

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Ústav klinické a molekulární patologie

MUDr. Pavla Flodrová

Diagnostika amyloidózy z podkožního tuku

Studium metylačních změn u mnohočetného myelomu

Dizertační práce

Školitel: Ing. Kateřina Smešný Trtková, CSc.

Studijní obor: Lékařská biologie

Olomouc 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu.

Dizertační práce obsahuje výsledky, které byly získány ve spolupráci s Ústavem molekulární a translační medicíny LF UPOL (MUDr. Petr Džubák, Ph.D. a Mgr. Dušan Holub, Ph.D. – proteomické analýzy). Klinická data potřebná pro provedené studie byla získána ve spolupráci s Hemato-onkologickou klinikou FNOL (MUDr. Tomáš Pika, Ph.D., doc. MUDr. Mgr. Jiří Minařík, Ph.D., MUDr. Petra Krhovská).

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Lékařská biologie na Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, s podporou grantového projektu Ministerstva zdravotnictví (16-31156A) a interních grantů Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 29. 1. 2021

MUDr. Pavla Flodrová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Kateřině Smešný Trtkové, CSc. za velkou podporu, pomoc a důvěru, kterou do mě po celou dobu mého studia vkládala.

MUDr. Tomáši Pikovi, Ph.D. bych ráda poděkovala za to, že mě přivedl k tématu amyloidózy a mohla jsem se tak ve spolupráci s ním podílet na výzkumu i diagnostice tohoto zajímavého onemocnění.

Dále děkuji doc. MUDr. Mgr. Jiřímu Minaříkovi, Ph.D. a MUDr. Petře Krhovské za velkou pomoc a přátelskou spolupráci na výzkumných aktivitách týkajících se mnohočetného myelomu.

MUDr. Petrovi Džubákovi, Ph.D. a Mgr. Dušanovi Holubovi, Ph.D. děkuji za dlouholetou úspěšnou spolupráci při proteomické analýze amyloidových vzorků.

RNDr. Lucii Janovské, Ph.D. bych ráda poděkovala za čas a cenné rady, které mi věnovala, když mě provázela mými začátky s pyrosekvenováním.

Za provedení statistických analýz děkuji Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. a Mgr. Janě Zapletalové.

Paní Lence Prokopové děkuji za obětavou pomoc s grafickými úpravami dizertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat všem z kolektivu Ústavu klinické a molekulární patologie, neboť jsem u nich vždy našla pochopení a ochotu k pomoci.

Velké poděkování patří mé rodině za veškerou podporu, pomoc a trpělivost.

Obsah

Část I. Diagnostika amyloidózy z podkožního tuku	7
1. Úvod	8
1.1 Amyloid a amyloidóza, definice, historie, klasifikace	8
1.2 Funkční amyloid.....	9
2. Metody detekce a typizace amyloidu	10
2.1 Metody detekční	10
2.1.1 Základní a speciální histologické barvení	10
2.1.2 Fluorescenční vyšetření.....	11
2.1.3 Elektronová mikroskopie.....	11
2.2 Metody typizační	11
2.2.1 Imunohistochemické vyšetření	11
2.2.2 Imunofluorescenční vyšetření.....	12
2.2.3 Imunoelektronová mikroskopie	13
2.2.4 Vyšetření založená na hmotnostní spektrometrii	13
3. Vyšetřovaný materiál	15
4. Koprecipitované molekuly.....	15
4.1 Sérový amyloidový protein P (SAP)	15
4.2 Heparansulfát	16
5. Nejčastější typy amyloidózy	16
5.1 AL amyloidóza.....	16
5.2 Transthyretinová amyloidóza	17
5.3 AA amyloidóza	18
6. Experimentální část	20
6.1 Úvod	20
6.2 Cíle studie	21
6.3 Materiál a metody	21
6.3.1 Výběr pacientů, aspirace podkožního tuku, Kongo barvení.....	21
6.3.2 Tenkojehlová aspirace podkožního tuku.....	21
6.3.3 Speciální barvení Kongo červení.....	22
6.3.4 Světelná a polarizační mikroskopie	22
6.3.5 Cytoblok – zhotovení, imunohistochemické vyšetření	23
6.3.6 Proteomická analýza	23
6.3.7 Sledované parametry	25
6.3.8 Statistická analýza	27
6.4 Výsledky.....	27

6.5 Diskuze.....	33
6.6 Závěr.....	37
Část II. Studium metylačních změn u mnohočetného myelomu	38
1. Úvod	39
1.1 Epigenetické změny.....	39
1.1.1 Metylace DNA.....	39
1.1.2 Modifikace histonů.....	40
1.1.3 Epi-mikroRNA	41
1.2 Mnohočetný myelom (MM)	41
1.2.1 Základní informace o mnohočetném myelomu	41
1.2.2 Genetické změny u mnohočetného myelomu	42
1.2.3 Epigenetické změny u mnohočetného myelomu	43
2. Vybrané metody studia metylačních změn genomu.....	44
2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC-UV)	44
2.2 Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)	45
2.3 Metody na principu ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	45
2.4 Analýzy repetitivních sekvencí	45
2.5 Luminometric Methylation Assay (LUMA)	46
2.6 Bisulfitová modifikace (bisulfitová konverze)	48
3. Experimentální část	48
3.1 Úvod	48
3.1.1 Studované geny	48
3.1.2 Globální metylace genomu z pohledu prediktivních a prognostických markerů.....	50
3.2 Cíle studie	50
3.3 Materiál a metody	51
3.3.1 Soubor pacientů	51
3.3.2 Izolace DNA	51
3.3.3 Bisulfitová modifikace	51
3.3.4 Pyrosekvenační analýza.....	52
3.3.5 LUMA.....	55
3.3.6 Sledované charakteristiky pacientů	57
3.3.7 Statistická analýza	57
3.4 Výsledky.....	57
3.4.1 Cytogenetické změny	58
3.4.2 Hodnocení celkové metylace	59
3.4.3 Metylace genu PDLIM4	60

3.4.4 Metylace genu CDKN2B.....	62
3.5 Diskuze.....	63
3.6 Závěr	65
Seznam zkratek.....	70
Práce související s dizertační prací	72
Ostatní publikace.....	75
Reference	76

