Tween20 (Serva, Heidelberg, Německo), ultračistý formamid (Qbiogene, Montreal, QC, Kanada), 70%, 80%, 90% a 96% etanol (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 dH<sub>2</sub>O a upraveno na pH 7, uchovává se při RT

- 2x SSC: naředění zásobního roztoku 20x SSC dH<sub>2</sub>O

- 2x SSC/0,1% NP40: 100 ml 20x SSC, 850 ml injekční H<sub>2</sub>O, 1 ml NP40, pH 7-8, doplněno H<sub>2</sub>O do 1 l, uchováváno při RT

- 0,4x SSC/0,3% NP40: 20 ml 20x SSC, 950 ml injekční H<sub>2</sub>O, 3 ml NP40, pH 7-7,5; doplněno H<sub>2</sub>O do 1 l, uchováváno při RT

- denaturační roztok: 2 ml 20x SSC, 4 ml injekční H<sub>2</sub>O, 14 ml formamidu, upraveno na pH 7-8

### **Příprava sond**

Dle typu chromozómové aberace, která má být prokázána, je zvolena sonda. Sondy, které byly použity, vyrábějí firmy Abbott Molecular a Kreatech. Sondy jsou dodávány ředěné i neředěné (s příslušným pufrům). Pokud není sonda z výroby ředěna, je tak učiněno před jejím použitím dle Tab. V a VI. Sondy a jejich pufrů se skladují v mrazáku, před použitím je nutné je rozmrazit, následně vortexovat a centrifugovat. Jedná-li se o sondy lokusově specifické (genové) - LSI (5q31, 7q31) standardně používané u nemocných s MDS, jsou připravovány smícháním 7 $\mu$ l LSI pufru, 2  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O a 0,8  $\mu$ l příslušné LSI sondy a následně denaturovány (viz. poslední odstavec). Tyto sondy jsou vždy aplikovány samostatně, jsou dvoubarevné a váží se na 2 odlišné oblasti jednoho lokusu nebo dvou různých lokusů na chromozómu. LSI sonda 7q22/7q35 od firmy Kreatech je již ředěna z výroby, tudíž ihned připravena k denuraci. Sondy centromerické - CEP (CEP 7, CEP 8) používané u MDS, se mohou použít společně, pokud zvolíme rozdílně značené např. (CEP 8 značená zeleně - Spectrum Green (SG) - Abbott; CEP 7 označená červeně - Spectrum Orange (SO) - Abbott).

Denaturace sond se děje v denaturačním roztoku, který je umístěn ve vodní lázni při 73°C po dobu 5 minut (sondy Abbott Molecular). Sondy od firmy Kreatech (20q (SG); 7q22/7q35) jsou denaturovány při 90°C po dobu 10 minut. Sonda pro chromozóm 20q (SG) (Kreatech) je již naředěná od výrobce. Skla, na která je aplikována sonda Kreatech, jsou denaturována pouze 2 minuty, u Abbott Molecular sond probíhá denaturace 5 minut.



Tab. V Ředění LSI sond

sonda 5q31, sonda 7q31 (Abbott)		sonda 7q22/7q36 (Kreatech)	
reagencie	objem [ $\mu$ l]	reagencie	objem [ $\mu$ l]
sonda	0,8	sonda	8
LSI pufr	7	celkový objem	8
dH <sub>2</sub> O	2		
celkový objem	9,8		

Tab. VI Ředění centromerických a genových sond

sonda CEP 7+CEP 8 (Abbott)		sonda CEP 8 (SG) a genová sonda 20q (SO) (Abbott)	
reagencie	objem [ $\mu$ l]	reagencie	objem [ $\mu$ l]
sonda CEP 7	0,4	sonda	0,4
sonda CEP 8	0,4	LSI pufr	3,5
CEP pufr	7	dH <sub>2</sub> O	1
dH <sub>2</sub> O	2	celkový objem	4,9
celkový objem	9,8		

### Pracovní postup

Před kapáním buněčné suspenze na podložní sklo je biologický materiál promýván čerstvým roztokem Carnoye (metanol:kyselina octová, 3:1). Promývání začíná centrifugací (1000 rpm, 4°C, 10 min), následně je pomocí vývěvy odsát vzniklý supernatant tak, aby nedošlo k nasátí usazených buněk (nad buňkami zůstává raději malé množství supernatantu). Zkumavka je vortexována, poté je objem zkumavky doplněn fixační směsí Carnoye, opět dochází k centrifugaci (1000 rpm, 4°C, 10 min). Po odsátí

