

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza cytogenetických změn u
pacientů s monoklonálními
gamapatiemi**

Bakalářská práce

Šárka Šmídová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem následující bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Jany Balcárkové, Ph.D.

V Olomouci dne.....

Šárka Šmídová

Souhrn

Bakalářská práce se zabývá studiem chromozomových změn u pacientů s monoklonálními gamapatiemi, konkrétně s diagnózou monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) a mnohočetný myelom (MM).

V teoretické části práce jsou shrnuty základní informace o hematopoéze, leukopoéze a vzniku myelomové buňky. Dále jsou v teoretické části rozebrány nejčastěji se vyskytující monoklonální gamapatie (MGUS a MM), metody cytogenetiky a molekulární cytogenetiky, cytogenetické změny u MGUS a MM a jejich klinický význam.

Praktická část obsahuje soubor 20 pacientů s diagnózou MGUS či MM, u nichž byla provedena cytogenetická analýza metodou FICTION. Cytogenetické změny byly identifikovány celkem u 18 pacientů. Nejčastější chromozomální aberací v souboru pacientů byla přestavba *IGH* genu a trizomie chromozomu 15.

Bakalářská práce potvrdila význam molekulárně cytogenetické analýzy metodou FICTION a poukazuje na vysoký výskyt chromozomových změn u pacientů s MGUS a MM.

Summary

This thesis is focused on chromosomal abnormalities in patients with monoclonal gammopathies, especially with diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma (MM).

Theoretical part summarizes basic information about hematopoiesis, leucopoiesis and origin of myeloma cells. Furthermore, theoretical part describes the most frequent monoclonal gammopathies eg. MGUS and MM, cytogenetic and molecular cytogenetic methods, cytogenetic abnormalities in MGUS/MM and its clinical implications.

The practical part contains a cohort of 20 MGUS and MM patients examined using FICTION method. Cytogenetic changes were identified in 18 patients. The most common chromosomal aberrations were rearrangement of *IGH* gene and trisomy of chromosome 15.

This thesis confirmed the importance of molecular cytogenetic analysis using FICTION method and showed high frequency of chromosomal abnormalities in patients with MGUS and MM.

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí Mgr. Janě Balcárkové, PhD. za cenné rady, ochotu a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat za možnost pracovat na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc.

V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky, který mi vždy poskytl potřebné rady při práci v laboratoři.

OBSAH

1. Cíle práce	7
2. Úvod.....	8
3. Teoretická část	9
3.1. Hematopoéza.....	9
3.2. Lymfopoéza.....	10
3.4. Monoklonální gamapatie.....	12
3.4.1. Monoklonální gamapatie nejasného významu	12
3.4.2. Doutnající myelom.....	13
3.4.3. Mnohočetný myelom.....	13
3.5. Cytogenetické změny u MM/MGUS	16
3.5.1. Translokace genu <i>IGH</i>	17
3.5.2. Abnormality chromozomu 13	20
3.5.3. Delece genu <i>TP53</i> na chromozomu 17.....	21
3.5.4. Abnormality chromozomu 1	22
3.6. Cytogenetika a molekulární cytogenetika	23
3.6.1. Klasická cytogenetická analýza.....	23
3.6.2. Molekulárně cytogenetická analýza	23
4. Praktická část	27
4.1. Materiál a metody.....	27
4.1.1. Odběr a kultivace KD:.....	27
4.1.2. Zpracování KD.....	28
4.1.3. Převedení suspenze fixovaných buněk do alkoholu.....	29
4.1.4. FICTION.....	30
4.1.5. i-FISH.....	31
4.2. Vyhodnocení preparátů	33
5. Výsledky	34
5.1. Soubor pacientů s MGUS a asymptomatickým myelomem.....	35
5.2. Soubor pacientů s novou diagnózou MM a pacientů v progresi	37
6. Diskuze.....	38
7. Závěr	41
8. Seznam zdrojů.....	42
9. Seznam zkratk	49

1. Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma Cytogenetická analýza chromozomových změn u pacientů s monoklonálními gamapatiemi.
2. Stanovení genetických změn v souboru nemocných s MGUS/MM pomocí metody FICTION.
3. Seznámení se s chodem laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky na HOK FN Olomouc.
4. Kultivace buněk a cytogenetické zpracování materiálu.
5. Vyhodnocování výsledků pod fluorescenčním mikroskopem, statistická analýza výsledků.

2. Úvod

Monoklonální gamapatie jsou heterogenní skupinou onemocnění charakterizovanou přítomností monoklonálního imunoglobulinu v moči či v séru. U jedinců mladších 50 let je jejich výskyt ojedinělý (1 %), ve vyšších věkových skupinách stoupá a po přesáhnutí 85 let se vyskytuje u 8-15 % populace. Nejčastěji se vyskytující monoklonální gamapatií je monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), bezpříznakové onemocnění (Maisnar, 2013). Jedinci s MGUS se vyznačují trvale vyšším rizikem přechodu do nádorového stavu, nejčastěji do mnohočetného myelomu (MM). Z tohoto důvodu jsou pacienti s MGUS dlouhodobě monitorováni. V současné době je jasné, že MGUS předchází všem případům MM (Mikulášová *et al*, 2012).

MM je druhá nejčastější hemato-onkologická malignita, která představuje 10-15 % všech hemato-onkologických onemocnění. Postihuje častěji muže než ženy a je pozorována až dvakrát větší výskyt tohoto onemocnění u černošské populace oproti bělošské. Medián věku v době diagnózy je více než 60 let, v současné době však dochází ke snižování věkové hranice (Brown *et al*, 2008; Špička, 2006; Mičková *et al*, 2014). MM je v současné době nevléčitelné onemocnění s mediánem přežití 5-6 let (Pospíšilová *et al*, 2013).

Důležitým prognostickým faktorem u monoklonálních gamapatií je nález chromozomových změn v nádorových plazmatických buňkách. K jejich detekci jsou užívány cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody jako například G-pruhování, metoda FISH a její modifikace a další (Mikulášová, 2012).

3. Teoretická část

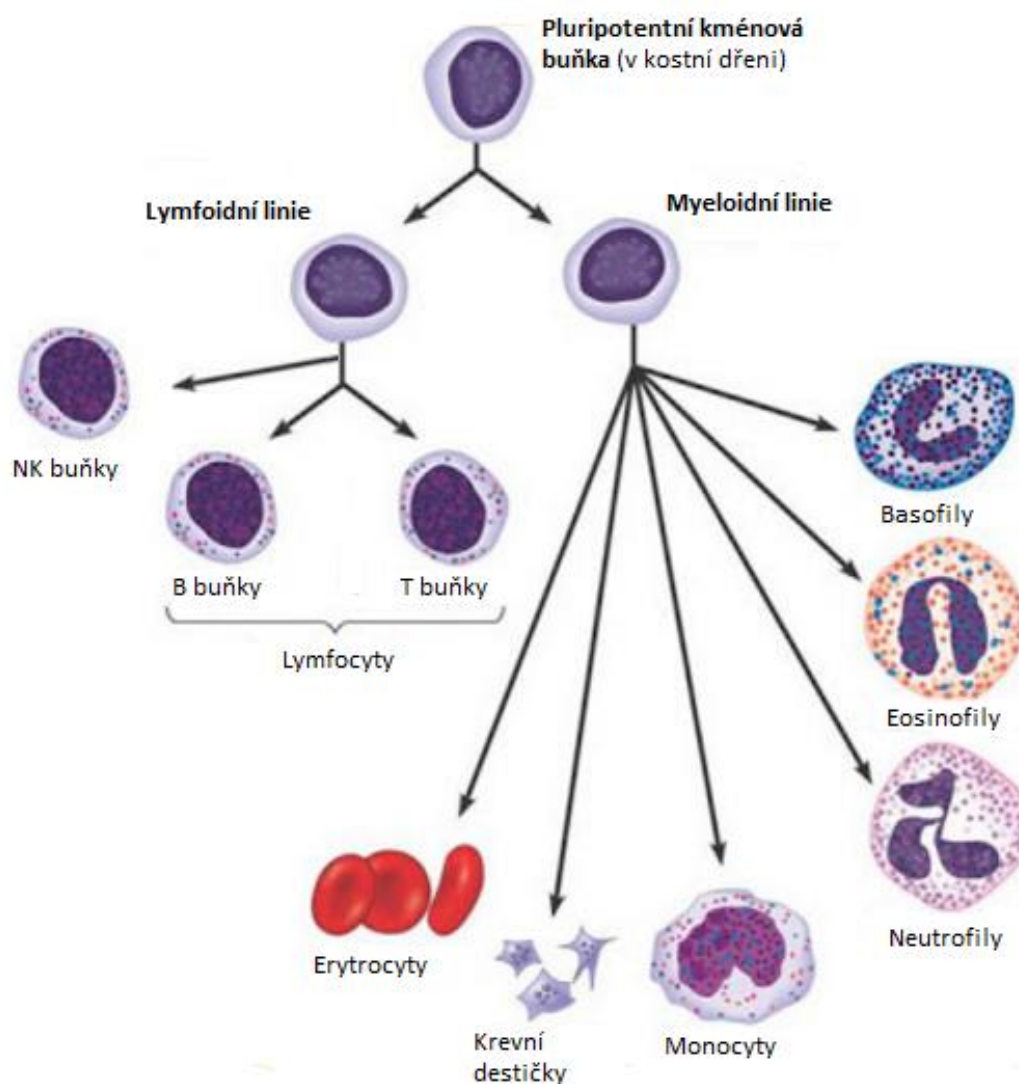
3.1. Hematopoéza

Tvorba buněčných součástí krve v krvetvorných orgánech se nazývá hematopoéza (krvetvorba). Hematopoéza je v průběhu vývoje organismu rozdělena do 3 období. Prvním je období mezoblastové, které začíná časně po oplození, kdy tvorba krevních elementů probíhá v oblasti žloutkového vaku. V hepatolínárním (fetálním) období dochází ke tvorbě krevních buněk převážně v játrech a ve slezině. Toto období začíná mezi 5. a 6. týdnem vývoje a pokračuje až do porodu. Od 20. týdne vývoje vznikají v klíčních kostech a později i v ostatních kostech, dutiny vyplněné prokrvenou pojivou tkání, ve kterých se začínají tvořit krvetvorné buňky. Toto období se nazývá medulární a krvetvorba tedy probíhá hlavně v kostní dřeni.

Jednotlivá období na sebe navazují a často se překrývají, čistě dřeňová krvetvorba začíná až ve 2-3 týdnu po narození. Zatímco po narození probíhá aktivní krvetvorba ve všech kostech, postupem času zůstává jen v hrudních kostech a obratlích.

Základem pro tvorbu krevních buněk je hemopoetická kmenová buňka (HSC), která je pluripotentní, má schopnost obnovy a v rámci hemopoézy se může vyvíjet jakýmkoli směrem. (Lexová, 2000). Z kmenové buňky pak vznikají dvě základní linie – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie se dále diferencují erytrocyty, trombocyty, granulocyty a monocyty. Z lymfoidní linie vznikají lymfoblasty, ze kterých pak diferenciací vznikají T a B – lymfocyty nebo NK (natural killer cells) buňky. (Hořejší *et* Barůňková, 2009). Stručné schéma hematopoézy je uvedeno na obrázku 1.

Obrázek 1: Schéma hematopoézy (upraveno podle www.cikgurozaini.blogspot.cz)



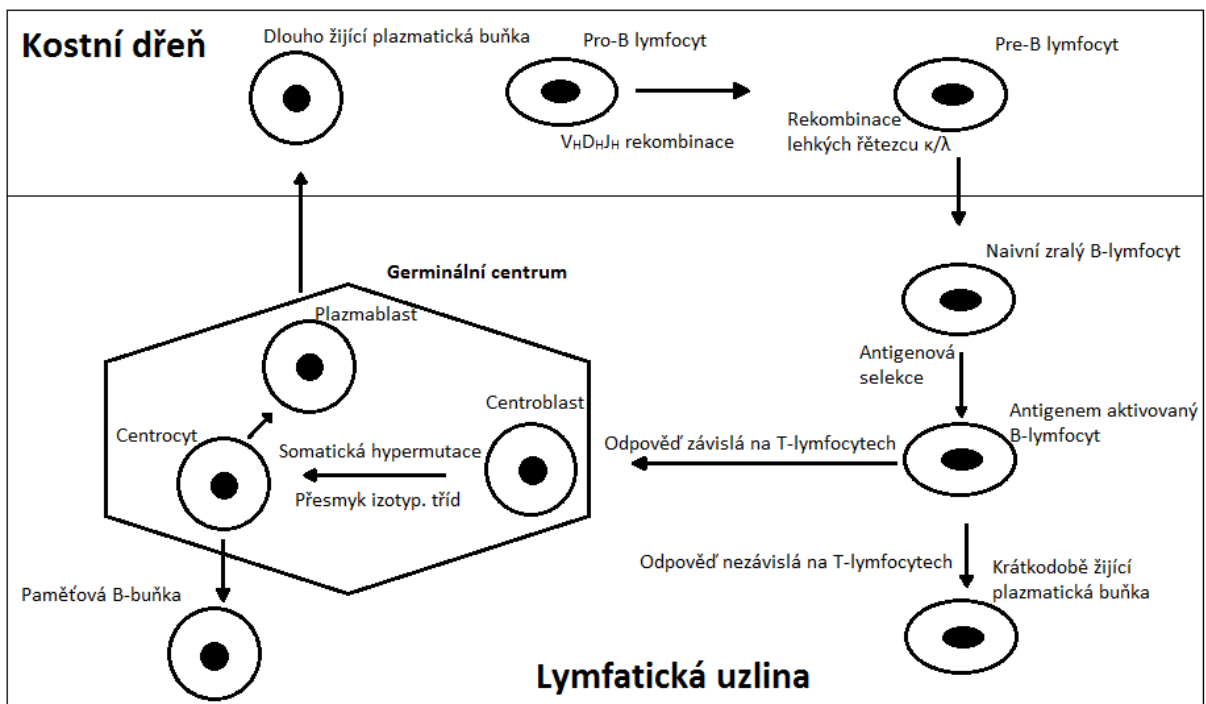
3.2. Lymfopoéza

B-lymfocyty během svého vývoje prochází několika procesy modifikace DNA v genech pro jednotlivé řetězce imunoglobulinů. Geny kódující řetězce imunoglobulinů se nacházejí v genových komplexech a v průběhu vývoje lymfocytu probíhá jejich přeskupování.