Část I. Diagnostika amyloidózy z podkožního tuku

1. Úvod

1.1 Amyloid a amyloidóza, definice, historie, klasifikace

Amyloidóza zahrnuje poměrně širokou skupinu onemocnění, pro kterou je společné extracelulární ukládání obtížně rozpustného depozita – amyloidu – ve tkáních a orgánech, což vede k porušení jejich funkce a může vyústit až do orgánového selhání. S pojmem „amyloid“ se poprvé setkáváme v roce 1854, kdy Rudolf Virchow takto popsal makroskopickou abnormalitu mozkové tkáně, která se projevila po reakci s jodem (modrá barva), následně po přidání kyseliny sírové se zbarvila fialově. Virchow předpokládal, že struktura podmiňující netypický vzhled tkáně je celulóza či škrob a substanci proto nazval „amyloidem“ (1), (2). Během devatenáctého a počátku dvacátého století se pozornost přesunula od Virchowových makroskopických pozorování ke klasifikacím klinických symptomů. Porozumění amyloidu a jeho struktuře úzce souvisí s technologickým vývojem. Ve druhé polovině dvacátého století byla elektronovou mikroskopií prokázána charakteristická ultrastruktura, která je společná všem typům amyloidových depozit, a na ni navázaly biochemické studie, které analýzou aminokyselin zjistily, že primární amyloid je složen z lehkých řetězců imunoglobulinů, sekundární amyloid je tvořen proteinem amyloid A a tehdy poslední známá skupina amyloidu je složena z molekuly prealbuminu. Další biochemické studie zaměřené na stavbu amyloidových depozit na sebe nenechaly dlouho čekat a zjistily přibližně dvacet proteinů, které podmiňují tvorbu amyloidu. (2)

Amyloidem v současnosti rozumíme biochemicky i klinicky značně heterogenní skupinu substancí s abnormální proteinovou strukturou. Amyloidové depozitum je tvořeno amyloidotvorným fibriláním proteinem a dalšími přídatnými složkami (sérový amyloidový protein P, lipoproteiny, glykosaminoglykany, proteoglykany) (3), (4), (5), (6). Amyloidotvorný fibrilární protein (amyloidová fibrila) nabývá vzhledu nevětvené proteinového vlákna průměru přibližně 10nm, jehož opakující se substruktura sestává z β -vláken, která jsou uspořádána kolmo na dlouhou osu proteinového vlákna a formují tak β -skládaný list nedefinované délky (7). Jde tedy o chorobu, která patří do nadskupiny onemocnění s poruchou proteinového skládání (protein misfolding diseases).

Zatímco do skupiny amyloidotvorných proteinů jsou zařazeny některé specifické substance, jako například A β prekurzorový protein, α -Synuclein či amyloidový ostrůvkový polypeptid (AIAPP), onemocnění, která jsou s těmito depozity spjata však jako amyloidózu

nenazýváme. Důvodem je fakt, že ačkoliv depozita obvykle tyto choroby doprovází a mohou mít významnou roli v jejich patogenezi, nejsou prvotní a jedinou příčinou vzniklé nemoci (1), (3). Jako amyloidózu proto označujeme nemoc, která je přímo způsobena extracelulárním ukládáním amyloidu, depozita jsou vždy škodlivá a způsobují vznik nemoci. Nejsou-li depozita přítomna, nejsou přítomny žádné klinické ani morfologické důkazy o přítomnosti nemoci.

Amyloidózy lze rozdělit z různých hledisek. Dle rozsahu onemocnění na systémové a lokalizované, dle dědičnosti na hereditární a získané. Zcela zásadní je však klasifikace onemocnění dle amyloidotvorného fibrilárního proteinu, kterých v současnosti rozlišujeme celkem 36, z toho 18 proteinů způsobuje systémovou amyloidózu a 22 lokalizovanou formu tohoto onemocnění (1). Typizace amyloidózy z pohledu fibrilárního proteinu je nejdůležitější pro klinickou praxi, neboť jednotlivé typy onemocnění se naprosto zásadním způsobem liší v léčebné přístup. Správné určení typu amyloidózy je proto klíčové pro adekvátní terapii všech pacientů s touto nemocí a podání neindikované léčby může mít v některých případech fatální následky (např. podání chemoterapie u pacienta s hereditárním typem amyloidózy).

1.2 Funkční amyloid

Dle nových poznatků nelze amyloid chápat pouze jako patologickou strukturu. Funkční amyloid je pojem zavedený pro označení takových amyloidových struktur, které mají prospěšnou funkci pro živé organismy a nemají žádný vztah k proteinovým stádatým chorobám. Jde o fibrilární agregáty, které mají morfologické, strukturální i tinkční vlastnosti identické jako amyloidové fibrily. Některé organismy (bakterie ale i vyšší organismy) mají schopnost transformovat normální endogenní proteiny do amyloidových fibril v průběhu jejich fyziologických procesů, což bylo prokázáno ve specializovaných biologických funkcích (8). Příkladem může být vazba melaninu na fibrilární proteinový přenašeč v melanosomech, proteiny účastníci se dlouhodobé paměti u mořského měkkýše nebo vlákna sítě u některých pavouků (8), (1).

2. Metody detekce a typizace amyloidu

Amyloid lze studovat a prokázat na mnoha úrovních, na úrovni makroskopické, mikroskopické, elektronmikroskopické či proteomické. Většinu těchto základních přístupů můžeme dále modifikovat, ať už použitím speciálních histologických barvení či speciálních fyzikálních principů, jako v případě polarizační či fluorescenční mikroskopie, nebo použitím metod založených na vazbě antigenu a protilátky. Tyto se využívají především v dalším dourčení konkrétního typu amyloidových depozit. Obecně lze všechny metody rozdělit na detekční (zjišťující pouhou přítomnost amyloidu) a typizační (určení konkrétního typu amyloidového proteinu).

2.1 Metody detekční

2.1.1 Základní a speciální histologické barvení

Depozita amyloidu se v základním barvení histologických preparátů (hematoxylin-eosin) znázorní nespecificky, jako amorfni eozinofilní, tj. světle červený materiál. Pro specifické znázornění amyloidu existují speciální barvicí metody, přičemž pro diagnózu nepodkročitelným standardem je celosvětově používané barvení Kongo červení. V jeho výsledku poskytují depozita amyloidu oranžové až červené zbarvení, a to bez závislosti na typu amyloidu (9). Při vyšetření polarizačním mikroskopem pozorujeme charakteristické jevy, které dává konžská červeň ve vazbě na amyloid. Tradičně se označují jako o dvojlom („birefringence“) a dichroismus „apple-green“ barevného charakteru, avšak jedná se o složité optické jevy komplexního charakteru a výsledné zbarvení může nabývat i jiných odstínů, např. žluté, oranžové či modré (10), (11), (12). Pro správný výsledek barvení je třeba použít odlišnou tloušťku tkáňových řezů (cca 5-6 μm) než je běžné pro ostatní barvicí metody. Falešná pozitivita barvení může nastat při vazbě Kongo červeně na vazivo, tomu zamezíme volbou vhodné modifikace této barvicí metody, zejm. použitím postupu dle Puchtlerové (13), (14), (15).