supernatantu je k buňkám po kapkách přidávána fixační směs do té doby, než dojde ke vzniku mléčného zabarvení suspenze, což značí optimální hustotu buněk. Samotný preparát je připraven nakápnutím 2-3 kapek buněčné suspenze na čisté, nadýchnuté a popsané podložní sklo. Po uschnutí skla je pomocí mikroskopu zkontrolováno množství buněk v preparátu. Dle potřeby může být buněčná suspenze přikápnuta nebo naopak naředěna. Do plastové centrifugační zkumavky o objemu 50 ml je připraven roztok 2x SSC (naředěním zásobního roztoku). Roztok 2x SSC je přelit do skleněné kyvety. Zde jsou preparáty po dobu 20 minut při RT inkubovány. Mezi tím dochází k přípravě sond (popsáno výše). Po 20 minutách je preparát na podložním skle odvodněn inkubací ve vzestupné alkoholové řadě (uchovávaná při -20°C, jen 96% etanol v lednici). Inkubace trvá vždy 2 minuty (v 70%, 80%, 90% a 96% etanolu). Po odvodnění a oschnutí je sklo denaturováno ve vytemperovaném denaturačním roztoku (5 minut při 73°C nebo 2 minuty při 73°C, viz dále). Po pěti (dvou) minutách projde sklo bez osušení opět alkoholovou řadou. Nakonec se nechá uschnout a je připraveno pro aplikaci sondy.

## **Hybridizace**

Denaturovaná sonda je napipetována na denaturovaný suchý preparát a přikryta krycím sklíčkem. Okraje krycího skla jsou oblepeny rubber cementem, který zabrání vyschnutí sondy v aplikované oblasti pod krycím sklem. Takto připravené podložní sklo se sondou je umístěno do hybridizační komůrky, kde se inkubuje při 37°C po dobu 24 hodin. Druhý den je po odstranění krycího skla nenavázaná sonda odmyta v roztoku 0,4x SSC/0,3% NP40, který je předtím umístěn ve vodní lázni při teplotě 73°C. Inkubace trvá 2 minuty. Poté se sklo inkubuje ještě 2 minuty při RT v roztoku 2x SSC/0,1% NP40. Po osušení skla je na něj napipetováno 10 µl DAPI (podbarvení), preparát je překryt krycím sklem a připraven k vyhodnocení.

## **Vyhodnocení**

Preparát je hodnocen pomocí fluorescenčního mikroskopu za použití fluorescenčních filtrů odpovídajících fluorochromům použitých sond. Obraz je snímán pomocí CCD kamery a ukládán v softwaru ISIS. Pokud probíhá hodnocení pouze interfázních jader, pak je hodnoceno nejméně 300 těchto interfázních jader. Za patologický

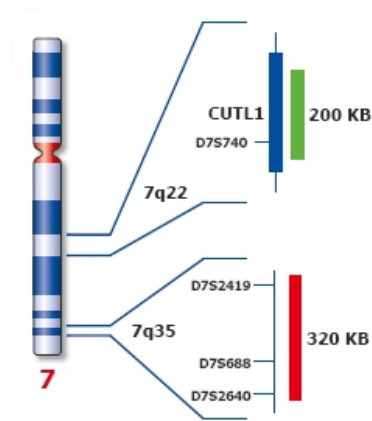
je považován nález s abnormálními signály vyskytujícími se ve více než 5 % všech spočítaných interfázních jader, tzv. hodnota cut off dané sondy. Mitózy jsou hodnoceny zvlášť. Například LSI sonda 5q31 hybridizuje na chromozóm 5 ve dvou oblastech. První z nich je oblast 5p15.2 (lokusy D5S23, D5S721) značená zeleným fluorochromem (Spectrum Green), druhý signál pokrývá oblast 5q31 (gen EGR1) a je označen oranžovým fluorochromem (Spectrum Orange). Normální nález v interfázních jádrech představuje dva červené a dva zelené signály odpovídající normálnímu počtu značených oblastí. V případě delece oblasti 5q31 jsou na interfázních jádrech pozorovány dva zelené a jeden oranžový signál, v případě monozomie chromozómu 5 je pozorován pouze jeden signál zelený a jeden oranžový.

LSI sonda 7q31 hybridizuje na chromozóm 7 také ve dvou oblastech s odlišnými emisními spektry. Jedná se o oblast centromery 7p11.1-q11.1 (lokus D7Z1) vykazující zelené emisní spektrum. Druhá oblast je 7q31 (lokus D7S486) vykazující oranžové emisní spektrum. Při vyhodnocování jsou v jádre s normálním karyotypem vidět dva zelené a dva oranžové signály. Při monozomii chromozómu 7 sledujeme pouze jeden červený a jeden zelený signál.