Gen pro těžký řetězec se nachází na chromozomu 14 a skládá se ze subgenů V, D a J. V pro-B lymfocytu, který se vyvinul z lymfoidní kmenové buňky, probíhá nejprve vyštěpení úseku mezi náhodným D a J segmentem (D-J přeskupení), a poté vyštěpení úseku mezi již vzniklým DJ segmentem a některým ze segmentů V (V-D přeskupení). Pro proběhlé VDJ rekombinaci vzniká pre-B lymfocyt, ve kterém dochází k přeskupování genů pro lehké

řetězce (kappa nebo lambda) stejným principem, jako u těžkého řetězce. Gen pro řetězec kappa je umístěn na chromozomu 2 a gen pro řetězec lambda se nachází na chromozomu 22. Nejdříve dochází k přeskupování úseků řetězce kappa. Není-li úspěšné, dochází k přeskupování úseků řetězce lambda. Pokud dojde k úspěšnému přeskupení, je lehký řetězec schopen vytvořit s těžkým kompletní povrchový IgM. Po těchto procesech vzniká naivní zralý B-lymfocyt, který putuje do lymfatických uzlin. V sekundárních lymfoidních orgánech se zralý B-lymfocyt setkává s antigenem a diferencuje se na krátkodobě žijící plazmatickou buňku sekretující hlavně IgM nebo se přesune do germinálního centra lymfatické uzliny, kde podstupuje somatickou hypermutaci (mutace již přeskupených V segmentů) a přesmyk imunoglobulinových tříd, které jsou zdrojem variability protilátek. Z buňky, po proběhlé somatické hypermutaci a izotypovém přesmyku, může vzniknout dlouho žijící plazmatická buňka, která migruje do kostní dřeně nebo paměťová plazmatická buňka, která se uplatňuje při sekundární imunitní odpovědi v lymfatické uzlině. Plazmatické buňky jsou konečným stádiem vývoje B-lymfocytů (Hořejší *et* Bartůňková, 2009; Balcárková *et al*, 2007; Peakman *et* Vergani, 2010; Hallek *et al*, 1998). Vývoj B-lymfocytu je zobrazen na obrázku 2.

Obrázek 2: Vývoj B - lymfocytu (upraveno podle Chng *et al* 2005)



3.3. Vznik myelomové buňky

Maligní mutace B-lymfocytů probíhá již ve folikulu lymfatické tkáně nebo v paměťových plazmatických buňkách. Myelomová buňka vzniká z buněk germinálního centra, které již dokončily somatickou hypermutaci a izotypový přesmyk, nebo z dlouho žijících plazmatických buněk v kostní dřeni (Chng *et al*, 2005). Vývojová řada myelomových buněk se liší od fyziologického procesu vývoje nekontrolovatelnou proliferací a dlouhověkostí myelomové buňky (Adam *et al*, 1999). Jedná se o jeden klon plazmatických buněk, které produkují monoklonální imunoglobulin (paraprotein). Tyto protilátky mají jednu specifitu a jsou jednoho izotypu (Hořejší *et Bartůňková*, 2009). Nejčastěji jsou paraproteiny tvořeny kompletní molekulou imunoglobulinu, zejména typu IgG, v menší míře IgA, popřípadě z volných lehkých řetězců (Peakman *et Vergani*, 2010).

3.4. Monoklonální gamapatie

Monoklonální gamapatie jsou heterogenní skupinou onemocnění, která je charakterizována proliferací jednoho nebo více klonů plazmatických buněk produkujících monoklonální imunoglobulin (paraprotein, M-protein), který je detekovatelný v séru, či moči. Monoklonální protein se může skládat z intaktní imunoglobulinové molekuly, z jednoho druhu lehkého řetězce, nebo velmi vzácně pouze z těžkých řetězců (Tichý *et Maisnar*, 2006).

3.4.1. Monoklonální gamapatie nejasného významu

Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je asymptomatické onemocnění charakterizované přítomností monoklonálního imunoglobulinu v séru (< 30 g/l) a přítomností méně než 10 % plazmatických buněk v kostní dřeni (Adam *et al*, 1999). Podrobnější kritéria pro stanovení MGUS jsou uvedena v tabulce 1.

MGUS se vyskytuje u 1 % populace starší 50 let a frekvence se zvyšuje až na 10 % u osob starších 75 let (Peakman *et Vergani*, 2010). U pacientů s MGUS bývá zaznamenán přechod do maligního stadia – MM. Přesný mechanismus přechodu MGUS do MM není známý, ale předpokládá se klíčová interakce mezi plasmatickými buňkami (PB) a mikroprostředím KD (Adam *et al*, 2014). U plazmatických buněk se již v tomto stádiu

vyskytují genetické změny, které vedou k pozměněným interakcím mezi PB a mikroprostředím KD a zvýšené proliferační schopnosti buněk.

3.4.2. Doutnající myelom

Doutnající myelom (SMM) je premaligní onemocnění plazmatických buněk charakterizované vyšším zastoupením PB v KD (10-60 %) a zvýšenou koncentrací M-Ig (>30 g/l). Jedná se prakticky o mezistádium mezi MGUS a MM s vyšším rizikem progresu. Riziko progresu dosahuje prvních 5 let 10 % a poté klesá, na rozdíl od MGUS, kdy je riziko progresu po letech konstantní. Jedná se o bezpříznakové onemocnění s absencí orgánového poškození (Rajkumar, 2015; Van de Donk *et al*, 2016). Podrobnější kritéria pro stanovení SMM jsou uvedena v tabulce 1.

3.4.3. Mnohočetný myelom

MM je onemocnění charakteristické přítomností monoklonálního imunoglobulinu v séru a/nebo v moči, bez určení koncentrace. V kostní dřeni jsou přítomny klonální plazmocyty, popřípadě je plazmocytem prokázán biopsií tkáň.

MM se odlišuje od MGUS a SMM přítomností orgánového poškození. Mezi nejčastější projevy onemocnění patří osteolytické kostní změny a patologické fraktury. Dalším projevem může být anémie, způsobená látkami, které mohou produkovat myelomové buňky. V důsledku masivní produkce lehkých řetězců, které produkují myelomové buňky, může dojít k poškození ledvin a tím k narušení renální funkce. Běžným příznakem je hyperkalcémie, hyperviskozita aj. (Adam *et al*, 2002). Kritéria poškození orgánů a tkání „CRAB“, jsou shrnuta v tabulce 2.

Tabulka 1: Srovnání kritérií MGUS, SMM, MM (převzato od Hájek *et al*, 2012)

MGUS	Doutňající myelom	Mnohočetný myelom
Koncentrace monoklonálního imunoglobulinu < 30 g/l	Koncentrace monoklonálního imunoglobulinu ≥ 30 g/l a/nebo počet klonálních plazmocytů v kostní dřeni ≥ 10 %	Je přítomen monoklonální imunoglobulin v séru a/nebo v moči (bez specifikace koncentrace)
Počet klonálních plazmocytů v kostní dřeni < 10 % při cytologickém a event.. i histologickém vyšetření (pokud bylo provedeno)		V kostní dřeni jsou přítomny klonální plazmocyty a nebo je plazmocytom prokázán biopsií tkáně
Není poškození orgánů či tkání myelomem (kostní ložiska) a nejsou další symptomy)	Není přítomno poškození orgánů či tkání myelomem (včetně kostních ložisek) a nejsou jiné symptomy	Je přítomno poškození orgánů a tkání myelomem tak, jak je definováno v kritériích „CRAB“
Není jiná B-lymfoproliferativní choroba. Není přítomna AL-amyloidóza, nebo choroba z ukládání lehkých či těžkých řetězců anebo jiný typ poškození organismu monoklonálním Ig.		Symptomatický nesekreční myelom Prokázána infiltrace kostní dřene klonálními plazmocyty, bez průkazu monoklonálního imunoglobulinu, ale přítomny známky poškození orgánů

Tabulka 2: CRAB - Kritéria poškození orgánů či tkání mnohočetným myelomem (převzato od Hájek *et al*, 2012)

Kritérium dysfunkce orgánů	Podrobnější definice symptomů
C - Hyperkalcémie	Kalcium > 2,75 mmol/l, nebo o 0,25 nad horní hranicí normálního rozmezí
R - Selhání ledvin	Kreatin > 177 μ mol/l
A - Anémie	Hemoglobin < 100 g/l nebo 20 g/l pod dolní hranicí normálního rozmezí
B - Kostní změny	Lytická kostní ložiska, nebo osteoporóza s kompresivními frakturami
Další s myelomem a gamapatií související nálezy	Symptomatická hyperviskozita, amyloidóza, opakující se bakteriální infekce

3.4.3.1. Diagnóza MM

Určení diagnózy MM je založeno na stanovení přítomnosti minimálně 10 % plazmatických buněk v KD, záchytu monoklonálního imunoglobulinu v séru nebo v moči a přítomnosti kostních lézí.

U pacientů s podezřením na MM se obvykle provádí několik skriningových vyšetření. Mezi nejčastější vyšetření patří krevní obraz, sedimentace erytrocytů, obsah iontů, kreatinu, kyseliny močové, albuminu, celkové bílkoviny, dále elektroforéza séra a moči, kvantifikace polyklonálních imunoglobulinů a rentgenový snímek skeletu se zaměřením na bolestivá místa.

Při diagnóze MM jsou používána i specifická vyšetření jako je průtoková cytometrie a cytogenetické vyšetření. Pomocí průtokové cytometrie je možné zjistit zastoupení plazmatických buněk v KD, stanovit jejich klonalitu a určit typ exprimovaného lehkého řetězce. Průtokovou cytometrií je možné použít k detekci minimální reziduální nemoci. Cytogenetické vyšetření je důležité pro určení prognózy a může pomoci zvolit vhodný léčebný postup.

Pro rozlišení stadií MM jsou užívány nejčastěji dva systémy. První byl vytvořen roku 1975 Duriem a Salmonem a je založen na stanovení koncentrace vápníku, hemoglobinu, množství exkretovaných lehkých řetězců v moči a množství imunoglobulinů. Z těchto údajů se dá dále odvodit celkové množství myelomových buněk. Druhý, v roce 2005 vytvořený systém: The international staging system (ISS), je založen na určení množství Beta₂-mikroglobulinu a sérového albuminu. Tento způsob však nepodává informaci o celkovém množství myelomových buněk (Hájek *et al*, 2012). V roce 2015 byl tento systém revidován a byl doplněn o nepříznivé cytogenetické změny jako t(4;14), t(14;16), del(17p) (Palumbo *et al*, 2015).

3.4.3.2. Léčba MM

V současné době se nedoporučuje léčba pacientů s MGUS nebo asymptomatickým myelomem, ale je vhodné sledování pacientů v pravidelných intervalech. Léčba je zahájena při progresi do symptomatického onemocnění.

Dříve byla léčba založena na podání alkylačních cytostatik s kortikoidy. Během posledních 10 let došlo k objevu nových léků a použití jejich různých kombinací v terapii. Standardně jsou v léčbě používány inhibitory proteazomu (bortezomib, carfilzomib), imunomodulační léky (thalidomid, lenalidomid, pomalidomid). U vhodných pacientů se přistupuje k autologní transplantaci hematopoetických buněk (ASCT). Kombinace nových

léků a ASCT je považována za zlatý standart v léčbě MM. Další možností léčby je použití monoklonálních protilátek proti receptorům na povrchu myelomových buněk např. daratumumab (anti CD38), která se využívá zejména v léčbě pacientů s relabujícím a refrakterním mnohočetným myelomem. (Pospíšilová *et al*, 2013; Jelínek *et al*, 2015).