Z ostatních speciálních histologických barvicích metod lze použít saturnovou červeň, thioflavin, metylvioleť apod. (9). Lze jen doporučit provádět pro detekci amyloidu spolu s Kongo červení ještě alespoň jednu další speciální barvicí metodu.

Speciální barvicí metody dávají dobrý výsledek při klasickém zpracování histologického materiálu – fixace formalinem a zalití do parafinu. Obdobně jako u ostatních barvicích metod dosáhneme kvalitnějšího výsledku barvením zmrazených řezů nefixované tkáně.

2.1.2 Fluorescenční vyšetření

Vyšetření amyloidu pomocí fluorescenčního mikroskopu lze provést pomocí přímé vazby fluorochromu na amyloidová depozita, což nastává v případě barvení parafinového řezu konžskou červení nebo Thioflavinem T, tyto látky jsou samy o sobě fluorochromem. Ve srovnání s vyšetřením řezů barvených Kongo červení pouze polarizačním mikroskopem vykazuje fluorescenční vyšetření vyšší senzitivitu zejména v případech málo objemných depozit amyloidu (16). Další fluorochrom – Thioflavin T – lze obdobně jako Kongo červeně použít na tkáň fixovanou formalinem a zalitou do parafinu (FFPE). Barvicí metoda není složitá, avšak je zde riziko nespecifického barvení některých struktur (keratin, nukleové kyseliny, elastická vlákna) (17), (18).

2.1.3 Elektronová mikroskopie

Vyšetření ultratenkých řezů pomocí elektronového mikroskopu prokáže charakteristickou fibrilární strukturu amyloidu. Znázorní se tak dlouhá nevětvená náhodně orientovaná vlákna šíře 6 – 12 nm, tvořící nepravidelnou síť, každé z vláken je složeno ze čtyř až šesti stočených protofibril (3), (7), (19). Jedná se o vyšetření, které se nejčastěji provádí u renálních biopsií, jde však o metodu technologicky i časově značně náročnou, navíc vzorek pro elektronovou mikroskopii vyžaduje zvláštní fixaci (glutaraldehyd nebo roztok podle Karnovského), je proto nutné na to myslet již při plánování odběru (20).

2.2 Metody typizační

2.2.1 Imunohistochemické vyšetření

V současné diagnostice amyloidu zůstává imunohistochemie (IHC) nejvíce dostupnou rutinně používanou metodou, která umožňuje provést vyšetření z materiálu fixovaného formalinem a zalitého do parafinu (FFPE) s příznivými náklady a bez nutnosti pořízení specializovaného přístrojového vybavení.

Do běžné praxe patří vyšetření protilátkami proti κ a λ lehkým řetězcům imunoglobulinů, transthyretinu a amyloidu A, přičemž spektrum komerčně dostupných protilátek i proti vzácným a hereditárním formám amyloidózy se stále rozšiřuje. Některé zahraniční laboratoře

specializující se na problematiku amyloidu si připravují vlastní protilátky (zejména proti lehkým řetězcům imunoglobulinů) (21). Depozita všech typů amyloidu obsahují konstantně příměs i jiných molekul, než je samotný amyloidogenní protein, což lze imunohistochemickým průkazem využít v diagnostice (zejm. protilátka proti sérovému amyloidovému proteinu P).

Senzitivita IHC vyšetření amyloidu (zejména AL typu) je ztížena několika okolnostmi. Kromě faktorů preanalytické fáze vyšetření (odběr materiálu, způsob a délka fixace apod.) hraje významnou roli samotný proces tvorby amyloidu (konformační změny s fragmentací lehkých řetězců a maskování antigenu při formování amyloidových fibril), dále přirozená heterogenita lehkých řetězců plynoucí z jejich variabilních domén, mutace amyloidotvorného proteinu a v neposlední řadě příměs séra (21), (22), (23), (19), (24). Také rozpoznávání epitopů jednotlivými protilátkami může být odlišné. Falešná pozitivita je popisována zejména při použití protilátek proti transthyretinu, což může být zdrojem potíží při vyšetřování biopsických vzorků z myokardu u pacientů s AL amyloidózou (22), (25).

Výše uvedené vede ke skutečnosti, že se závěry studií, které zkoumají spolehlivost IHC vyšetření v určování subtypů amyloidózy, často značně liší. V současné době je možné využít více polyklonálních i monoklonálních protilátek proti epitopům κ i λ lehkých řetězců. Aplikace více různých protilátek proti lehkým řetězcům imunoglobulinů zvyšuje validitu vyšetření AL amyloidu. Dle jedné ze studií použití 4 protilátek anti- λ v kombinaci se souvisejícími klinickými a laboratorními vyšetřeními přináší senzitivitu 94 % a specificitu 100 % (21). Všeobecně je také uváděno, že použití nefixované tkáně (tedy zpracované na histologické řezy pomocí zmrazení) dává spolehlivější výsledky imunohistochemického vyšetření (21), (23).

2.2.2 Imunofluorescenční vyšetření

Imunofluorescence je standardně indikována pro vzorky renální tkáně, některá pracoviště však imunofluorescenčně rutinně vyšetřují i jiné tkáně, např. endomyokardiální biopsie (26), (27). Jde o metodu s využitím komerčně dostupných protilátek, které jsou značeny fluorochromem. Pro imunofluorescenci je nutné použít řezy připravené ze zmrazené nefixované tkáně, což vyžaduje přizpůsobit průběh odběrové fáze, neboť transport do laboratoře musí proběhnout bezprostředně po odběru a za odlišných podmínek oproti tkáním standardně zpracovávaným metodou FFPE.

Imunofluorescenční vyšetření vykazuje vyšší diagnostickou úspěšnost (v různých studiích 67 – 88 % (27); ve srovnání s imunohistochemií, nevýhodou a určitou limitací však stále zůstává nutnost použít nefixovaný mražený materiál, neboť amyloid je velmi často náhodným nálezem. V případě vysoké klinické suspekce na amyloid je již při prvním odběru necílené biopsie vhodné poslat do laboratoře část odebraného materiálu také na imunofluorescenční vyšetření.