Obr. 6 Ideogram chromozómů 5 a 7 a vizualizace oblastí, na které se vážou sondy (Abbott Molecular, 2012)

LSI sonda 7q22/7q35 hybridizuje na chromozómu 7 ve dvou oblastech. Zelené emisní spektrum vykazuje oblast 7q22 (gen CUTL1, lokus D7S740) a oranžové emisní spektrum vykazuje oblast 7q35 (lokus D7S2419, D7S688, D7S2640). V přítomnosti obou chromozómů 7 jsou v mikroskopu pozorovány 2 oranžové a 2 zelené signály. Při monozomii pozorujeme pouze 1 oranžový a 1 zelený signál.



Obr. 7 Ideogram chromozómu 7 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda 7q22/7q35 (Kreatech Diagnostics, 2010-2012)

LSI sonda 20q (Abbott) hybridizuje v oblasti 20q12. Sonda je jednobarevná a při normálním nálezu pozorujeme 2 oranžové signály. V případě delece oblasti 20q12 se objevuje pouze jeden oranžový signál. LSI sonda 20q (Kreatech) hybridizuje ve dvou oblastech a je značena dvěma odlišnými fluorochromy, jedná se o tzv. „dual color“ sondu. Sonda hybridizuje k oblastem 20q11.21 (gen MAPRE1, lokus SHGC-144070, RH57467) a v oblasti 20q12 (gen PTPRT, lokus D20S108, D20S499). V normálním jádře jsou přítomny dva červené a dva zelené signály. Sonda CEP 7 hybridizuje v jedné oblasti chromozómu 7 (p11.1-q11.1), a to v oblasti centromery. Vykazuje oranžové emisní spektrum. V normálním jádře vidíme dva oranžové signály. Při nálezu monozomie je pozorován pouze jeden oranžový signál. Sonda CEP 8 se váže na oblast centromery chromozómu 8 (p11.1-q11.1). Může být použita sonda vykazující jak zelené emisní spektrum, tak oranžové emisní spektrum (rozhodnutí záleží na tom, s jakou další próbou ji budeme kombinovat). Normálním nálezem je pozorování např. 2 oranžových signálů. Změna počtu chromozómů koreluje se změnou počtu pozorovaných signálů.