Navzdory veškeré dostupné terapii dochází k relapsům a MM zůstává stále nevléčitelným onemocněním s mediánem přežití 5-6 let (Pospíšilová *et al*, 2013).

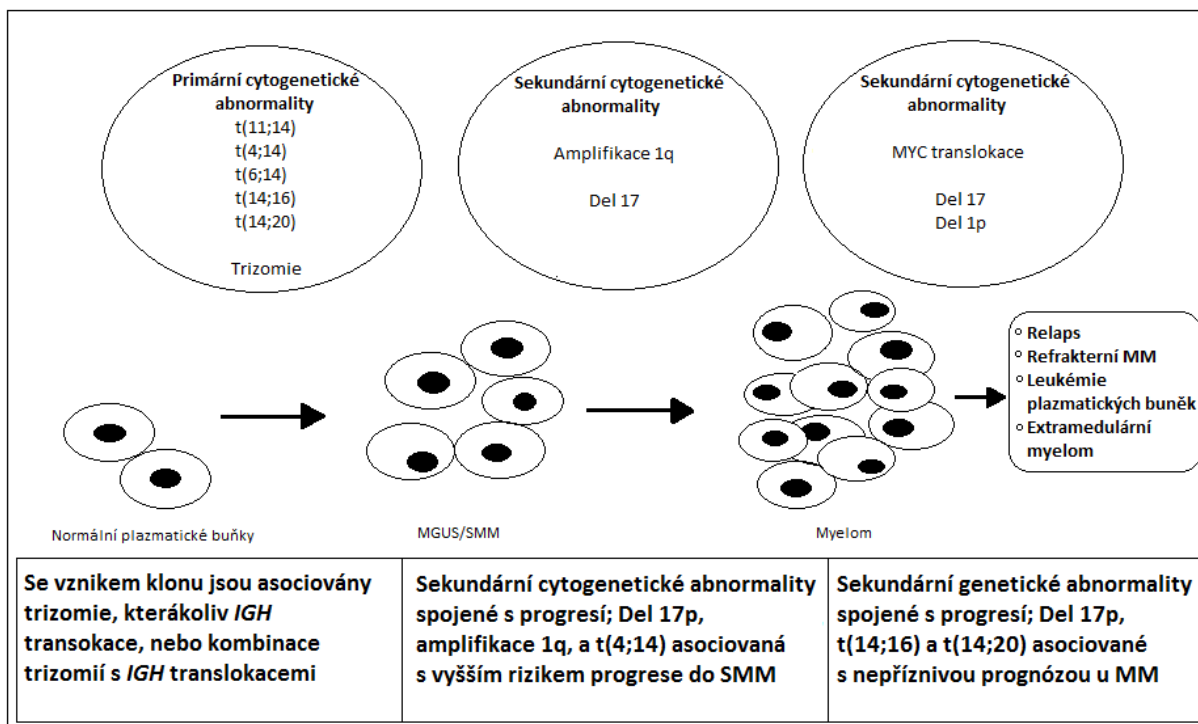
Mezi monoklonální gamapatie jsou dále řazeny méně časté choroby jako například Waldenströmova makroglobulinemie, AL-amyloidóza a choroba z ukládání lehkých řetězců (Adam *et al*, 1999).

3.5. Cytogenetické změny u MM/MGUS

Jednou z vlastností nádorové buňky je její chromozomová nestabilita, která se projevuje změnami počtu a struktury chromozomů. Mezi strukturní změny řadíme translokace, delecce, inverze a duplikace. Všechny tyto změny vedou v konečném důsledku ke změně exprese určitých genů, ke změně funkce buňky a následně v její nádorovou transformaci. U monoklonálních gamapatií je proto analýza cytogenetických změn významná a to hlavně z prognostického hlediska (Mikulášová *et al*, 2012).

Genetické změny můžeme rozdělit na primární a sekundární. Primární změny jsou detekovatelné již ve stádiu MGUS. Mezi tyto změny patří: translokace genu *IGH*, trizomie chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21 a delecce chromozomu 13 (Kuglík *et al*, 2006). Procentuální zastoupení geneticky abnormálních buněk je však u pacientů s MGUS celkově nižší než u pacientů s MM (Mikulášová *et al*, 2012). Sekundární změny jsou často spojeny s progresí onemocnění. Mezi sekundární změny řadíme delecce genu *TP53* a nadpočetné kopie oblasti 1q21 a delecce 1p32. Genetické změny můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: hyperdiploidie, které se vyskytují přibližně u 50 % pacientů a jsou charakteristické trizomiemi lichých chromozomů a nižším výskytem translokace zahrnující *IGH* gen a nonhyperdiploidie s častým výskytem translokací *IGH* genu lokalizovaném na chromozomu 14 (Mičková *et al*, 2014; Kuglík *et al*, 2008; Balcárková *et al*, 2007). Vznik cytogenetických změn u MGUS a MM je zobrazen na obrázku 3.

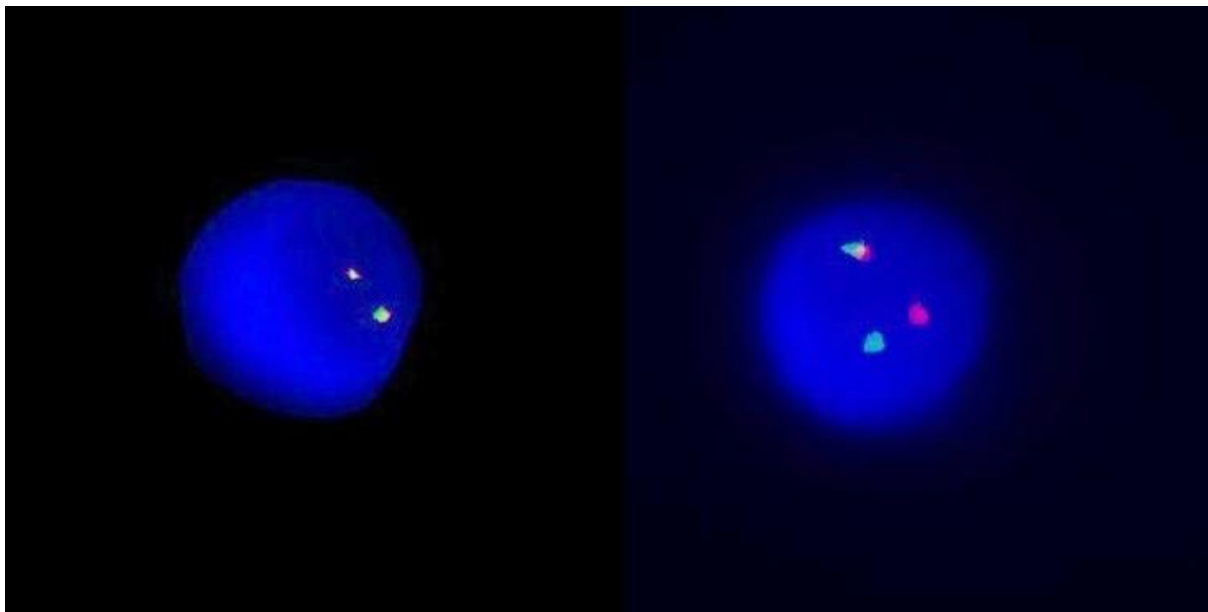
Obrázek 3: Vznik cytogenetických změn u MGUS/MM (upraveno podle Rajan *et* Rajkumar 2015)



3.5.1. Translokace genu *IGH*

Translokace zahrnující gen *IGH* (14q32) představují nejčastější chromozomovou přestavbu jak u MM, tak u MGUS (Mičková *et al*, 2014). Partnerské geny v těchto translokacích nejsou náhodné, zahrnují hlavně lokusy 11q13 (*CCND1*), 4p16 (geny pro *FGFR3* a *MMSET*), 16q23 (*MAF*), 6p21 (*CCND3*) a 20q12 (*MAFB*). Tyto partnerské geny jsou v důsledku translokace přemístěny k blízkosti zesilovačů transkripce *IGH* genu a to vede k jejich deregulaci (Balcárková *et al*, 2007).

Obrázek 4: Fotografie plazmatické buňky s fyziologickým nálezem (vlevo - 2F) a s detekovanou přestavbou genu IGH (vpravo – 1F, 1Č, 1Z) (převzato z HOK FNOL)



Translokace t(11;14)(q13;q32)

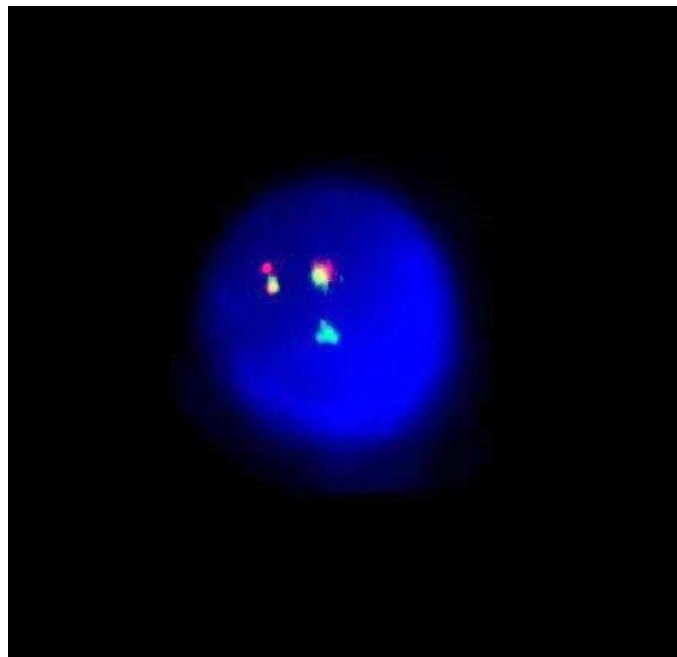
Mezi primární translokace náleží t(11;14)(q13;q32), která patří k nejčastějším přestavbám *IGH* lokusu (Kuglík *et al*, 2008). U pacientů s MGUS se vyskytuje přibližně v 13 % případů a u MM v 16 % případů (Mikulášová *et al*, 2012). Důsledkem je up-regulace cyklinu D1, který není v normálních plazmatických buňkách exprimován a vede k progresi buněčného cyklu tím, že dochází k rychlejšímu přechodu z G1 fáze do S fáze (Fonseca *et al*, 2002). Jako jediná z translokací je t(11;14) spojena s příznivou prognózou (Mikhael *et al*, 2013).

Translokace t(4;14)(p16;q32)

Translokace t(4;14)(p16;q32) je u osob s MGUS popisována v méně než 10 %. U pacientů s MM se vyskytuje ve 14 % případů a je spojována se středně nepříznivou prognózou (Mičková *et al*, 2014). U této translokace dochází k deregulaci dvou genů: genu *MMSET* (multiple myeloma SET domain) na derivovaném chromozomu 4 a *FGFR3* (gen pro receptor fibroblastového růstového faktoru 3) - na derivovaném chromozomu 14. Protein MMSET je chromatin remodelující protein s histon methyltransferázovou aktivitou. Ztráta exprese proteinu MMSET u buněčných linií s t(4;14) vede ke snížené adhezi buněk, zpomalení

buněčného růstu a k indukci apoptózy. Následkem translokace dochází k ektopické expresi tyrozin kinázového receptoru (FGFR3) zapojeného do přenosu signálu regulujícího růst a diferenciaci buněk v mnoha tkáních, ale jeho role v patogenezi MM zůstává zatím neznámá (Balcárková *et al*, 2016).

Obrázek 5: Fotografie plazmatické buňky s detekovanou translokací t(4;14) (2F, 1Z, 1Č) (převzato z HOK FNOL)



Translokace t(14;16)(q32;q23)

Translokace t(14;16)(q32;q23) je u pacientů s MGUS vzácná a u pacientů s MM se vyskytuje zhruba v 5 %. Zatímco u MM je spojována s agresivním průběhem nemoci, v progresi z MGUS do MM nebyl zatím prokázán žádný význam.

Následkem této translokace je deregulovaný *c-MAF* proto-onkogen. Protein c-MAF je transkripční faktor, který ovlivňuje základní buněčné pochody včetně těch, které zahrnují IL-6, cytokiny a cyklin D2, který dereguluje přímou vazbou na promotor tohoto genu (Mičková *et al*, 2014).

Translokace t(14;20)(q32;q12)

Translokace t(14;20) se vyskytuje u 2 % pacientů s MM a je spojena se špatnou prognózou. Pokud je t(14;20) zjištěna u MGUS, tak je spojena s dlouhodobou stabilitou MGUS a následně pozdním přechodem do MM. Tato translokace dereguluje onkogen *MAFB*, jehož produktem je transkripční faktor MAFB, který dereguluje stejné geny jako transkripční faktor c-MAF zahrnutý v t(14;16) (Ross *et al*, 2010; Sonneveld *et al*, 2017).

Sekundární translokace

Sekundární translokace mohou být přítomny jen v některých nádorových buňkách a jsou často doprovázeny komplexními přestavbami a nebalancovanými změnami jako jsou duplikace, delece apod.