2.2.3 Imunoelektronová mikroskopie

Vysoce specializovaná pracoviště mají k dispozici imunoelektronovou mikroskopii, která spojuje výhody vysokého rozlišení elektronového mikroskopu se specificitou reakce antigen-protilátka a umožňuje ověřit kolokalizaci imunohistochemické reakce a amyloidové fibrily (28) (29).

2.2.4 Vyšetření založená na hmotnostní spektrometrii

Výše uvedené typizační metody jsou založené na reakci antigen-protilátka. Průkaz amyloidového proteinu je v tomto případě nepřímý, a proto s sebou nese jistá rizika nesprávné identifikace. Oproti tomu nejmodernější proteomické analýzy založené na hmotnostní spektrometrii přinášejí nespornou výhodu v přímém stanovení proteinu z minimálního množství amyloidu, navíc s vyloučením lidského faktoru. Pomocí této technologie lze vyšetřit jak vzorky FFPE, tak řezy ze zmražené tkáně a vzorky podkožního tuku. Do této skupiny vyšetřovacích metod řadíme kapalinovou chromatografii spřaženou s hmotnostní spektrometrií s přípravou vzorku laserovou mikrodisekcí (laser microdissection-liquid chromatography/mass spectrometry; LMD-LC/MS) a multidimenzionální technologii identifikace proteinu (multidimensional protein identification technology; MudPIT) založená na 2D-MS/MS, přičemž oba přístupy vyžadují odlišnou přípravu vzorku a separaci proteinů, ale jejich výsledkem je identifikace kompletního proteinového složení analyzovaného vzorku (30), (31).

K nejnovějším přístupům při diagnostice a typizaci amyloidu na bázi MS patří metoda MALDI-IMS MSI (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging coupled with ion mobility separation), která umožňuje přímou identifikaci a typizaci v histoanatomickém kontextu přímo na FFPE tkáňových řezech (in situ). Odpadá tak časově náročný postup LMD a proteinové extrakce. Vzhledem k tomu, že jde o nejmladší metodu, není zatím v diagnostice amyloidu široce rozšířená. (32), (33) (24).

Velkou výhodou MS metod je možnost použití archivního materiálu, jak FFPE tkáně, (zejména v případě náhodného nálezu amyloidu v diagnostickém vzorku) tak zamraženého vzorku.

Problematická se může jevit téměř ubikvitní a někdy i fyziologická přítomnost některých amyloidotvorných proteinů v různých tkáních i v krvi, což může ztížit správnou interpretaci proteomických výsledků. Ke zvýšení specifity analýzy lze použít specializovaný postup úpravy vzorku – laserovou mikrodisekci (LMD), pomocí které se z tkáně získá pouze čisté amyloidové depozitum a ostatní tkáňové komponenty (které jsou většinou zastoupeny v převažujícím množství) se odstraní (4). Spojení LMD s LC/MS zásadním způsobem zvyšuje senzitivitu a specifitu typizace amyloidových fibril a je v současnosti důrazně doporučovaná, pokud není na daném pracovišti dobře zavedená typizace pomocí imunohistochemie či imunoelektronové mikroskopie (34).

Zpracování tkáňového vzorku pro LC/MS analýzu začíná extrakcí proteinů a jejich digescí trypsinem na jednotlivé peptidy. Následuje separace pomocí kapalinové chromatografie a detekce pomocí hmotnostního spektrometru. Celý proces ve všech krocích zaštiťuje vysoce specializovaný software. Výsledkem této analýzy je seznam všech proteinů, ze kterých vyšetřovaný vzorek sestává, a to na základě identifikace peptidů. Při závěrečném hodnocení se používá třídění na základě jejich objemového zastoupení ve vzorku či vztahu k amyloidovým depozitům. Některé typy softwaru umožňují analýzu proteinového složení i dle posouzení mutovaných forem amyloigenních proteinů (hereditární varianty amyloidózy), což se následně potvrzuje genetickým vyšetřením pacienta.

Pokud poodhlédneme od prvotní motivace použití MS metod, kterou bezesporu je přesná diagnostika a typizace, hraje MS technologie neméně důležitou roli v odhalování nových variant amyloidózy a také k lepšímu porozumění patogeneze onemocnění.

3. Vyšetřovaný materiál

Předmětem vyšetření na přítomnost amyloidu může být jednak vzorek s náhodným nálezem amyloidu ve tkáni odebraný za jiným diagnostickým či léčebným účelem nebo vzorek od pacienta se suspekci na amyloidózu. V případě podezření je indikován nejdříve necílený odběr (podkožní tuková tkáň, drobná žláзка z oblasti rtu, sliznice rekta či vzorek z jazyka). Pokud v tomto vzorku není amyloid přítomen a klinický stav pacienta je vysoce suspektní z amyloidózy, indikuje lékař cílený odběr orgánu, jehož postižení je dominantní (srdce, ledvina).

4. Koprecipitované molekuly

Je dobře známo, že amyloidové depozitum je kromě fibrilárního proteinu složeno z dalších přídatných molekul. Některé z nich se v amyloidu vyskytují konstantně (např. sérový amyloidový protein P – SAP a glykosaminoglykan heparansulfát), jiné představují nepravidelnou složku (např. α 1-antichymotrypsin, apolipoprotein E – apoE, apolipoprotein A1 – apoA1, apolipoprotein A4 – apoA4), (1), (3), (4), (6). Asociace těchto molekul s amyloidovými depozity je dobře známa, nicméně jejich přesná funkce, prediktivní či prognostická hodnota nejsou zatím příliš dobře prozkoumány.

4.1 Sérový amyloidový protein P (SAP)

SAP je homopentamerický glykoprotein fyziologicky přítomný v lidské plazmě a spolu s C-reaktivním proteinem patří do rodiny pentraxinových proteinů. Pro tyto proteiny je charakteristická kalciová vazba. Pokud se SAP naváže na amyloidové fibrily (vazba je pevná, ale reverzibilní), získá tím amyloidové depozitum stabilitu a lepší odolnost vůči proteolýze a fagocytujícím buňkám (3). Na rozdíl od ostatního abnormálního proteinového materiálu není amyloid fyziologickými mechanismy odstraňován z extracelulárního prostoru, protože nespouští buněčnou ani zánětlivou reakci (35). Pro svou uniformní přítomnost ve všech typech amyloidu byl SAP zvažován jako potenciální terapeutický cíl. Tato imunobiologická léčba spočívá jednak v depleci SAP z plazmy (látkou [(R)-1-[6-[(R)-2-carboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxo-hexanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid; CPHPC) a následně v aplikaci anti-SAP protilátky, která spouští makrofagickou reakci, jejímž výsledkem je odstranění amyloidových depozit (35), (36), (37). Opakované podání této dvojice nových léčiv má dle nejnovějších studií potenciál ke zlepšení výsledků pacientů se systémovou amyloidózou (38).