## **5 VÝSLEDKY**

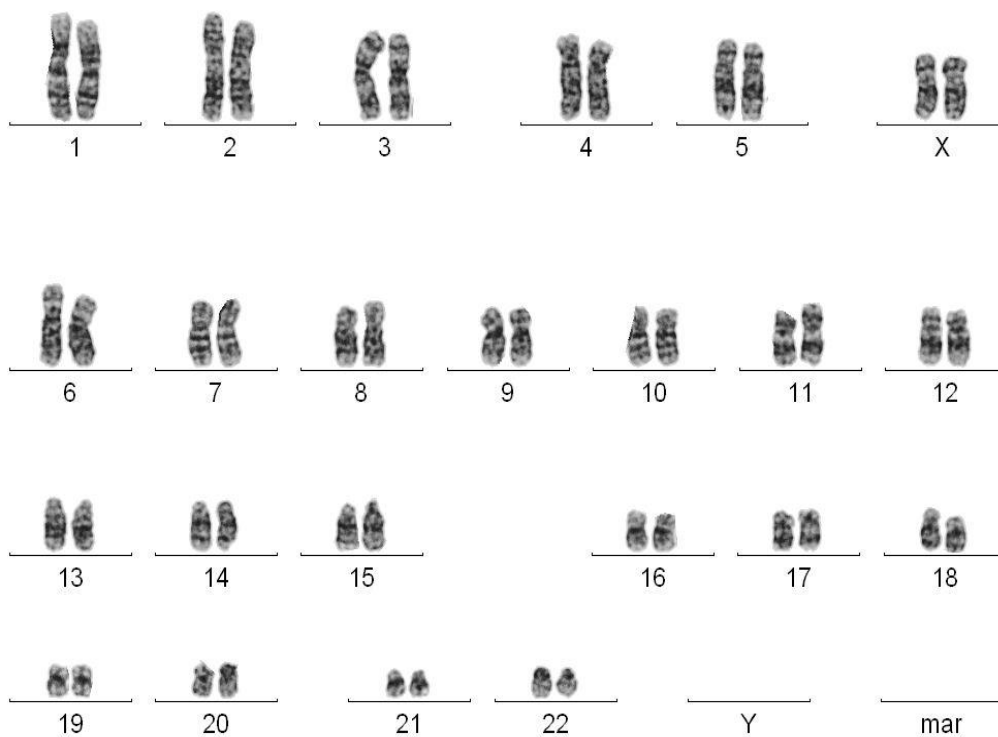
### **5.1 Klasická cytogenetika**

Klasickou cytogenetikou bylo vyšetřeno 5 pacientů s MDS. Prvním pacientem byl muž, u kterého bylo vyšetření indikováno z důvodu vyloučení/potvrzení MDS. Byly nalezeny pouze normální karyotypy. Tento pacient byl taktéž podroben vyšetření FISH, které potvrdilo normální nález (viz. dále, Tab. VIII - pacient 1). Druhou vyšetřovanou byla žena (kontrola stavu přetrvávající MDS). Cytogenetické vyšetření prokázalo normální nález, ten byl stejně tak potvrzen vyšetřením FISH, kterému byla pacientka podrobena (viz. dále, Tab. VIII - pacient 2). Třetím pacientem byl muž, u kterého mělo vyšetření monitorovat stav v průběhu léčby. Klasická cytogenetika odhalila přítomnost 8 klonů s del(5q) a -7 (monozomie), 2 klony pouze s del(5q). Vyšetření FISH, které bylo provedeno i u tohoto pacienta nález potvrdilo (viz. Tab. VIII - pacient 3). Pacientka č. 4 byla vyšetřována kvůli kontrole stávajícího stavu, byla odhalena přítomnost klonů s del(5q), vyšetření FISH nebylo provedeno. U pacientky č.5, která byla rovněž vyšetřena pro kontrolu stavu, nebyly žádné cytogenetické změny prokázány, vyšetření FISH nebylo provedeno. Více informací (pohlaví, rok narození, diagnóza v době vyšetření) jsou uvedeny v následující tabulce Tab. VII, na Obr. 8 a 9 jsou uvedeny vybrané karyotypy dvou pacientek.

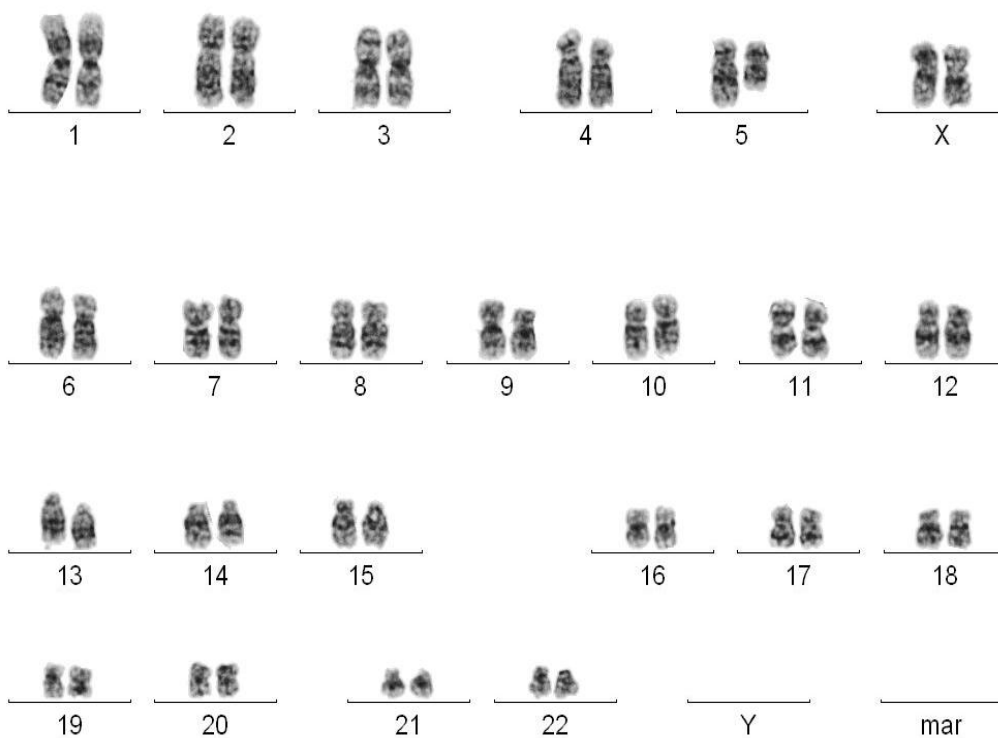
Tab. VII Výsledky vyšetření pacientů klasickou cytogenetikou

Číslo pacienta	Pohlaví	Rok narození	Diagnóza	Důvod vyšetření	Počet vyhodnocených mitóz	Karyotyp (počet)	Provedena FISH?
1	M	1995	chronická idiopatická trombocytopenická purpura	vyloučení/potvrzení MDS	10	46,XX (10/0)	ANO
2	Ž	1970	RA/RCMD	kontrola stavu	11	46,XX (11/0)	ANO
3	M	1940	RA - 5q-	kontrola stavu v průběhu léčby	10	45,XY, 5q-, -7 (8) 46,XY, 5q- (2)	ANO
4	Ž	1940	RA - 5q-	kontrola stavu	20	46,XX, 5q- (19) 46,XX (1)	NE
5	Ž	1970	RCMD	kontrola stavu	20	46,XX (20)	NE