Translokace t(8;14)(q24;32)

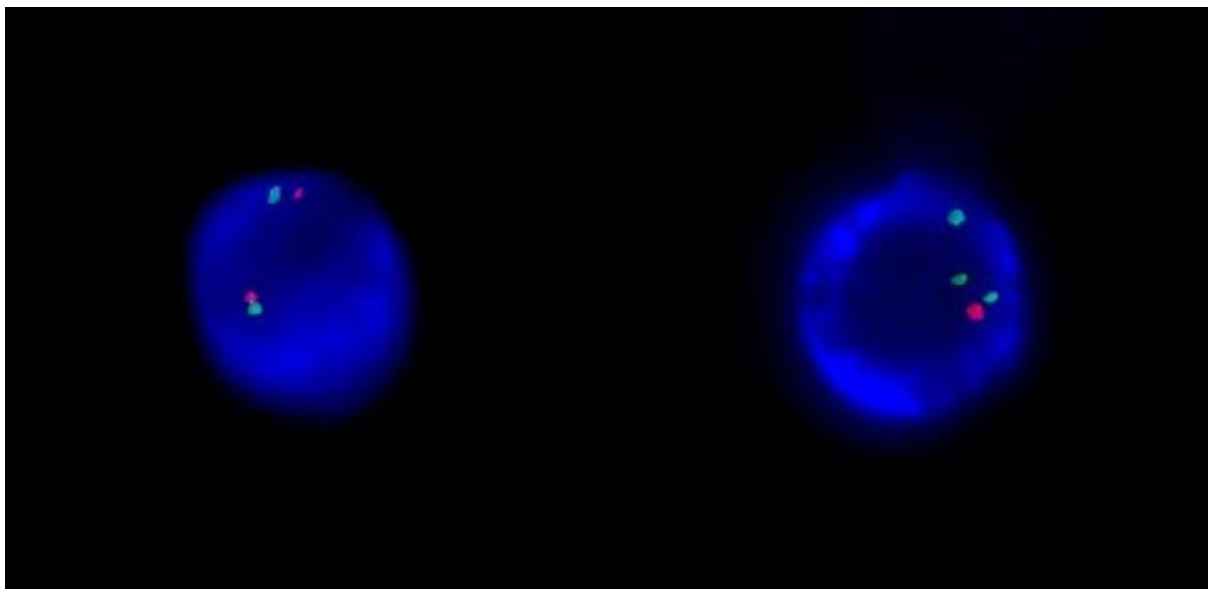
Mezi nejčastější sekundární změny patří translokace t(8;14) zahrnující gen *IGH* a pro-onkogen *MYC*, který je umístěn v oblasti 8q24. Gen *MYC* kóduje transkripční faktor, který má důležitou roli v regulaci buněčného růstu, proliferaci, translaci proteinů tumorogeneze aj. Nadměrná exprese onkogenu *MYC* je spojována s agresivním průběhem MM a jeho horší odpovědí na léčbu. U MM se tento typ translokace vyskytuje až u 15 % pacientů, zatímco u pacientů s MGUS se nevyskytuje (Mičková *et al*, 2014; Balcárková *et al*, 2016).

3.5.2. Abnormality chromozomu 13

U pacientů s MM či MGUS může docházet k delecím nebo monozomiím chromozomu 13. Nejvýznamnějším místem zasaženým delecí je oblast zahrnující nádorový supresorový gen *RBI* (13q14) (Mičková *et al*, 2014). Produkt genu *RBI*, je protein pRB je známý jako regulátor buněčného cyklu, který je schopný zastavit buňku v G1 fázi (Goodrich, 2006). Protein pRB také snižuje genovou expresi interleukinu 6 (IL-6), který přispívá k autonomnímu růstu myelomových buněk. Nepřítomnost pRB tedy podporuje růst myelomových buněk (Juge-Morineau *et al*, 1996). U MGUS je výskyt delece *RBI* shodný jako u pacientů s MM, kde je popisován výskyt až v 50 % pacientů. Pokud se vyskytuje samostatně, bývá spojována

se středně příznivou prognózou, pokud se vyskytuje v kombinaci s translokacemi *IGH* genu, je považována za faktor zhoršující prognózu. (Balcárková *et al*, 2007; Mičková *et al*, 2014).

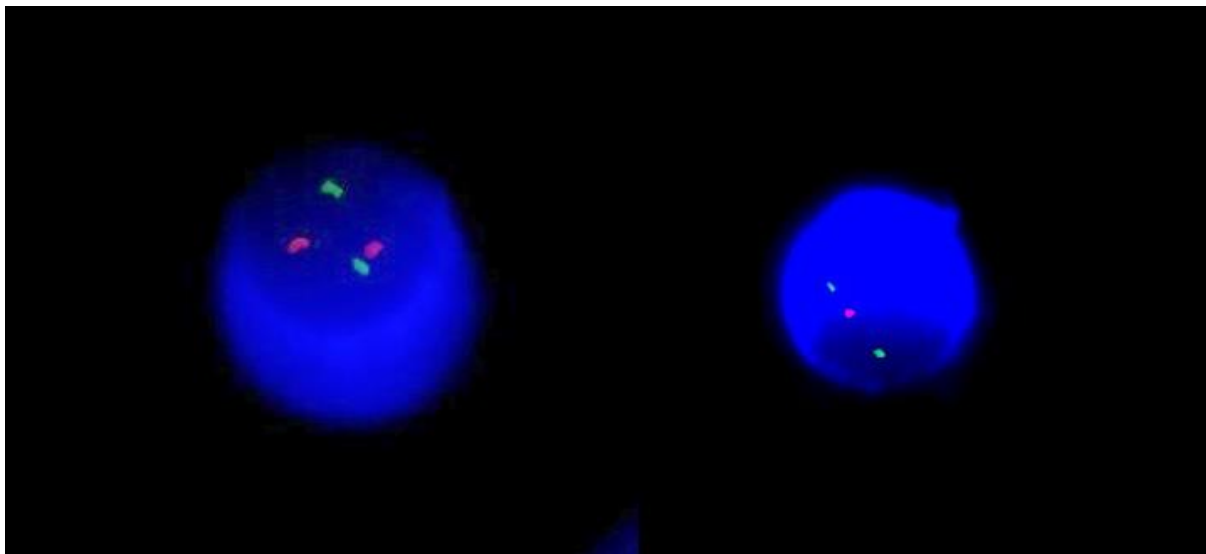
Obrázek 6: Fotografie plazmatické buňky s fyziologickým nálezem (vlevo – 2Č, 2Z) a s detekovanou delecí genu RB1 a trizomií chromozomu 15 (vpravo – 1Č, 3Z) (převzato z HOK FNOL)



3.5.3. Delece genu *TP53* na chromozomu 17

Gen *TP53* leží na krátkých ramenech chromozomu 17 v oblasti 17p13. Jeho produktem je protein, který je známý jako transkripční regulátor mnoha genů kontrolující růst buněk a jejich stárnutí. Podílí se na opravách DNA a řízení apoptózy (Mičková *et al*, 2014). Delece *TP53* je u MM považována za rizikový faktor a je spojována s agresivnějším průběhem nemoci a celkovou kratší dobou přežití (Prideaux *et al*, 2014). Pomocí metody FISH bývá delece detekována u 0 – 3 % pacientů s MGUS a u 5-34 % pacientů s MM. Četnost delece se zvyšuje s pokročilým stádiem MM, kde bývá detekována až u 40 % pacientů (Mičková *et al*, 2014).

Obrázek 7: Fotografie plazmatické buňky s fyziologickým nálezem (vlevo – 2Č, 2Z) a s detekovanou delecí genu TP53 (vpravo –1Č, 2Z) (převzato z HOK FNOL)



3.5.4. Abnormality chromozomu 1

Abnormality chromozomu 1 jsou jednou z nejčastějších cytogenetických změn vyskytujících se hlavně u MM. Dosud publikované výsledky ukazují, že krátké rameno (1p) postihují spíše delece, zatímco dlouhé rameno (1q) bývá zmnoženo (Marzin *et al*, 2006). Zisk 1q konstitutivně zahrnuje oblast 1q21, kde je lokalizován gen *CKS1B*, který podporuje degradaci proteinu p27. Protein p27 je inhibitor buněčného cyklu. Zisk oblasti 1q21 je spojovaný se špatnou prognózou. Abnormality 1q se již objevují u 15-20 % pacientů s MGUS, u nově diagnostikovaných pacientů s MM asi ve 43 % a u pacientů v relapsu se vyskytují až v 73 %. Předpokládá se, že tato změna je klíčová při progresi MGUS do MM (Munshi *et Anderson*, 2013; Mikulášová *et al*, 2012).

Delece 1p32 zahrnuje dva geny - *FAF1* a *CDKN2C*. Protein *CDKN2C* je cyklin-dependentní kináza zapojená do negativní regulace buněčného cyklu. Gen *FAF1* kóduje protein podílející se indukci apoptózy. Delece 1p32 je spojována se špatnou prognózou (Prideaux *et al*, 2014). U pacientů s MM se vyskytuje až ve 40 % případů. U MGUS je její výskyt mnohem nižší (Leone *et al*, 2008).

3.6. Cytogenetika a molekulární cytogenetika

3.6.1. Klasická cytogenetická analýza

Poprvé byla cytogenetická analýza použita při určení správného počtu chromozomů v lidské buňce. O tento objev se zasloužili Tjio a Levan roku 1956, když zjistili, že správný počet lidských chromozomů je 46 (Durmaz *et al*, 2015). Velký zlom v cytogenetice znamenal zavedení pruhovací techniky chromozomů mezi roky 1969 a 1970. Cassperson a Zech užili quinakrin (Q – pruhování) pro vytvoření světlých a tmavých pruhů na chromozomech viditelných pod fluorescenčním mikroskopem. Následovaly další techniky jako R-, C-, NOR a G-pruhování.

G-pruhování se stalo nejpoužívanější pruhovací metodou klasické cytogenetiky, díky němuž je možné detekovat jak strukturní, tak numerické chromozomové aberace (Kennan *et Zilfalil*, 2009; Ferguson-Smith, 2015). Je založeno na barvení Giemsovým barvivem v kombinaci s trypsinem (Kuglík *et al*, 2006; Kuglík *et al*, 2008). Analýza je prováděna na mitotických chromozomech. Chromozomy jsou vizualizované pomocí mikroskopu s digitální kamerou a počítačovou analýzou obrazu. Výsledkem G-pruhování je sestavení karyotypu. Normální karyotyp muže je 46,XY a ženy 46, XX.

Výchozím materiálem je krátkodobě kultivovaná kostní dřeň (24 h), dále se vyšetření provádí z periferní krve, lymfatických uzlin a dalších materiálů vhodných ke kultivaci. (Kuglík *et al*, 2006).

Přestože klasická cytogenetická vyšetření pomocí G-pruhování, dosáhla značeného rozvoje při vyšetřování hematologických malignit, mají při vyšetření MM a monoklonálních gamapatií výrazná omezení. Výsledky jsou značně limitované nízkou infiltrací kostní dřene nádorovými buňkami, jejich malou mitotickou aktivitou a špatnou morfologií chromozomů (Kuglík *et al*, 2008).

3.6.2. Molekulárně cytogenetická analýza

Mnoho chromozomových aberací je velmi obtížné detekovat pomocí metod klasické cytogenetiky, proto se v dnešní době užívají metody molekulární cytogenetiky. Základem těchto technik je *in situ* hybridizace, která se používá v různých obměnách v závislosti na typu

DNA sond. Od poloviny 80. let minulého století se nejčastěji využívají fluorescenčně značené sondy pro metodu FISH a její modifikace jako je CGH, arrayCGH a M-FISH (Kuglík *et al*, 2006).

3.6.2.1. Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je základní metodou molekulární cytogenetiky, která umožňuje zviditelnit jednotlivé sekvence aminokyselin umístěných na chromozomech nebo v interfázních jádrech buněk fixovaných na mikroskopických sklech.

Metoda FISH je založena na použití fluorescenčně značené jednořetězcové hybridizační sondy, tj. krátkého úseku DNA. Sonda se na základě komplementarity bází váže k cílové sekvenci DNA buněk, které se nacházejí na mikroskopickém preparátu. Existuje několik typů sond specifických pro jednotlivé chromozomy, jejich ramena, telomery, centromery, či jednotlivé geny. Místo navázání sondy můžeme pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu. Dle počtu a poloh fluorescenčních signálů lze zjistit početní i strukturní změny chromozomů.

Výhodou metody FISH je možnost pozorovat strukturní i početní chromozomové abnormality nejen na mitózách, ale i na interfázních jádrech. Tato modifikace klasické FISH se nazývá i-FISH. Při použití této metody není vyšetření omezeno počtem mitóz v buňkách, jelikož postačují interfázní jádra (Kuglík *et al*, 2008).