Podrobná znalost přesného složení amyloidových depozit umožnila definovat „proteomický amyloidový podpis“ při vyšetřování aspirátů tukové tkáně, který dokáže odlišit vzorek obsahující amyloid od vzorku negativního. Detekce alespoň dvou ze tří proteinů (SAP, APOE a APOA4) svědčí pro přítomnost amyloidu ve vyšetřované tkáni se senzitivitou podobnou barvení Kongo červení (5).

4.2 Heparansulfát

Heparansulfát (někdy uváděný jako heparansulfát proteoglykan) se účastní patogeneze AA amyloidózy a jeho přítomnost ve všech amyloidových depozitech i s jinými amyloidotvornými fibrilárními proteiny svědčí o jeho univerzální funkci v amyloidogenezi (1).

5. Nejčastější typy amyloidózy

5.1 AL amyloidóza

Amyloidóza vznikající na podkladě lehkých řetězců imunoglobulinu je nejčastějším typem amyloidózy v naší oblasti a je řazena do skupiny plazmocelulárních dyskrázií. Přesná incidence v České republice není přesně známa, ale přibližný odhad lze učinit při znalosti incidence v jiných zemích, např. v USA je uváděna 5,1 až 12,8/1 mil. obyvatel za rok, v západní Evropě 0,8/100 000 obyvatel za rok (39), (40). V naší populaci lze proto odhadnout přibližně sto nových pacientů za rok.

Al amyloidóza může být asociována s mnohočetným myelomem (asi v 10-20 %), nebo vzácněji s lymfoplazmocytárním či jiným nonhodgkinským lymfomem (41), (42). Depozita amyloidu vznikají z kompletních molekul či fragmentů lehkých řetězců, které jsou produkovány klonálními plazmatickými buňkami. Tyto plazmocyty produkují častěji Ig lambda než Ig kappa. Amyloid lambda se predilekčně ukládá v ledvinách a AL kappa častěji postihuje gastrointestinální trakt a játra (43). Pacienti s Al amyloidózou mají typicky postiženy ledviny, srdce, játra a periferní nervový systém (44), (43). Srdeční postižení se vyvine až u 90 % nemocných a až v 50 % případů je již v době diagnózy přítomna klinická symptomatologie s diastolickým srdečním selháním (44).

Prognóza pacientů s AL amyloidózou je nejvíce určena právě postižením srdce a tento fakt zčásti určuje léčebnou strategii (45). Léčba pacientů s AL amyloidózou je zaměřena na eliminaci monoklonální plazmocytární populace, obvykle chemoterapií, imunoterapií nebo

autologní transplantací kostní dřeně. Právě tato náročná léčba je dostatečným zdůvodněním nutnosti naprosto přesné diagnostiky a typizace amyloidu.

5.2 Transthyretinová amyloidóza

Tento typ amyloidózy se vyskytuje jako získané i dědičné onemocnění. Získaná forma vzniká na podkladě wild-type proteinu transthyretinu (TTR), u dědičné formy je dosud popsáno více než 130 amyloidogenních mutací (46). Transthyretin je homotetramerní protein fyziologicky přítomný v krvi, je produkován dominantně hepatocyty, v menším množství také v plexus choroideus a retině. Právě disociace homotetrameru v monomery je patognomická pro vznik onemocnění.

Ačkoliv se jedná o nejčastější hereditární amyloidózu, je to vzácné onemocnění endemického charakteru. Vyskytuje se nejvíce v Portugalsku, Švédsku, Brazílii, na Kypru, Mallorce a v Japonsku, (47) (48). Penetrance a fenotypová variabilita jsou závislé na typu mutace. Klinické projevy tvoří spektrum, na jehož okrajích nacházíme familiární amyloidovou polyneuropatii (mutace Val30Met) a na druhém familiární amyloidovou kardiopatii (mutace Val122Ile), se spoustou překryvných obrazů mezi nimi (47). Jde často o multisystémové onemocnění s progresivním charakterem a končící smrtí v průměru po 10 letech (49), (50). Léčba TTR amyloidózy však dosáhla v posledních letech velkých pokroků a výrazně ovlivnila jak kvalitu, tak délku života nemocných. Léčiva se zaměřují na stabilizaci tetrameru transthyretinu či přímo na ovlivnění genetické příčiny či patologické proteinové produkce (tato terapie tak nabývá charakteru kauzální léčby), ve kterém se používají preparáty na principu RNA interference či antisense oligonukleotidů (50)

Forma získaného onemocnění transthyretinové amyloidózy je také nazývána senilní, což odráží skutečnost, že se projevuje ve vysokém věku (nad 60 let), a je predilekční u mužů. Dominujícím postiženým orgánem je srdce. (51)

5.3 AA amyloidóza

Amyloidóza typu AA je spojena s dlouhodobě zvýšenou hladinou sérového amyloidového proteinu A (SAA), což je doprovodný jev u chronických infekcí, chronických zánětlivých chorob či některých dědičných syndromů (52). Ačkoliv zvýšení hladiny SAA je pro vznik choroby krucální, ne u všech pacientů se zvýšenou hladinou SAA se nemoc rozvine. Samotný vznik AA amyloidózy je ovlivněn i dalšími faktory, např. některé genetické vlivy již byly popsány (53), (54)

Mezi hlavní klinické projevy patří postižení ledvin, přičemž proteinurie je přítomna v 95 % případů již v době stanovení diagnózy a determinuje prognózu nemoci. Amyloid AA typu však může být přítomen prakticky ve všech orgánech a podmiňovat tak mnohočetné symptomy pacientů (54).

Tabulka č. 1 Klasifikace amyloidózy – nejčastější a zajímavé subtypy.