Legenda: Ž = žena, M = muž, MDS = myelodysplastický syndrom, RA = refrakterní anémie, RCMD = refrakterní cytopenie s dysplazií ve více liniích, FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace



Obr. 8 Pacientka č. 5 - karyotyp 46,XX

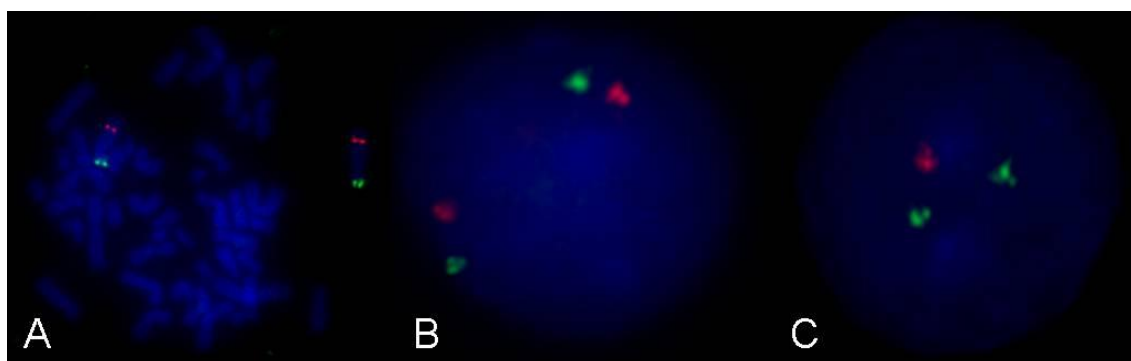


Obr. 9 Pacientka č. 4 - karyotyp 46,XX, del(5q)

## 5.2 Molekulární cytogenetika - FISH

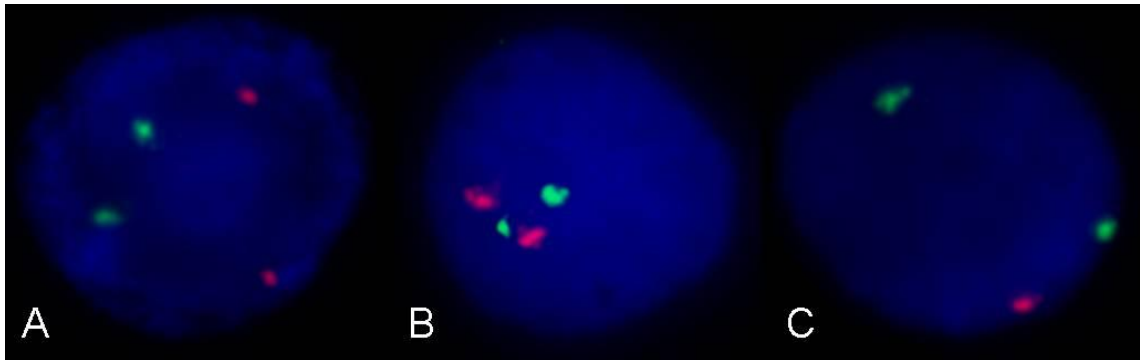
Vyšetření FISH bylo provedeno u 11 pacientů, 6 žen a 5 mužů. U 3 pacientů bylo vyšetření FISH indikováno z důvodu kontroly dárcovské krevetvorby po transplantaci. Celkem 5 pacientů bylo podrobeno tomuto vyšetření z důvodu potvrzení/vyloučení klinické diagnózy MDS. U zbylých 3 pacientů se jednalo o kontrolní vyšetření nemocných s diagnózou MDS.

Pacient č. 1 byl muž, u kterého mělo vyšetření vyloučit/potvrdit přítomnost MDS. Cytogenetické změny nebyly prokázány. Pacient č. 2 byla žena, vyšetření FISH bylo indikováno z důvodu kontroly přetrvávajícího stavu MDS, změny nebyly prokázány. U pacienta č. 3 (muž) byl kontrolován stav MDS v průběhu léčby. Metoda FISH prokázala del(5q) a -7 (monozomie). Pacientka č. 4 byla vyšetřována z důvodu vyloučení/potvrzení přítomnosti MDS, cytogenetické změny nebyly prokázány. Pacient č. 5 a 6 (oba muži) byli po transplantaci KD, šlo tedy o kontrolu dárcovské krevetvorby, cytogenetické změny rovněž nebyly prokázány a byla potvrzena přítomnost dárcovské krevetvorby ve 100 % hodnocených buněk. Pacientka č. 7 byla vyšetřována z důvodu kontroly přetrvávající MDS. Vyšetření neprokázalo cytogenetické změny. U třech zbylých pacientů č. 9 (muž), č. 10 a 11 (ženy) se jednalo o vyšetření z důvodu vyloučení/potvrzení přítomnosti MDS. Ani u jednoho z nich vyšetření FISH neprokázalo cytogenetické změny. Více informací týkajících se pacientů (rok narození, diagnóza v době vyšetření, typ použité sondy) viz. Tab. VIII níže.