3.6.2.2. Mnohobarevná FISH

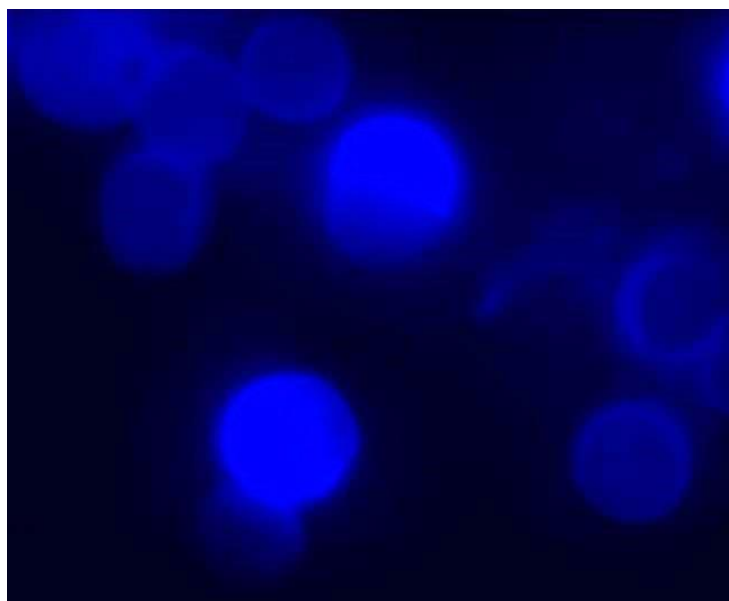
K identifikaci složitých nebo vícečetných přestaveb chromozomů se používá technika mnohobarevné FISH (M-FISH). Pro hybridizaci je použita sada celochromozomových sond, které jsou značeny kombinací pěti fluorochromů. Pomocí fluorescenčního mikroskopu a speciálního programu jsou následně chromozomy hodnoceny. Pro snadnější detekci jsou jednotlivým chromozomovým pářům počítačem, na základě nasnímaných fluorescenčních signálů, přiřazeny pseudobarvy.

Pro podrobnou analýzu jednotlivých chromozomů se používá metoda mBAND (mnohobarevné pruhování). Kombinací fluorochromů jsou naznačeny jednotlivé části chromozomů daného chromozomového páru (Michalová 2002; Michalová 2005).

3.6.2.3. FICTION (syn. cIg-FISH)

Metoda FICTION (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetic as a tool for the investigation of neoplasm) je modifikovaná metoda FISH, která je spojena s imunofluorescenční detekcí myelomových plazmatických buněk. Užívá se pro vyšší záchyt chromozomových aberací u monoklonálních gamapatií tím, že jsou hodnoceny jen barevně odlišené myelomové buňky (Kuglík *et al*, 2006). Využívá se imunofluorescenční značení cytoplazmy nádorových buněk pomocí protilátek proti lehkým řetězcům imunoglobulinů a následně interfázní FISH. Technika FISH se provádí klasickým způsobem (Leung *et al*, 2012).

Obrázek 8: Fotografie imunofluorescenčně značených plazmatických nádorových buněk. Nádorové plazmatické buňky mají světle modře zářící cytoplazmu (převzato z HOK FNOL)



3.6.2.4. CGH a arrayCGH

Techniky komparativní genomové hybridizace (CGH) a array-CGH dovolují studovat celý genom a jeho nebalancované změny. Tyto techniky jsou založeny na srovnání testované (nádorové) a normální (referenční) DNA. Testovaná DNA je značena jedním fluorochromem a kontrolní DNA jiným fluorochromem. Ze směsi obou DNA je vytvořena sonda, která je nahybridizována na sklo s metafázními chromozomy (CGH) nebo na čip s imobilizovanými oligonukleotidy (60 bp) o známé sekvenci.

Pomocí počítačového programu je následně analyzován poměr fluorescence podél chromozomů nebo oligonukleotidů. Technologie CGH je má citlivost 5-10 Mb a je v současné

době nahrazována citlivější metodou arrayCGH, která je schopna odhalit změny větší než 50 kb. (Smetana *et al*, 2011).

4. Praktická část

4.1. Materiál a metody

4.1.1. Odběr a kultivace KD:

Pro molekulárně cytogenetickou analýzu byla použita kostní dřev (KD) odebraná od pacientů s MGUS/MM na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Vzorok KD byly dodávány do cytogenetické laboratoře ve zkumavkách s protisrážlivým činidlem (lithium heparin).

Přístroje:

centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA), Flowbox HERAsafe® (Heraeus Holding, Hanau, Německo), inkubátor na cca 37 °C Function Line (Heraeus Holding, Hanau, Německo), stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), třepačka Heidolph Real top (Heidolph, Schwabach, Německo), lednička, mraznička

Spotřební materiál:

pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), centrifugační zkumavky 15ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), plastové kultivační nádoby 40ml (Nunclon TM Δ Surface)

Chemikálie a roztoky:

heparin (Zentiva, Praha, ČR), BM médium (Bone marrow karyotyping medium) (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael), RPMI medium (Sigma-Aldrich) kolcemid (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Pracovní postup:

1. KD (1-2 ml) byla promyta RPMI médiem a následně centrifugována po dobu 10 minut, při 1000 rpm a 37 °C.
2. KD byla přenesena do kultivační nádoby s 10 ml BM média (bone marrow medium)
3. Byly přidány 2 kapky kolcemidu.
4. Směs byla kultivována po dobu 24 hodin v inkubátoru při 37 °C a 5% koncentraci CO₂.

4.1.2. Zpracování KD

Chemikálie a roztoky:

methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR), ledová kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice, ČR), chlorid draselný (lékárna FNOL)

Přístroje:

třepačka Heidolph Real top (Heidolph, Schwabach, Německo), mraznička, lednička (obojí Labnet International, Edison, NJ, USA), centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA), inkubátor Function Line (Heraeus Holding, Hanau, Německo), laboratorní sklo

Spotřební materiál:

centrifugační zkumavky Falcon 15 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie)

Pracovní postup:

1. Po úspěšné kultivaci byl obsah kultivační nádoby přelit do 15ml centrifugační zkumavky.
2. Obsah zkumavky byl centrifugován po dobu 10 minut, při 1000 rpm a 37 °C.
3. Byl odstraněn supernatant a k peletu bylo za stálého vortexování přidáno 10 ml 0,075 M roztoku KCl vytemperovaného na 37 °C.

4. Obsah zkumavky byl inkubován 25 minut při 37 °C.
5. Po inkubaci byla přidána 1 kapka fixačního roztoku Carnoye (methanol:ledová kyselina octová v poměru 3:1) a obsah zkumavky byl promíchán.
6. Celý obsah zkumavky byl centrifugován po dobu 10 minut při 1000 rpm a 37 °C.
7. Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 10 ml fixačního roztoku Carnoye předem vychlazeného v lednici. První ml byl přidáván po kapkách.
8. Obsah zkumavky byl inkubován 30 minut při pokojové teplotě.
9. Po inkubaci byl obsah zkumavky centrifugován po dobu 10 minut při 1000 rpm a 4 °C.
10. Po centrifugaci byl odsán supernatant a k peletu bylo přidáno 10 ml fixačního roztoku Carnoye a celá zkumavka byla zvrtožována.
11. Postup (centrifugace, odsátí supernatantu a přidání 10 ml fixačního roztoku Carnoye) byl opakován, dokud buněčná suspenze neměla mléčně opaleskující zbarvení.

Takto zpracovanou suspenzi je možno uchovávat několik týdnů v lednici pro potřeby různých cytogenetických vyšetření. Následně je zmrazena k archivaci při – 20 °C v 2ml zkumavkách.

4.1.3. Převedení suspenze fixovaných buněk do alkoholu

Chemikálie:

ethanol (lékárna FNOL)

Přístroje:

centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA)

Spotřební materiál:

centrifugační zkumavky Falcon 15 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA),
pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie)

Pracovní postup:

1. Buněčná suspenze ve fixačním roztoku byla stočena v centrifuze při 1000 rpm po dobu 10 minut.
2. Byl odstraněn supernatant a pelet byl převrstven 10 ml 96% ethanolu.
3. Obsah zkumavky byl protřepán a inkubován po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
4. Kroky 1,2 a 3 byly opakovány 2x.
5. Ethanol byl opatrně odsán tak, aby ve zkumavce zbyly přibližně 1-2 ml, ve kterých byl následně pelet resuspendován.

Takto připravená suspenze buněk je připraven k nakapání na podložní sklo.

4.1.4. FICTION

Chemikálie a roztoky:

Ethanol (lékárna FNOL), 10mM citrátový pufr (příprava), 10x PBS pufr (lékárna FNOL), AMCA Anti-Human kappa-chain (Vector Laboratories, Burlingame, USA), AMCA AntiHuman lambda-chain (Vector Laboratories, Burlingame, USA), AMCA Anti-goat IGG (Vector Laboratories, Burlingame, USA), deionizovaná H₂O (HOK), etanol 70%, 80% a 96% (lékárna FNOL)

Přístroje:

centrifuga Rotina 420R (Hettich, Bayerly, MA, USA), třepačka Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo), vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, Německo)

Spotřební materiál:

Centrifugační zkumavky Falcon 15ml (Thermo Fisher Scientific, Walthman, MA, USA), skleněné koplínky 25-30 ml, pasturovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific, Walthman, MA, USA), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA), parafilm (Bemis Company, Neenah, WI, USA)

Pracovní postup:

1. Na nadýchnuté podložní sklo byly kápnuty 2-3 kapky buněčné suspenze v 96% ethanolu, které se nechaly uschnout.
2. Pod mikroskopem byla zkontrolována buněčnost.
3. Podložní sklo bylo vloženo do koplínky s 10mM citrátovým pufrům vyhřáté na 95 °C ve vodní lázni po dobu 10 minut.
4. Po vyndání z lázně byla koplínka inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
5. Po inkubaci bylo sklíčko opláchnuto 2x po 2 minutách v 1x PBS pufru.
6. Na vlhké sklo bylo naneseo 70 μ l naředěné protilátky Amca Anti-Human kappa/lambda chain a sklo bylo překryto parafilmem a inkubováno 1 hodinu při 37 °C ve vlhké komůrce ve vodní lázni.
7. Následně byl odstraněn parafilm a sklo bylo 2x po 2 minutách opláchnuto v 1x PBS pufru.
8. Na sklo bylo naneseo 70 μ l naředěné Amca Anti-goat IGG a sklo bylo inkubováno 1 hodinu při 37 °C ve vlhké komůrce ve vodní lázni.
9. Po inkubaci byl odstraněn parafilm a sklo bylo opláchnuto 2x po 2 minutách v 1x PBS pufru.
10. Bylo provedeno odvodnění skla promýváním ve vzestupné řadě ledových alkoholů (70%, 80%, 96% ethanol) po dobu 2 minut v každé koplíně.

4.1.5. i-FISH

Použité sondy:

LSI RB1, TP53, CEP 17, CEP 15 (vše Abbott Molecular, Des Palines, IL, USA)

XL 1q21/1p32, IGH, t(4,14), t(11,14), t(6,14), t(14,16) (vše MetaSystems, Althusheim, Německo)

Sondy byly ředěny a následně denaturovány dle návody přiloženého výrobcem.

Chemikálie a roztoky:

deionizovaná H₂O (HOK), zásobní roztok 20x SSC (Abbott Molecular, Des Palines, IL, USA) NP-40 (Abbott Molecular, Des Palines, IL, USA), Counterstain Diluent (Kreatech, Amsterdam, Nizozemí)

Přístroje:

Plotýnka Medax (Nagel, Kiel, Německo), vortex Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo), hybridizační komůrka Grand Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK), stolní centrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International), světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Tokio, Japonsko), Fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus, Tokio, Japonsko), počítač, CCD kamera (MetaSystems Althusheim, Německo), počítačový software ISIS (Metasystems Althusheim, Německo)

Spotřební materiál:

Krycí skla 22x22 (Menzel-Glaser, Braunschweig, Německo), rubber cement (Marabu, Tamm, Německo), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA), 1,5ml plastové mikrozskumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Pracovní postup:

1. Sondy byly denaturovány dle návodu výrobce.
2. Denaturované sondy byly nanášeny na podložní sklo se značenými buňkami a překryty krycím sklem.
3. Okraje krycího skla byly oblepeny rubber cementem.
4. Sklo bylo inkubováno v hybridizační komůrce při 37 °C po dobu cca 20 hodin.
5. Po inkubaci bylo odstraněno krycí sklo a podložní sklo s buňkami bylo promyto v roztoku 0,4x SSC/0,3% NP-40 předehřátém na 73 °C po dobu 2 min a znovu promyto 2 minuty v 2x SSC/0,1% NP-40 při laboratorní teplotě.
6. Na suché krycí sklo bylo nanášeno 10 µl Counterstain Diluent pro zbarvení jader buněk byla překryta krycím sklem (24 x 24 mm).