Fibrilární protein (Celkem: Systémová - 18 proteinů Lokalizovaná – 22 proteinů)	Prekurzorový protein	Systémová a/nebo lokalizovaná	Získaná nebo hereditár ní	Postižené orgány
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	Z H	Všechny, většinou s výjimkou CNS
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	Z	Všechny s výjimkou CNS
AA	Serum amyloid A	S	Z	Všechny s výjimkou CNS
ATTR	Transthyretin, wild type	S	Z	Srdce zejm. u mužů, plíce, ligamenta, tenosynovium
	Transthyretin, variants	S	H	PNS, ANS, srdce, oči, leptomeningy
Některé vybrané proteiny: AApoAI, II, IV	Apolipoprotein AI, variants	S	H	Srdce, játra, ledviny, PNS, varlata, larynx, kůže
	Apolipoprotein AII, variants,	S	H	Ledviny
	Apolipoprotein AIV, wild type,	S	Z	Dřeň ledvin, systémové onem.
AApoCII, III	Apolipoprotein CII, variants,	S	H	Ledviny
	Apolipoprotein CIII, variants.	S	H	Ledviny
Aβ2M	B2-microglobulin, wild type, variants	S	Z, H	Muskuloskeletální systém (Z), ANS (H)
ALys	Lysozyme, variants	S	H	Kidney
Afib	Fibrinogen α, variants	S	H	Kidney
AIns	Insulin	L	Z	Iatrogenic, local injection

Upraveno podle: Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, Westermarck P. **Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee.** *Amyloid.* 2020 Oct;27(4):217-222. S – systémová; L – lokalizovaná; H – hereditární; PNS periferní nervový systém; ANS – autonomní nervový systém

6. Experimentální část

6.1 Úvod

V roce 1973 publikoval Westermarck novou metodu pro diagnostiku pacientů se suspektní systémovou amyloidózou – aspiraci podkožního tuku (subcutaneous fat aspiration, SFA) (55). Tento přístup znamenal pro pacienty zásadní změnu. Vysoká senzitivita (liší se dle jednotlivých studií v rozmezí 14% až více než 90% (56)) a specificita, nízké náklady na provedení a minimální zátěž pro pacienty dělá z tohoto přístupu ideální diagnostický nástroj. Oproti tomu cílené biopsie postižených orgánů (srdce, ledviny, játra) jsou zdrojem nezanedbatelného rizika komplikací pro pacienta a také jejich indikace je často omezená. I přes to, že SFA metoda byla popsána již před mnoha desetiletími, jsou orgánové biopsie stále nadužívané (57).

Navzdory jednoznačným výhodám existují také limity v podobě nízké senzitivity při použití SFA. Ta nastává zejména v případě celotělově malého množství amyloidových depotů, u pacientů s transthyretinovou amyloidózou či predominantně kardiálním postižením (56).

V rámci vyšetřovacích metod aplikovaných na vzorky získané pomocí SFA, je možné použít většinu běžně aplikovaných postupů – světelná a polarizační mikroskopie tukových nátěrů barvených konžskou červení, elektronová a imunoelektronová mikroskopie, fluorescence Kongo červeně, imunofluorescence, měření proteinové koncentrace pomocí metody ELISA, analýza metodou Western blott nebo nejmodernější proteomická analýza kapalinovou chromatografií spřaženou s hmotnostní spektrometrií LC/MS (29), (58), (59), (60), (61), (62), (5).

Z výše jmenovaných metod je jednoznačně nejjednodušší i nejlevnější mikroskopie, prováděná i s polarizačním vyšetřením Kongo červení barvených řezů. Pokud je použita modifikovaná metoda barvení Kongo červeně podle Puchtlerové, poskytuje metoda spolehlivý výsledek bez falešné pozitivivity kolagenu či podobných tkáňových součástí (15).

Proteomická analýza vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie je napříč různými tkáněmi považovaná za nejspolehlivější technologii ve srovnání s konvenčními barvicími metodami (5), (63). Jako amyloidotvorný protein je označen protein nejvíce zastoupený ve vzorku, přičemž musí být přítomny také další proteiny tzv. amyloidového podpisu (5).

6.2 Cíle studie

Práce se zabývá systémovou AL amyloidózou a její diagnostikou z materiálu podkožního tuku. Jednotlivé dílčí cíle lze shrnout následovně:

1. Práce srovnává jednotlivé vyšetřovací přístupy, konkrétně mikroskopické vyšetření nátěrů podkožního tuku barvených Kongo červení a proteomickou analýzu pomocí LC/MS.
2. Dále se zaměřuje na analýzu přídatných koprecipitovaných proteinů amyloidu.
3. Ve studii je ověřena metodika vytvoření cytobloku z části odebraného materiálu a její vhodnost k provedení imunohistochemického vyšetření, která tak spojuje výhody cytologického materiálu a imunohistochemické analýzy a rozšiřuje spektrum možných metod proveditelných z jediného odebraného vzorku.
4. Praktickým výstupem je formulace doporučeného diagnostického algoritmu z jediného odebraného vzorku za účelem nejvhodnějšího poměru nákladů a výpovědní hodnoty.

6.3 Materiál a metody

6.3.1 Výběr pacientů, aspirace podkožního tuku, Kongo barvení

Do studie bylo zařazeno 34 pacientů, osmnáct žen a šestnáct mužů ve věku od 37 do 79 let, kteří podstoupili tenkojehlovou biopsii podkožního tuku na Hemato-onkologické klinice FNOL v rámci standardního vyšetřovacího procesu při podezření na systémovou AL amyloidózu nebo během sledování v průběhu léčby. Všichni pacienti před odběrem podepsali informovaný souhlas s odběrem i s publikací anonymizovaných výsledků.

Diagnóza systémové amyloidózy byla u pacientů stanovena na základě průkazu amyloidu alespoň ve dvou tkáňových vzorcích v rámci kompletní diagnostiky (např. včetně bioptického vyšetření) a korelaci výsledků s podrobným klinickým vyšetřením.

6.3.2 Tenkojehlová aspirace podkožního tuku

Výkon tenkojehlového odběru podkožního tuku je rychlý a snadný a může být proveden ambulantně. Je třeba pacienty poučit, že po odběru mohou krátkodobě pociťovat bolest v místě vpichu a může se zde objevit také hematoma. Odběr se provádí vlevo či vpravo ve vzdálenosti cca 7-10 cm od pupku po předchozím lokálním znecitlivění. Během odběru

mohou nastat dvě komplikující situace. Může dojít k ucpání odběrové jehly či ke kontaminaci odebíraného materiálu větším množstvím krve při porušení cévy.

Aspirovaná tuková tkáň je následně nanesena v tenké vrstvě na podložní skla (s využitím komprese).

6.3.3 Speciální barvení Kongo červení

Podložní skla s tukovou tkání jsou přelita chlazeným alkoholem za účelem fixace materiálu. Následně probíhá speciální barvení. Nejprve se aplikuje Mayerův hematoxylin k obarvení jader přítomných buněk, následuje barvení alkoholovým alkalizovaným roztokem chloridu solného a alkoholovým alkalizovaným roztokem Kongo červeně. Po diferenciaci a odvodnění se nátěry překryjí krycím sklem.