Obr. 10 A) sonda 5q31 navázaná na metafázních chromozómech (normální karyotyp); B) sonda 5q31 navázaná na interfázních chromozómech (normální karyotyp); C) sonda 5q31 navázaná na interfázních chromozómech (chybí jeden červený signál = delece oblasti 5q31)





Obr. 11 A) sondy 20q (SO) a CEP 8 (SG) navázané na interfázních chromozómech (bez cytogenetické změny); B) sonda 20q (Abbott) navázaná na interfázních chromozómech (bez cytogenetické změny); C) sondy CEP 7 (SO)/CEP 8 (SG) navázané na interfázních chromozómech (jeden červený signál = monozomie chromozómu 7)

Tab. VIII Výsledky vyšetření pacientů metodou FISH

Číslo pacienta	Pohlaví	Rok narození	Diagnóza	Důvod vyšetření	Sondy	Cytogenetická změna	Výsledek FISH
1	M	1995	chronická idiopatická trombocytopenická purpura	vyloučení/potvrzení MDS	CEP 7(SG)/8(SO)	NK	<b>normální nález</b>
2	Ž	1970	RA/RCMD	kontrola stavu	LSI 5q31 LSI 7q31 LSI 20q/CEP 8 (SG)	NK NK NK	<b>normální nález</b>
3	M	1940	RA - 5q-	kontrola stavu v průběhu léčby	LSI 5q31 CEP 7(SO)/8(SG)	Z Z	<b>5q-, -7</b>
4	Ž	1976	normocytární normochromní anémie	vyloučení/potvrzení MDS	LSI 5q31 LSI 7q31 LSI 20q CEP 7(SG)/8(SO)	NK NK NK NK	<b>normální nález</b>
5	M	1949	RA - po transplantaci	kontrola dárcovské krvinek	LSI 5q31	NK	<b>normální nález</b>
6	M	1963	RAEB-1 - po transplantaci	kontrola dárcovské krvinek	CEP 7(SG)/8(SO)	NK	<b>normální nález</b>

Číslo pacienta	Pohlaví	Rok narození	Diagnóza	Důvod vyšetření	Sondy	Cytogenetická změna	Výsledek FISH
7	Ž	1944	RAEB-2	kontrola stavu	LSI 5q31 LSI 7q31	NK NK	<b>normální nález</b>
8	Ž	1997	chronická idiopatická trombocytopenická purpura	vyloučení/potvrzení MDS	LSI 5q31 LSI 7q31 CEP 7(SO)/8(SG)	NK NK NK	<b>normální nález</b>
9	M	1954	progredující pancytopenie	vyloučení/potvrzení MDS	LSI 5q31 LSI 7q31 LSI 20q/CEP 8 (SG)	NK NK NK	<b>normální nález</b>
10	Ž	1953	leukoneutropenie	vyloučení/potvrzení MDS	LSI 5q31 LSI 7q22/7q35 LSI 20q/CEP 8 (SG)	NK NK NK	<b>normální nález</b>
11	Ž	1995	agranulocytóza	vyloučení/potvrzení MDS	CEP 7(SO)/8(SG)	NK	<b>normální nález</b>

Legenda: Ž = žena, M = muž, NK = normální karyotyp, Z = byla nalezena cytogenetická změna, MDS = myelodysplastický syndrom, RA = refrakterní anémie, RCMD = refrakterní cytopenie s dysplazií ve více liniích, RAEB = refrakterní anémie s nadbytkem blastů, FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace

## **6 DISKUZE**

Cytogenetika a molekulární cytogenetika se staly nedílnou součástí vyšetření hematologických malignit. Cytogenetika umožňuje analýzu celého nádorového genomu v jediném vyšetření. Její význam je jak diagnostický, tak prognostický. Výsledky cytogenetiky a molekulární cytogenetiky rovněž přispívají k volbě cílené terapie a podávají důležité informace o průběhu a vývoji onemocnění. Charakteristickým znakem myelodysplastického syndromu jsou především nebalancované chromozómové změny a specifická chromozómová změna, delece dlouhých ramen chromozómu 5, která charakterizuje samostatnou hematologickou podjednotku se specifickým léčebným přístupem.