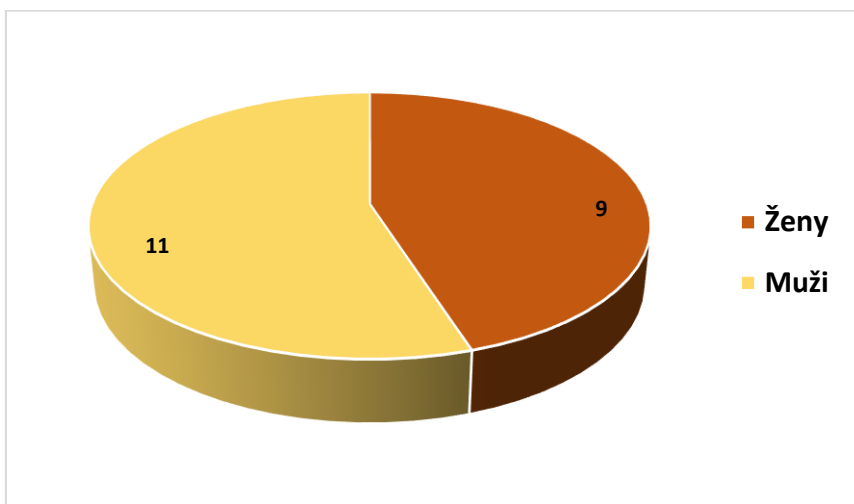
4.2. Vyhodnocení preparátů

Preparáty byly hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu za použití vhodných fluorescenčních filtrů. Cytoplazma plazmatických buněk svítí sytě modře. Každá z použitých sond vytváří specifický barevný vzorec signálů. Celkem bylo hodnoceno 100 PB pro každou použitou sondu. U pacientů s malým zastoupením PB v KD, bylo počítáno minimálně 50 buněk. Oblast v mikroskopu s výskytem PB byla zaznamenána pomocí filtrů a digitální kamery a zpracována na počítači pomocí softwaru ISIS (MetaSystems) pro analýzu obrazu.

5. Výsledky

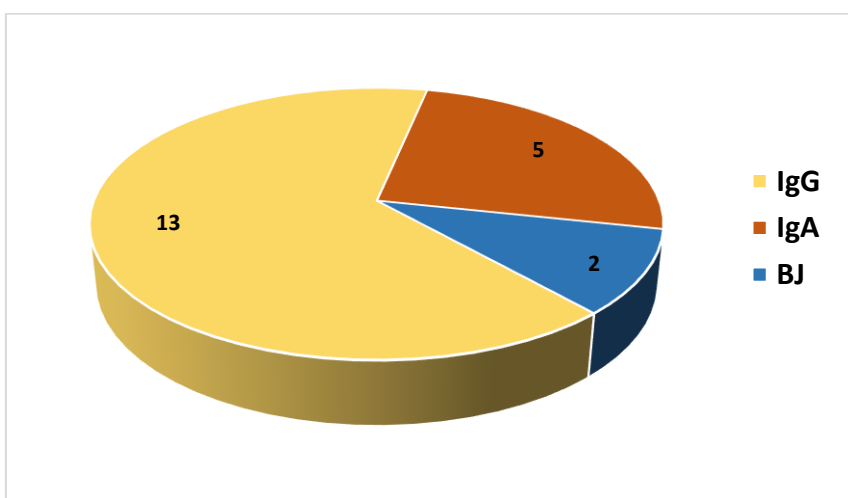
V praktické části bakalářské práce byla provedena cytogenetická analýza PB pomocí metody FICTION u 20 pacientů s MGUS/MM, kteří byly vyšetřeni mezi roky 2015-2017. V souboru pacientů bylo celkem 11 mužů a 9 žen (graf 1). Věkový medián souboru pacientů byl 68 let, přičemž věk se pohyboval v rozmezí 48-82 let.

Graf 1: Zastoupení pohlaví ve vyšetřovaném souboru pacientů



Nejčastějším imunoglobulinovým typem u pacientů s MM/MGUS byl IgG, který se nacházel u 13 pacientů. Zastoupení jednotlivých typů imunoglobulinových tříd je znázorněno v grafu 2.

Graf 2: Zastoupení imunoglobulinových subtypů MM/MGUS



U každého pacienta bylo provedeno klasické vstupní vyšetření na detekci chromozomových změn. Základní panel vyšetření je znázorněn v tabulce 3.

Tabulka 3: Základní panel vyšetření chromozomových změn u pacientů s MM/MGUS

Název sondy	Výrobce sondy	Normální nález - signály	Patologický nález - signály
IGH	METASYSTEMS	2 fúze	Translokace <i>IGH</i> : 1 fúze, 1 zelený, 1 červený
RB1/CEP15	ABBOTT	2 červené, 2 zelené	Delece genu <i>RB1</i> : 1 červený, trizomie chromozomu 15: 3 zelené
1q21/1p32	METASYSTEMS	2 červené, 2 zelené	Změny v počtu kopií 1q21/1p32: více než 2 červené/ méně než 2 zelené
TP53/CEP17	ABBOTT	2 červené, 2 zelené	Trizomie chromozomu 17: 3 zelené a 3 červené signály Delece <i>TP53</i> : 2 zelené, 1 červený

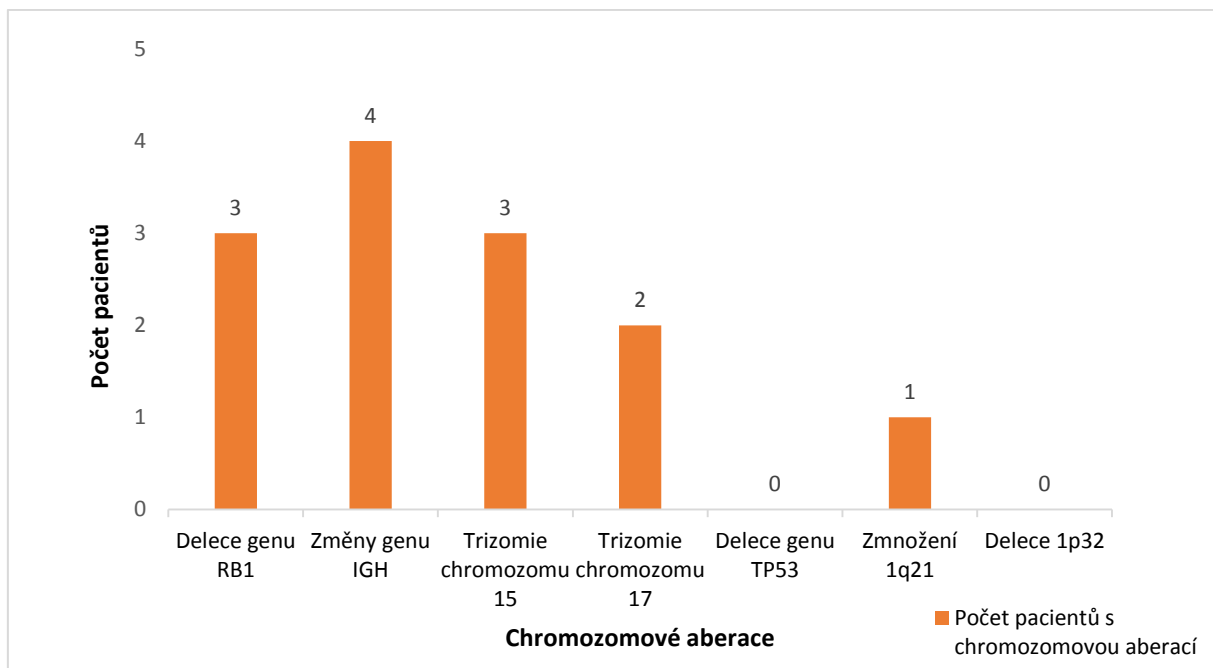
Při vyhodnocení výsledků byli pacienti rozdělení do dvou skupin. První skupinu tvořili pacienti ve stádiu MGUS a pacienti s asymptomatickým myelomem. Druhou skupinu tvořili pacienti s nově diagnostikovaným MM a pacienti v progresi MGUS do MM.

5.1. Soubor pacientů s MGUS a asymptomatickým myelomem

V tomto souboru se nacházelo 8 pacientů s diagnózou MGUS a 2 pacienti s asymptomatickým myelomem. Medián věku pacientů byl 68 let a věk se pohyboval v rozmezí 48 – 81 let. Nejčastěji se vyskytujícím imunoglobulinovým subtypem byl IgG.

Celkový přehled chromozomových změn u pacientů je znázorněn v grafu 3. U 9 pacientů z 10 byly zjištěny genetické změny.

Graf 3: Celkový přehled výskytu chromozomových změn a jejich četnost u pacientů s MGUS/asymptomatickým myelomem



Delece genu *RB1* byla zjištěna u 3 pacientů. Samotná delece genu *RB1* byla zjištěna u 1 pacienta, u dalšího byla zjištěna delece *RB1* genu společně s trizomií chromozomu 15 a u posledního pacienta byla delece *RB1* genu spojena s trizomií chromozomu 17.

U 1 pacienta byla detekována trizomie chromozomu 15 společně s trizomií 17.

U 4 pacientů byly zjištěny změny v genu *IGH*. U 2 pacientů byla zjištěna přestavba genu *IGH* – u 1 byla prokázána translokace t(11;14), u druhého pacienta byla prokázána translokace t(14;16). U třetího pacienta byly zjištěny 3 kopie genu *IGH* a následně byla potvrzena i trizomie chromozomu 14 a současně i trizomie chromozomu 15. U posledního pacienta byla zjištěna pouze parciální delece 5' konce *IGH* genu a následně potvrzena translokace t(11;14).

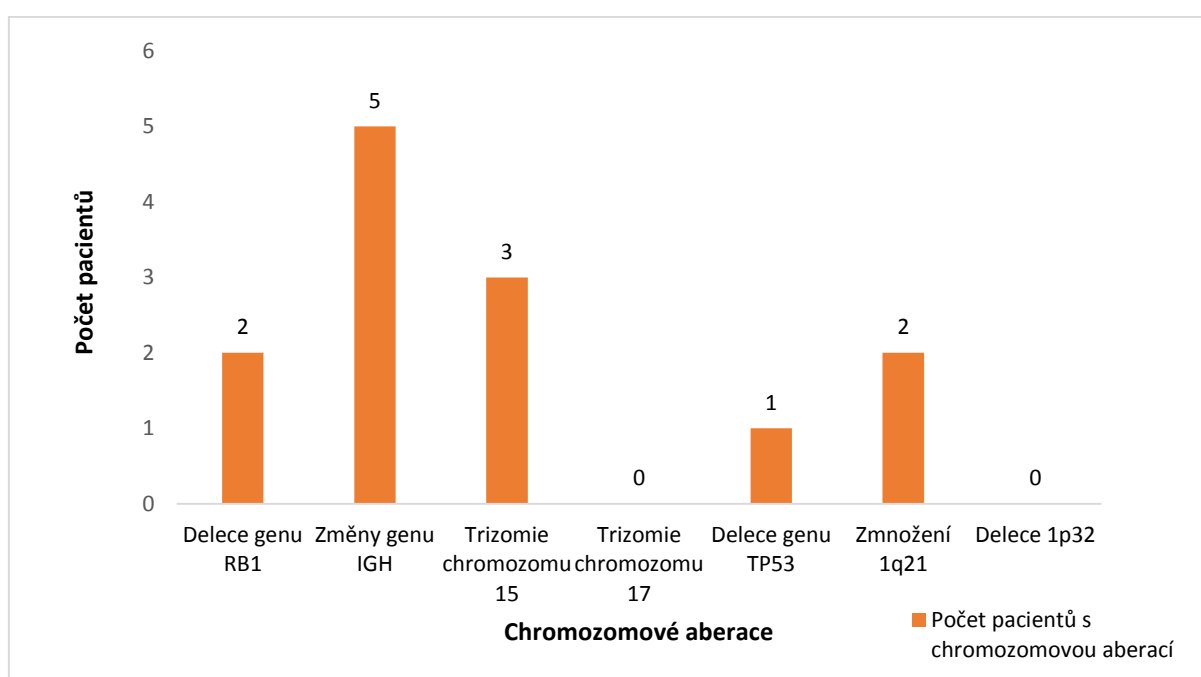
U jednoho pacienta bylo zjištěno zmnožení oblasti 1q21 (3 kopie). U toho pacienta se jednalo o jedinou zjištěnou cytogenetickou abnormalitu.

5.2. Soubor pacientů s novou diagnózou MM a pacientů v progresi

V tomto souboru se nacházelo celkem 10 pacientů. Věkový medián byl 69 let a věk se pohyboval v rozmezí 49-82 let. Nejčastěji se vyskytujícím imunoglobulinovým subtypem byl IgG.

Celkový přehled chromozomových změn u pacientů je znázorněn v grafu 4. U 9 pacientů z 10 byly zjištěny genetické změny.

Graf 4: Celkový přehled výskytu chromozomových změn a jejich četnost u pacientů s novou diagnózou MM a pacientů v progresi



Delece *RBI* genu byla detekována u 2 pacientů, u 1 byla spojena s trizomií chromozomu 15 a výskytem pouze 1 kopie genu *IGH*. Monozomie chromozomu 14 nebyla prokázána. U druhého pacienta byla delece *RBI* genu zjištěna společně s translokací t(11;14).