6.3.4 Světelná a polarizační mikroskopie

Po nabarvení Kongo červení probíhá vyšetření v klasickém světelném mikroskopu, v němž jsou amyloidová depozita znázorněna jako sytě růžová až oranžová. Pro jednoznačné potvrzení, že jde o amyloid, je nutné umístit vzorek mezi dva polarizační filtry (zvané polarizátor a analyzátor), které při vzájemně kolmé rovině (tzv. Cross-Nikolova poloha, zorné pole co nejvíce ztmavne) znázorní amyloidová depozita díky dvojlomu světla.

Hodnocení množství přítomného amyloidu probíhá semikvantitativně:

negativní

pozitivní 1+ (plocha Kongo-positivního materiálu je do 1 % plochy vyšetřovaného vzorku)

pozitivní 2+ (plocha Kongo-positivního materiálu je 1 – 10 % plochy vyšetřovaného vzorku)

pozitivní 3+ (plocha Kongo-positivního materiálu je 10 – 60 % plochy vyšetřovaného vzorku)

pozitivní 4+ (plocha Kongo-positivního materiálu je nad 60 % plochy vyšetřovaného vzorku)

6.3.5 Cytoblok – zhotovení, imunohistochemické vyšetření

Tkáň pro cytoblok je standardně dodávána jako suspenze ve formalínovém roztoku.

Příprava tkáně ve formě cytobloku zahrnuje následující kroky:

1. centrifugace 5 min při 3000 otáčkách/min
2. odsátí přebytečné tekutiny nad sedimentem
3. přidání fixativa (fixační tekutina SUSA), fixace do druhého dne
4. vytvořená sraženina se přenesse do plastové kazetky a umístí do roztoku 90% alkoholu s Lugolovým roztokem, kde je ponechána do dalšího dne
5. přenesení materiálu do formalínu
6. vložení do tkáňového procesoru, následuje klasický postup vytvoření parafinového bloku

6.3.6 Proteomická analýza

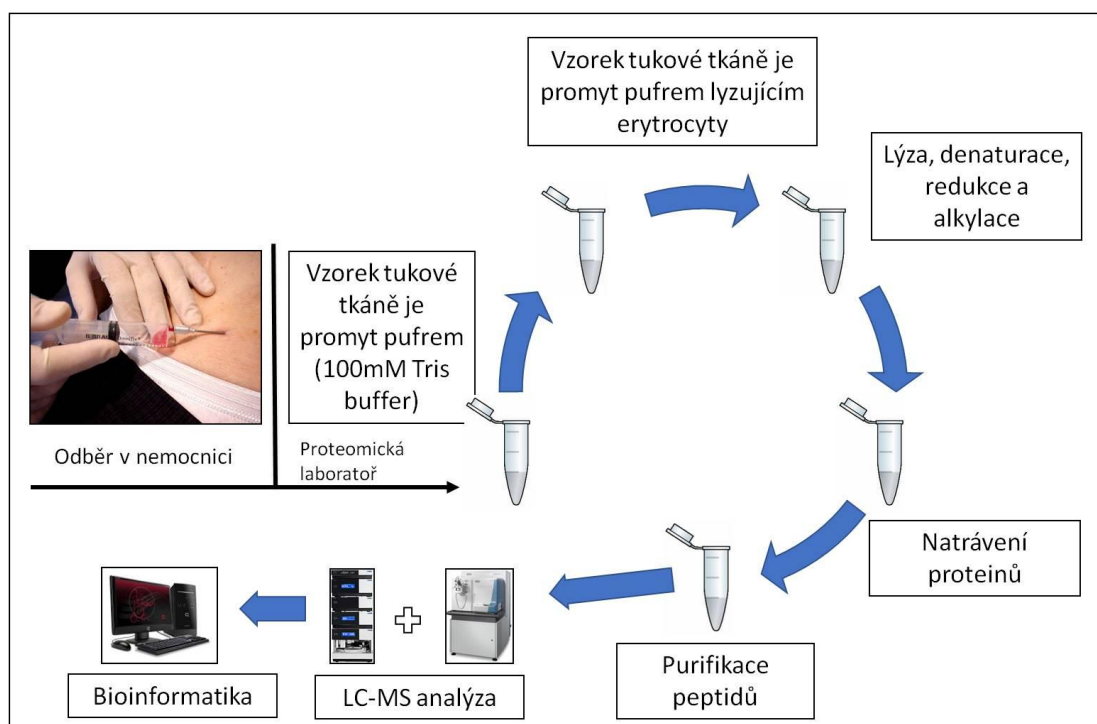
Vzorky tukové tkáně byly zpracovány pro LC-MS analýzu pomocí následujícího protokolu. Po odběru aspirátu tukové tkáně byl vzorek zmražen na teplotu -20°C . Vzorek byl rozmražen a poté byl promyt 100 mM Tris pufrem o pH 8,5; případné erytrocyty ve vzorku byly lyzovány erytrocytárním lyzačním pufrem (Qiagen) na ledu po dobu 15 min (5). Tuková tkáň byla homogenizována po dobu 3 min ($f = 1/30$) ve 100 μl lyzačního pufru (1% SDC, 10 mM TCEP, 40 mM CAA, 100 mM Tris o pH 8,5) a lyzována zahřátím při 95°C po dobu 10 min. DNA byla ve vzorku fragmentována pomocí sonikace (10 cyklů, 30 s – ON/OFF). Proteiny byly štěpeny pomocí 0,5 μg Trypsin/Lys-C enzymové směsi při 37°C po dobu 3 h. Štěpení proteinů bylo zastaveno okyselením vzorku na pH 2. Před dalším pokračováním bylo nutné odstranit SDC ze vzorku extrahováním do ethylacetátu. Vodná fáze s peptidy byla použita k přečištění peptidů na špičkách s C18 (63).