Cílem bakalářské práce byla literární rešerše současných poznatků týkajících se cytogenetických změn a jejich klinického významu u nemocných s diagnózou myelodysplastického syndromu (MDS). Cílem praktické části pak bylo zvládnout základní cytogenetické zpracování hematopoetických buněk a karyotypování, naučit se a použít metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). To spočívalo v práci v laboratořích na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc, kde je biologický materiál pacientů s MDS (nebo s podezřením na MDS), vyšetřován. Úkolem bylo nejprve se naučit základním postupům v klinické laboratoři (správná manipulace s vyšetřovanou kostní dření, její zpracování a uchovávání), následně osvojit si principy cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření KD, naučit se rozpoznávat lidské chromozómy dle platné cytogenetické nomenklatury a sestavovat z nich karyotypy a osvojit si metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Cytogeneticky bylo vyšetřeno 5 pacientů, 2 s normálním karyotypem, 3 s chromozómovými změnami. Metodou FISH bylo vyšetřeno 11 nemocných s diagnózou MDS v různých stádiích onemocnění. Chromozómové změny byly nalezeny pouze u jednoho nemocného.

## **7 ZÁVĚR**

Bakalářská práce shrnuje ty nejdůležitější informace týkající se myelodysplastického syndromu. Jak jeho obecné charakteristiky, tak klasifikace, léčby, cytogenetických a molekulárně cytogenetických změn. Všechna dostupná data z literatury a z praxe na hemato-onkologické klinice jednoznačně potvrzují nezastupitelnou roli právě cytogenetických a molekulárně cytogenetických vyšetření, která jsou pro diagnózu a prognózu MDS nezbytná.

Myelodysplastický syndrom je klonální onemocnění krvetvorby vznikající na úrovni pluripotentní kmenové buňky. Je charakterizováno inefektivní hematopoézou a nárůstem apoptosy, s výslednou periferní cytopenií (Sloand *et al.*, 2007). Cytogenetické změny vyskytující se u 50 % nemocných jsou nezávislým prognostickým faktorem. Proto je cytogenetika nenahraditelnou metodou v rutinní klinické praxi pro potvrzení klinické diagnózy a volbu správné léčby u nemocných s diagnózou MDS.

## **8 LITERATURA**

Abbott Molecular. FISH Chromosome Search. Abbottmolecular.com [online]. ©2012 [cit. 2012-04-08].

Dostupné z: <http://www.abbottmolecular.com/chromosome/5.html>

Abbott Molecular. FISH Chromosome Search. Abbottmolecular.com [online]. ©2012 [cit. 2012-04-08].

Dostupné z: <http://www.abbottmolecular.com/chromosome/7.html>

Buliková, A. (2000): Krvetvorba. In: Lexová, S., Bourková, L., Buliková, 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: 461-469.

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

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

Cheson, B.D. (1997): The myelodysplastic syndromes. *Oncologist* 2: 28-39.

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

Červinek, L. O myelodysplastickém syndromu. In: *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně* [online]. Dec 12, 2009 [cit. 2012-03-06].

Dostupné z: <http://www.linkos.cz/myelodysplasticky-syndrom-2/o-myelodysplastickem-syndromu/>

Delforge, M. (2003): Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *The Hematology Journal* 4: 303-309.

- Doležel, J. (2011a): Metody studia chromozómů, Cytotaxonomie a cytogenetika, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, říjen 2011.
- Doležel, J. (2011b): Morfologie chromozómu, Cytotaxonomie a cytogenetika, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, říjen 2011.
- Garcia-Manero, G. (2010): Prognosis od myelodysplastic syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010: 330-337.
- Göhring, G., Giagounidis, A., Büsche, G., Hofmann, W., Kreipe, H.H., Fenaux, P., Hellström-Lindberg, E., Schlegelberger, B. (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: 319-322.
- Haase, D. (2008): Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. Ann Hematol 87: 515-526.
- Jarošová, M. (2000a): Metody 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.
- 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.
- Kreatech Diagnostics. REPEAT-FREE™ POSEIDON™ FISH Probes. Kreatech.com [online].© 2010-2012 [cit. 2012-04-08].
- Dostupné z: <http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/7q-7q227q36-dual-color.html>
- Kuglík, P., Oltová, A. (2008): Současné možnosti cytogenetických vyšetření u hematologických malignit. In: Klíma, J., Lomíček, J., (eds.): Hematologie:

Přehled maligních hematologických nemocí, 2., doplněné a zcela přepracované vydání, pp. 349-352, Grada Publishing, Praha.

Maeck, L., Haase, D., Schoch, C., Hiddemann, W., Alves, F. (2000): Genetic instability in myelodysplastic syndrome: detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in bone marrow samples with karyotype alterations. *Br J Haematol* 109: 842-846.