U 2 pacientů byla zjištěna samotná trizomie chromozomu 15. U 1 pacienta byly pozorovány pouze 3 kopie 1q21. U 1 pacienta bylo zmnožení oblasti 1q21 spojeno s delecí genu *TP53*.

U 3 pacientů byla zjištěna pouze přestavba genu *IGH* – u 1 pacienta byla prokázána translokace t(14;16), u druhého se jednalo o translokaci t(11;14), u posledního pacienta byla detekována přestavba genu *IGH* s variantní translokací t(11;14).

6. Diskuze

Monoklonální gamapatie jsou různorodou skupinou onemocnění, pro kterou je typická přítomnost jednoho nebo více klonů plazmatických buněk produkujících imunoglobulin, který je detekovatelný v séru nebo v moči (Tichý *et* Maisnar, 2006). Mezi nejčastější monoklonální gamapatie patří MGUS a MM. Zatímco MGUS je asymptomatické onemocnění, MM je hemato-onkologická malignita charakteristická přítomností orgánového poškození (Adam *et al*, 1999, Adam *et al* 2002).

U monoklonálních gamapatií je přítomnost chromozomových změn častá a považuje se za důležitý prognostický faktor. Spektrum chromozomálních změn u MGUS je pak velmi podobné změnám vyskytujících se u MM, přesný mechanismus přechodu MGUS do MM je však dodnes nejasný. (Mikulášová *et al*, 2012).

Vyšetřený soubor tvořilo celkem 20 pacientů (10 pacientů s diagnózou MGUS/asymptomatický myelom, 10 pacientů s novou diagnózou a v progresi MGUS do MM). Vyšetřovaným materiálem byly od všech pacientů buňky KD. Všichni pacienti byli vyšetřeni metodou FICTION pro detekci chromozomových změn. U všech jedinců byly sledovány změny zahrnující delecí genu *RBI*, delecí genu *TP53*, početní změny chromozomů 15 a 17, zmnožení oblasti 1q21, delecí oblasti 1p32 a změny v genu *IGH*. Chromozomové změny byly detekovány u 18 pacientů (90 %). V souboru pacientů s MGUS/asymptomatickým myelomem byly změny detekovány u 9 z 10 (90 % pacientů). V případě souboru pacientů s novou diagnózou a progresí MGUS do MM u 9 z 10 (90 % pacientů). Výskyt změn u MM se shoduje s výsledky publikovanými Kumarou *et al* (2012) a Schmith-Hieberem *et al* (2013). Schmith-Hieber však uvádí chromozomální změny u MGUS v nižším počtu (77 %), to může být způsobeno malým počtem zkoumaných pacientů.

Delecí genu *RBI* se vyskytovala celkem u 5 pacientů (25 %). Jako samostatná změna se vyskytovala u 1 pacienta. Ve dvou případech byla doprovázena trizomií chromozomu 15, přičemž u jednoho z pacientů ještě s delecí genu *IGH*. U jednoho pacienta byla společně s delecí *RBI* genu prokázána translokace t(11;14). Pokud se delecí *RBI* genu vyskytuje samostatně, není považována za negativní prognostický faktor (Bergsagel *et al*, 2013). Mikulášová *et al* (2012) uvádí, že u pacientů s MGUS je výskyt delecí *RBI* sporný, v našem případě však byla delecí detekována u 3 pacientů s MGUS/asymptomatickým myelomem. Dále uvádí výskyt delecí *RBI* genu celkem u 50 % pacientů, v našem případě se jednalo jen o 25 % jedinců. Tato neshoda je pravděpodobně způsobena malým souborem pacientů.

Ve vyšetřovaném souboru byly pozorovány změny zahrnující gen *IGH* u 9 (45 %) pacientů. Z toho u 4 pacientů s MGUS/asymptomatickým myelomem a 5 pacientů v nové diagnóze/ v progresi.

Přestavba genu *IGH* byla prokázána u 6 pacientů (30 %). Výskyt translokací odpovídá frekvenci translokací uvedené v literatuře (Bergsagel *et al*, 2011). U 2 pacientů byla prokázána translokace t(14;16), která bývá popisována u 5 % pacientů a je spojována s negativní prognózou a agresivním průběhem nemoci (Kuglík *et al*, 2006). U 4 pacientů byla nalezena translokace t(11;14), z toho se v 1 případě jednalo o variantní nález této translokace. Literatura uvádí výskyt t(11;14) ve 13-16 % případů, což odpovídá našim výsledkům. Tato translokace je považována za příznivý prognostický faktor (Mikulášová *et al*, 2012). V našem souboru nebyla nalezena translokace t(4;14), která patří mezi nejčastěji se vyskytující (Kalff *et al*, 2012).

U 2 z pacientů v souboru byla prokázána delece v *IGH* genu (delece 5' konce a delece celé jedné kopie *IGH* genu). Výskyt delecí v *IGH* genu je u MM poměrně častý (Balcárková *et al*, 2016). Delece 5' konce bývá považována za fyziologickou (důsledek VDJ rekombinace), ale v některých případech, jako u našeho pacienta, mohou být delece spojeny s translokacemi, zejména s jejich variantními nálezy. Delece jedné kopie genu *IGH* se často vyskytuje společně s delecí *RBI* genu, delece obou genů bývají spojeny s monozomiemi chromozomů 13 a 14 a hypodiploidí (méně jak 46 chromozomů) a kratší dobou přežívání (Kuglík *et al*, 2006; Wlodarska *et al*, 2007; He *et al*, 2015). Trizomie chromozomu 14 byla detekována u 1 pacienta a byla doprovázena trizomií chromozomu 15, což naznačuje výskyt hyperdiploidního typu MM, který je charakteristický četnými trizomiemi chromozomů (Bergsagel *et al*, 2013).

Početní změna chromozomů 15 a 17 se vyskytovaly u 7 (35 %) pacientů. V případě pacientů s MGUS/asymptomatickým myelomem byly zaznamenány trizomie těchto chromozomů u 4 pacientů, u pacientů v nové diagnóze a progresi pak ve 3 případech. Trizomie lichých chromozomů jsou typické pro MM a MGUS a nejčastěji zahrnují chromozomy 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21. Celkově jsou trizomie spojovány s lepší prognózou (Bergsagel *et al*, 2013).

Pouze u 1 pacienta (5 %) z celého souboru byla nalezena delece genu *TP53* a to u pacienta v progresi do symptomatického myelomu. Chang *et al* (2005) uvádí výskyt delece *TP53* genu zřídka a to v rozmezí 9-34 %. Náš výsledek je lehce odlišný, což je pravděpodobně způsobeno malým počtem pacientů v souboru. Chang dále uvádí, že delece *TP53* se vyskytuje spíše v pokročilých stádiích MM. Toto tvrzení odpovídá námi zjištěným výsledkům.

Další zkoumanou chromozomovou změnou bylo zmnožení oblasti 1q21. Zmnožení této oblasti je spojováno se zhoršenou prognózou (Yu *et al*, 2016). Tři kopie oblasti 1q21 byly detekovány pouze u 3 (15 %) pacientů, přičemž ve 2 případech u pacientů s novou diagnózou/v progresi do MM a u 1 pacienta s MGUS/asymptomatickým myelomem. Yu *et al* (2016) uvádí výskyt 3 kopií 1q21 v 33,7 % případů. Naše výsledky se neshodují pravděpodobně z důvodu malého souboru zkoumaných pacientů. Delece 1p32, která může být asociovaná se zmnožením 1q21 nebyla detekována u žádného pacienta. Delece 1p bývají spojeny se zhoršenou prognózou a pokročilým stádiem MM (Rajan *et Rajkumar*, 2015).

7. Závěr

Cílem teoretické části bakalářce práce bylo shrnutí základních poznatků o monoklonálních gamapatiích, chromozomálních změnách, které je provázejí a diagnostických metodách umožňujících tyto změny detekovat.

Cílem praktické části byla detekce cytogenetických změn metodou FICTION u pacientů s monoklonálními gamapatiemi, konkrétně s MM a MGUS. Analýza změn byla provedena u 20 pacientů, z nichž 10 mělo diagnózu MGUS/asymptomatický myelom a 10 novou diagnózu MM/progrese MGUS do MM. Cytogenetické změny byly nalezeny u 18 pacientů. Nejčastější změnou byla přestavba genu *IGH*, která se vyskytovala u 9 pacientů. Druhou nejčastější změnou byla trizomie chromozomu 15, vyskytující se u 6 jedinců. U 5 pacientů byla detekována delece genu *RBI*. U 3 pacientů se vyskytovalo zmnožení oblasti 1q21, přičemž delece 1p32 se nevyskytovala u žádného pacienta. Trizomie chromozomu 17 se vyskytovala u 2 pacientů a delece *TP53* u 1 pacienta.

Molekulárně cytogenetická analýza metodou FICTION je důležitá pro určení prognosticky významných chromozomových změn vyskytujících se u pacientů s MM a MGUS.

8. Seznam zdrojů

ADAM, Z. a kolektiv autorů (2002): Mnohočetný myelom: informace pro pacienty a jejich blízké. 2. přeprac a dopl. vyd., Masarykova univerzita, Brno, ISBN 80-210-2859-9.

ADAM, Z., HÁJEK, R., MAYER, J., ŠČUDLA, V., VORLÍČEK, J., a kol. (1999): Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie, Masarykova univerzita, Brno, ISBN 80-210-2034-2.

ADAM, Z., KREJČÍ, M., POUR, L., ŠEVČÍKOVÁ E., KŘIVANOVÁ A., ŘEHÁK, Z., KOUKALOVÁ, R., ČERMÁKOVÁ, Z., VANÍČEK, J., ŠEVČÍKOVÁ, S. (2014): Monoklonální gamapatie nejistého významu a asymptomatický mnohočetný myelom z pohledu roku 2014, Vnitřní lékařství 60, 861-879.

BALCÁRKOVÁ, J., MLYNÁŘČIKOVÁ, M., MIČKOVÁ, P., ŠČUDLA, V., PIKA, T., BAČOVSKÝ, J., MINAŘÍK, J., JAROŠOVÁ, J. (2016): Analýza variantních nálezů počtu chromozomů při určení translokace t(4;14)(p16.3;q32.3) metodou FICTION u nemocných s mnohočetným myelomem. Transfúze a hematologie dnes 22, 182-188.

BALCÁRKOVÁ, J., PROCHÁZKOVÁ, K., ŠČUDLA, V., HOLZEROVÁ, M., BAČOVSKÝ, J., ZEMANOVÁ, M., POSPÍŠILOVÁ, H., HANZLÍKOVÁ, J., KROPÁČKOVÁ, J., PREKOPOVÁ, I., PIKA, T., MINAŘÍK, J., INDRÁK, K., JAROŠOVÁ, M. (2007): Molekulárně cytogenetická analýza plazmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem. Transfúze a hematologie dnes 13, 176-182.

BERGSAGEL, P., L., KUEHL, W. M. (2011): Chromosome translocations in multiple myeloma, Oncogene 20, 5611-5622.

BERGSAGEL, P., L., MATEOS, M. V., GUTIERREZ, N. C., RAJKUMAR, S. V., SAN MIGUEL, J. F. (2013): Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma, Blood 121, 884-892.

BROWN, L. M., GRIDLEY, G., CHECK, D., LANDGREN, O. (2008): Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders, Blood 111, 3388-3394.

DURMAZ, A. A., KARACA, E., DEMKOW, U., TORUNER, G., SCHOUMANS, J., COGULU, O. (2015): Evolution of genetic Techniques: Past, Present, and Beyond, BioMed Research International 2015, 1-7.

FERGUSON-SMITH, M. A. (2015): History and evolution of cytogenetics, Molecular Cytogenetic 8, 1-8.

FONSECA, R., BARLOGIE, B., BATAILLE, R., BASTARD, CH., BERGSAGEL, L., CHESI, M., DAVIES, F. E., DRACH, J., GRREIPP, P. R., KIRSCH, I. R., KUEHL, W. M., HERNANDEZ, J. M., MINVIELLE, S., PILARSKI, L. M., SHAUGHNESSY, J. D., STEWART, A. K., AVER-LOISEAU, H. (2004): Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report, Cancer Research 64, 1546-1558.

FONSECA, R., BLOOD, E. A., OKEN, M. M., KYLE, R. A., DEWALD, G. V., BAYLEI, R. J., VAN WIER, S. A., HENDERSON, K. J., HOYER, J. D., HARRINGTON, D., KAY, N. E., VAN NESS, B., GREIPP, P. R. (2002): Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients, Blood 99, 3735-3741.

GOODRICH, D. W. (2006): The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule, Oncogene 25, 5233-5243.

HÁJEK, R. (2012): Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu, Transfúze a hematologie dnes 18, Supplementum 1.

HALLEK, M., BERGSAGEL, P. L., ANDERSON, K. C. (1998): Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. Blood 91, 3-21.

HE, H., FU, W., JIANG, H., DU, J., ZHOU, L., ZHANG, CH., XI, H., LI, R. (2015): The clinical characteristics and prognosis of IGH deletion on multiple myeloma, Leukemia Research 39, 515-519.

HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. (2009): Základy imunologie. 4. vyd., Triton, Praha, ISBN 978-80-7387-280-9.

HUNAMURA, I., STEWART, J. P., HUANG, Y., ZHAN, F., SANTRA, M., SAWYER, J. R., HOLLMIG, K., ZANGARRI, M., PINEDA-ROMAN, M., VAN RHEE, F., CAVALLO, F., BURINGTON, B., CROWLEY, J., TRICOT, G., BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY, J. D. (2006): Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to

relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation, *Blood* 108, 1724-1732 .

CHANG, H., QI-LONG-YI, C. Q., REECE, D., STEWART, A. K. (2005): P53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation, *Blood* 105, 358-360.

CHNG W. J., LAU, L. G., YUSOF, N., MOW, M. F. B. (2005): Targeted therapy in Multiple Myeloma, *Cancer Control Journal* 12, 91-104.

JELÍNEK, T., VŠIANSKÁ, P., HÁJEK, R. (2015): Monoklonální protilátky v léčbě mnohočetného myelomu, *Transfúze a hematologie dnes* 21, 74-83.

JUGE-MORINEAU, N., HARROUSEAU, J. L., AMIOT, M., BATAILLE, R. (1997): The Retinoblastoma Susceptibility Gene RB-1 in Multiple Myeloma, *Leukemia Lymphoma* 24, 229-237.

KALFF, A., SPENCER, A. (2012): The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic, omplications and current clinical strategies, *Blood Cancer Journal* 2, 1-8.

KANNAN, T. P., ZILFALIL, B. A. (2009): Cytogenetics: Past, Present And Future. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 16, 4-9.

KUGLÍK, P., FILKOVÁ, H., OLTOVÁ, A., HÁJEK, R. (2006): Význam a současné možnosti diagnostiky cytogenetických změn u mnohočetného myelomu, *Vnitřní lékařství* 52, 76-78.

KUGLÍK, P., VRÁNOVÁ, V., FILKOVÁ, H. (2008): Metody klasické a molekulární cytogenetiky v diagnostice mnohočetného myelomu, *Klinická onkologie* 21, Supplementum 1, 198-203.

KUMAR, S., FOSECA, R., KETTERLING, R. P., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., GERTZ, M. A., HAYMAN, S. R., BUANDI, F. K., DINGLI, D., KNUDSON, R. A., GREENBERG, A., RUSSEL, S. J., ZELDENRUST, S. R., LUST, J. A., KYLE, R. A., BERGSAGEL, L., RAJKUMAR, V., (2012): Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics, *Blood* 119, 2100-2105.

LEONE, P. E., WALKER, B. A., JENNER, M. W., CHIECHIO, L., DAGRADA, GP., PROTHEROE, R. K. M., JOHNSON, D. C., DICKENS, N. J., BRTIO, J. L., ELSE, M., GONZALES, D., ROSS, F. M., CHEN-KIANG, S., DAVIES, F. E., MORGAN, G. J. (2008):

Deletions of CDKN2C in Multiple Myeloma: Biological and Clinical Implications, *Clinical Cancer Research* 14, 6033-6041.

LEUNG, E.W., SIN, P. L., WANG, T. S. (2012): The Impact of FICTION on the Detection of Genetic Aberrations in Multiple Myeloma, *Journal of Hong Kong Institute of Medical Laboratory Sciences* 13, 1-8.

LEXOVÁ, S. (2000): Hematologie pro zdravotní laboranty, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, ISBN 80-701-3304-X.

MAISNAR, V. (2013): Riziko přechodu monoklonální gamapatie nejasného významu do maligní monoklonální gamapatie, *Klin. Biochem. Metab* 21, 93-96.

MARZIN, Y., JAMET, D., DOUET-GUILBERT, N., MOREL, F., LE BRIS, M. J., MORICE, P., ABGRALL, J. F., BERTHOU, CH., DE BRAEKELEER, M. (2006): Chromosome 1 Abnormalities in Multiple Myeloma, *Anticancer Research* 26, 953-959.

MIČKOVÁ, P., BALCÁRKOVÁ, J., PIKA, T., ŠČUDLA, V., BAČOVSKÝ, J., MINAŘÍK, J., NEVIMOVÁ, K., JAROŠOVÁ, M. (2014): Delece TP53 u nemocných s mnohočetným myelomem a monoklonální gamapatií nejasného významu - molekulárně cytogenetická analýza souboru 84 nemocných., *Transfúze a hematologie dnes*. 20, 32-38.

MICHALOVÁ, K. (2002): Současné trendy klasické a molekulární cytogenetiky v hematologii a onkologii, *Postgraduální medicína* 5.

MICHALOVÁ, K., ZEMANOVÁ, Z. (2005): Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi, *Klinická biochemie a metabolismus* 13, 63-67.

MIKHAEL, J. R., DINGLI, D., ROY, V., REEDER, C. B., BUADI, F. K., HAYMAN S. R., DISPENZIERI, A., FONSECA, R., SHER, T., KYLE, RA., LIN, Y., RUSSEL, S. J., KUMAR, S., BERGSAGEL, P. L., ZELDENRUST, S. R., LEUNG, N., DRAKE, M. T., KAPOOR, P., ANSELL, S. M., WITZIG, T. E., LUST, J. A., DALTON, R. J., GERTZ, M. A., STEWART, A. K., RAJKUMAR, S. V., CHANAN-KHAN, A., LACY, M. Q., MAYO CLINIC (2013): Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013, *Mayo Clinic Proceedings* 88, 360-375.

MIKULÁŠOVÁ, A., KUGLÍK, P., SMETANA, J., GREŠLIKOVÁ, H., ŘÍHOVÁ, L., KLINCOVÁ, M., HÁJEK, R. (2012): Úloha chromozomových aberací v patogenezi monoklonální gamapatie nejasného významu, *Klin. Biochem. Metab* 20, 91-96.

MLYNÁRČIKOVÁ M., BALCÁRKOVÁ, J., MIČKOVÁ, M., SČUDLA, V., PIKA, T., BAČOVSKÝ, J., MINAŘÍK, J., JANOUSOVÁ, E., JAROŠOVÁ, M. (2016): Molecular Cytogenetic Analysis of Chromosome 8 Aberrations in Patients With Multiple Myeloma Examined in 2 Different Stages, at Diagnosis and at Progression/Relapse, *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 16, 358-365.

MUNSHI, N. C., ANDERSON, K. C. (2013): *Advances in biology and therapy of multiple myeloma*. 1, Springer, New York, ISBN 978-146-1452-607.

PALUMBO, A., AVET-LOISEAU, H., OLIVA, S., LOKHORST, H. M., GOLDSCHMIDT, H., ROSINOL, L., RICHARDSON, P., CALTAGIRONE, S., LAHUERTA, J. J., FACON, T., BRINGHEN, S., GAY, F., ATTAL, M., PASSERA, R., SPANCER, A., OFFIDANI, M., KUMAR, S., MUSTO, P., LONIAL, S., PETRUCCI, M. T., ORLOWSKI, R. Z., ZAMAGNI, E., MORGAN, G., DIMOPOULOS, M. A., DURIE, B. G., ANDERSON, K. C., SONNEVELD, P., SAN MIGUEL, J., CAVO, M., RAJKUMAR, S. V., MOREAU, P. (2015): Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group, *Journal of Clinical Oncology* 33, 2863-2869.

PEAKMAN, M., VERGANI, D. (2010): *Basic and clinical immunology*. 2nd ed. Churchill Livingstone, New York, ISBN 978-0-443-10082-6.

POSPÍŠILOVÁ, Š., DVOŘÁKOVÁ, D., MAYER, J. a *et al.* (2013): *Molekulární hematologie*, Galén, Praha, ISBN 978-80-7262-942-8.

PRIDEAUX, S. M., O'BRIEN, E. C., CHEVASSUT, T. J. (2014): The Genetic Architecture of Multiple Myeloma, *Advances in Hematology* 2014, 1-16.

RAJAN A. M., RAJKUMAR S. V. (2015): Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice, *Blood Cancer Journal* 5, 1-7.

RAJKUMAR, S. V. (2015): Evolving diagnostic criteria for multiple myeloma, *Hematology* 2015, 272-278.

ROSS, M. F., CHIECCHIO, L., DAGRADA, G. P., PROTHEROE, R. K. M., STOCKLEY, D. M., HARRISON, CH. J., CROSS, N. C. P., SZUBERT, A. J., DRAYSON, M. T.,

MORGAN, G. J.(2010): The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance, *Haematologica* 95, 1221-1225.

SCHMIDT-HIEBER, M., GUTIÉRREZ, M. L., PÉREZ-ANDRÉS, M., PAIVA, B., RASILLO, A., TABERNERO, A. D., SAYAGUÉS, J. M., LOPEZ, A., BÁRCENA, P., SANCHEZ, M. L., GUTIÉRREZ, N. C., SA MIGUEL, J. F., ORFAO, A. (2013): Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells, *Haematologica* 98, 279-287.

SMETANA, J., FRÖHLICH, J., VRÁNOVÁ, V., MIKULÁŠOVÁ, A., KUGLÍK, P., HÁJEK, R. (2011): Oligonucleotide-based Array CGH as a Diagnostic Tool in Multiple Myeloma Patients, *Klinická onkologie* 24, Supplementum, 43-48.

SONNEVELD, P., AVET-LOISEAU, H., LONIAL, S., USMANI, S., SIEGEL, D., ANDERSON, C. K., CHNG, W. J., MOREAU, P., ATTAL, M., KYLE, A. R., CAERS, J., HILLEGASS, J., SAN MIGUEL, J., VAN DE DONK, N. W. C. J, EINSELE, H., BLADÉ, J., DURIE, B. G. M., GOLDSCHMIDT, H., MATEOS, M. V., PALUMBO, A., ORLOWSKI, R. (2017): Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group, *Blood* 127, 2955-2962.

ŠPIČKA, I. (2006): Mnohočetný myelom, *Postgraduální medicína* 2.

TICHÝ, M., MAISNAR, V. (2006): Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů, *Vnitřní lékařství* 52, 41-45.

VAN DE DONK, N. W. C. J., MUTIS, T., PODDIGHE, P. J., LOKHORST, H. M., ZWEEGMAN, S. (2016): Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma, *International Journal of Laboratory Hematology* 38, Supplementum 1, 110-122.

WLODARKA, I., MATTHEWS, CH., VEYT, E., POSPÍŠILOVÁ, H., CATHERWOOD, M. A., POULSEN, T. S., VANHENTENRIJK, V., JBBOTSON, R., VANDENBERGHE, P., MORRIS, T. C. M., ALEXANDER, H. D. (2007): Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in Chronic lymphocytic leukemia reflect somatic V_H recombination events, *Journal of Molecular Diagnostic* 9, 47-54.

YU, W., GUO, R., QU, X., QUI, H., LI, J., ZHANG, R., CHEN, L. (2016): The amplification of 1q21 is an adverse prognostic factor in patients with multiple myeloma in a Chinese population, *OncoTargets and Therapy* 2016, 295-302.

9. Seznam zkratek

arrayCGH	array komparativní genomová hybridizace
AMCA	7-amino-4 methycoumarin-3-acetic acid
ASCT	autologní transplantace hematopoetických buněk
BJ	Bence Jonce protein
BM médium	bone marrow medium
CCND1	cyklin D1
CCND3	cyklin D3
CDKN2C	Cyklin dependent kinase inhibitor 2B
CGH	komparativní genomová hybridizace
cIg-FISH	cytoplazmic immunoglobulin FISH
CKS1B	cyklin dependent kinases regulatory subunit 1
FAF1	Fas associated factor 1
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3 (receptor fibroblastového růstového faktoru 3)
FICTION	fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetic as a tool for the investigation of neoplasm
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization (fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace)
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
HSC	hemopoetická kmenová buňka
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IGH	gen pro těžký řetězec imunoglobulinu
IgM	imunoglobulin M
IL-6	interleukin 6

<i>in situ</i>	„na místě“
ISS	The international staging system
KCl	chlorid sodný
KD	kostní dřeň
MAF	MAF bZIP transkripční faktor
MAFB	transkripční faktor MAFB
mBAND	vícebarevné pruhování
M-FISH	multicolor FISH
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance (Monoklonální gamapatie nejasného významu)
MM	multiple myeloma, mnohočetný myelom
MMSET	multiple myeloma set domain
MYC	myelocytomatosis oncogene (gen kódující c-myc protein)
NK	natural killer cells
NP-40	nonyl phenoxyethoxyethanol
PB	plazmatická buňka
PBS	phosphate buffer saline (fosfátový pufr)
RB1	retinoblastoma (retinoblastomový protein)
SMM	smouldering myeloma (doutnající mnohočetný myelom)
SSC	saline-sodium citrate buffer
TP53	gen kódující p53 protein
VDJ rekombinace	přeskupování subgenů pro těžké řetězce imunoglobulinů