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

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

Mayer, J., Starý, J. (2002): Myelodysplastický syndrom. In: Mayer, J., Starý, J., Adam, Z., Buliková, A., Cetkovský, P., Čermák, J., Doubek, M., Faber, E., Geryk, E., Haškovec, C., Hrušák, O., Jarošová, M., Kalvodová, L., Klabusay, M., Kolcová, V., Penka, M., Protivánková, M., Sedláčková, Š., Slavičková, E., Táborská, E., Tomiška, M., Trka, J., Vorlíček, J., Žák, P.: *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): 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. (1999c): Molekulární cytogenetika. In: *Úvod do lidské cytogenetiky*, pp. 50-70, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Orazi, A., Czader, M.B. (2009): Myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol* 132: 290-305.

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. (2002). Krvetvorba. In: Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba, pp. 68-154, Finidr, Český Těšín.
- Sandberg, A.A., Meloni-Ehrig, A.M. (2010): Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments. *Cancer Genet Cytogenet* 203: 102-126.
- Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Pierce, S., Le Beau, M.M., Bennett, J.M., Greenberg, P., Germing, U., Haase, D. (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: 820-829.
- Sloand, E.M., Pfannes, L., Chen, G., Shah, S., Solomou, E.E., Barrett, J., Young, N.S. (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: 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): Genetická podstata rakoviny. In: *Genetika*, pp. 665-687, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno.
- 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., Haase, D., Haferlach, T., Kern, W., Bettelheim, P., Baumgartner, C., Sperr, W.R., Nösslinger, T., Wimazal, F., Giagounidis, A.A., Lübbert, M., Krieger O., Kolb, H.J., Stauder, R., Pfeilstöcker, M., Gattermann, N., Fonatsch, C., Aul, C., Germing, U. (2009): Meeting report: Vienna 2008 Workshop of the German-Austrian Working Group

for Studying Prognostic Factors in Myelodysplastic Syndromes. *Ann Hematol* 88: 607-611.

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

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

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield, C.D. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasm and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 113: 937-951.

Wikipedia. Haematopoiesis. [Wikipedia.org](http://en.wikipedia.org/wiki/Hematopoiesis) [online]. Mar 15, 2012 [cit. 2012-04-15].

Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hematopoiesis>

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: 2002-2005.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AML	akutní myeloidní leukémie
ATB	antibiotikum
<i>BFU-E</i>	<i>Burst Forming Unit - Erythroid</i> ; velmi časná fáze vývoje červené krvinky
BM médium	bone marrow medium; médium pro kostní dřev
bp	base pair; páry bazí
CCD kamera	charge-coupled device camera; kamera se speciální technologií snímání obrazu
CD	cluster of differentiation; diferenciační antigen
CEP	označení pro centromerickou sondu
<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 - Granulocyte 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-S</i>	<i>Colony Forming Unit - Spleen</i> ; dřívější označení pro pluripotentní kmenovou buňku/jednotku vytvářející kolonie ve slezině
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBSS	Earle's balanced salt solution; Earlův oplachovací roztok
FAB klasifikace	Francouzsko-americko-britská klasifikace
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
H	heparin
<i>HSCs</i>	<i>Hematopoietic Stem Cells</i> ; hematopoetické kmenové buňky
<i>in situ</i>	„na místě“
<i>in vitro</i>	„ve zkumavce“
IUD	intrauterine development; nitroděložní vývoj
K	kultivace
K24	kultivace 24 hodin
kb	kilobase; kilobáze
KD	kostní dřeň
LSI	označení pro lokusově specifickou sondu
<i>LTC-IC</i>	<i>Long Term Culture - Initiating Cell</i> ; dlouhodobá kultura krvetvorných buněk
mBAND	multicolor band; mnohobarevné pruhování
MDS	myelodysplastický syndrom
mFISH	multicolor FISH; mnohobarevná FISH

N	normální kultivace
NK	normální karyotyp
NK-buňky	natural killer buňky; druh lymfocytu
PK	periferní krev
RA	refrakterní anémie
RAEB	Refractory anemia with excess of blasts; refrakterní anémie s nadbytkem blastů
RARS	Refractory anemia with ring sideroblasts; refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RCMD	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia; refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií
RN	refrakterní neutropenie
rpm	rounds per minute; otáčky za minutu
RT	refrakterní trombocytopenie
RT	room temperature; pokojová teplota
SG	spectrum green; zelené spektrum
SO	spectrum orange; oranžové spektrum
SOP	standardní operační postup
SSC	saline-sodium citrate buffer; citrátový solný pufr
t-MDS	therapy-related MDS; sekundární MDS
WHO	World Health Organization; Světová zdravotnická organizace