Chromatografie na obrácených fázích byla provedena na přístroji UltiMate 3000 RSLCnano systému spojeným s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion Tribrid přes ionizační zdroj EASY-sprej. Přibližně 1 μg peptidové směsi vzorku byl nastříknut a pre-konzentrován na trap-koloně (C18, 100 $\mu\text{m} \times 2$ cm) pomocí mobilní fáze A. Mobilní fáze A byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a mobilní fáze byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Peptidy byly separovány na EASY-sprej koloně (C18, 75 $\mu\text{m} \times 50$ cm) pomocí gradientu z 2% na 35% mobilní fáze B po dobu 60 min při průtoku 300 nl/min. Poté byla kolona promyta 95% mobilní fází B po dobu 5 min a ekvilibrována pomocí 2% mobilní

fáze B po dobu 20 min. Hmotnostní spektrometr sbíral data v DDA módu pomocí univerzální metody pro peptidovou identifikaci (64). Naměřená data byla zpracována v programu MaxQuant (65). Lidská UniProt databáze byla použita k prohledání naměřených dat s přednastaveným specifickým štěpením pro trypsin a s povolením max. 2 vynechaných štěpných míst. MS1 tolerance pro peptidy byla nastavena na 20 ppm a MS2 tolerance pro fragmenty byla nastavena na 0,6 Da. Jako variabilní modifikace byly nastaveny oxidace metioninu a acetylace N-terminálního konce peptidu. Jako fixní modifikace byla nastavena karbamidomethylace cysteinu. Byla použita funkce „Match between runs“. FDR pro identifikaci peptidů a proteinů bylo nastaveno na hodnotu 0,01.

Pro každý vzorek byl vytvořen proteomický expresní profil vytvořený ze všech identifikovaných proteinů. Amyloidní fibrilární proteiny a proteiny podílející se na tvorbě amyloidu byly vybrány a filtrovány od všech ostatních proteinů. Podtyp amyloidu v daném vzorku určil nejvíce abundantní amyloidní fibrilární protein.

Obrázek č. 1: Schéma průběhu proteomické analýzy.



6.3.7 Sledované parametry

U každého z pacientů zařazených do studie byly zjištěny následující hodnoty:

Celková bílkovina v séru (g/l).

Karnofského skóre.

Performance status dle WHO.

Přidružené B-lymfoproliferativní onemocnění.

Typ sérového M-proteinu.

Tabulka č. 2: Sestava sledovaných pacientů se všemi charakteristikami a výsledky.

Číslo vzorku	Klinické údaje								Polarizační mikroskopie				Proteomická analýza LC/MS			
	Věk	Pohlaví	Asociace s B- lymfoprolifera- tivním onemocněním	M- protein	Celková sérová bilkovina (g/l)	Karnof- ského index	WHO perfor- mance status	Typ amy- loidózy (S, L, 0)	Výsledek polarizační mikroskopie	Výsledek LC/MS	Konta- minace krví	De- tekce SAP	De- tekce ApoE	Typ detekovaného fibrilárního proteinu		
1	67	Ž	MM	lambda	60,3	60	2	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
2	55	Ž	MM	kappa	64,8	90	1	S	pozitivní 3+	pozitivní	ne	ano	ano	AL kappa – immunoglobulin light chain - kappa		
3	72	M	0	0	65,1	80	1	0	negativní	negativní	ne	ano	ano			
4	50	M	0	lambda	49,9	NA	NA	S	pozitivní 1+	pozitivní	ano	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
5	79	M	0	0	53,8	90	1	L	negativní	negativní	ne	ne	ano			
6	66	Ž	MM	lambda	45,5	60	2	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
7	72	Ž	MM	lambda	59,9	90	1	S	pozitivní 3+	pozitivní	ano	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
8	57	Ž	LPL/WMM	lambda	83,9	80	1	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
9	52	M	0	lambda	38,2	90	1	S	pozitivní 2+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
10	68	M	0	0	61,2	90	1	L	negativní	negativní	ano	ano	ano			
11	56	M	0	lambda	41,2	90	1	S	pozitivní 1+	pozitivní	ano	ano	ano	AL kappa – immunoglobulin light chain - kappa		
12	68	M	0	lambda	78,2	NA	NA	S	pozitivní 2+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
13	53	M	0	lambda	67,3	100	0	L	negativní	negativní	ne	ne	ano			
14	41	M	MM	lambda	69,9	100	0	S	pozitivní 4+	pozitivní	ano	ano	ano	AH – immunoglobulin heavy chain		
15	63	M	MM	lambda	77,5	100	0	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AH – immunoglobulin heavy chain; AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
16	75	Ž	MM	lambda	54,7	90	1	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
17	58	M	MM	lambda	45,5	100	0	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
18	55	Ž	MM	lambda	76	100	0	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
19	37	Ž	0	0	76	100	0	L	Negativní	Negativní	Ne	Ano	Ano			
20	67	Ž	MM	lambda	62,6	70	2	S	pozitivní 4+	pozitivní	ano	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
21	71	Ž	0	lambda	74,9	NA	NA	S	negativní	pozitivní	ano	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
22	78	Ž	0	lambda	47,5	80	1	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
23	62	Ž	MM	lambda	45,4	80	1	S	pozitivní 4+	pozitivní	ne	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
24	77	Ž	0	kappa	67,7	NA	NA	0	negativní	negativní	ne	ano	ano			
25	66	Ž	0	lambda	76,2	100	0	0	negativní	negativní	ne	ano	ano			
26	70	Ž	LPL/WMM	0	NA	NA	NA	0	negativní	pozitivní	ano	ano	ano	AH – immunoglobulin heavy chain; AL kappa – immunoglobulin light chain - kappa		
27	64	M	MM	kappa	63,3	70	2	0	negativní	pozitivní	ano	ano	ano	AL kappa – immunoglobulin light chain - kappa; AH – immunoglobulin heavy chain		
28	70	M	MM	lambda	66,2	80	1	0	negativní	negativní	ne	ano	ano			
29	60	Ž	MM	kappa	66,6	90	1	0	negativní	negativní	ne	ano	ano			
30	62	Ž	0	kappa	62,5	NA	NA	0	negativní	pozitivní	ano	ano	ano	AL lambda – immunoglobulin light chain - lambda		
31	69	M	MM	lambda	82,3	80	1	0	negativní	negativní	ne	ne	ne			
32	40	Ž	0	lambda	74	90	1	0	negativní	negativní	ano	ano	ne			
33	43	M	0	0	69,7	100	1	0	negativní	negativní	ne	ne	ano			
34	60	M	0	kappa	43,9	50	3	0	negativní	negativní	ano	ano	ano			

MM – mnohočetný myelom; LPL/WMM – lymfoplazmocytární lymfom/Waldenströmova makroglobulinemie; S – systémové onemocnění; L – lokalizované onemocnění; SAP – sérový amyloidový protein P; ApoE – apolipoprotein E; NA – data nejsou k dispozici

6.3.8 Statistická analýza

Data byla zpracována ve statistickém softwaru R, ver. 3.5.0 (www.r-project.org), diagnostické testy byly vyhodnoceny a porovnány funkcemi z R balíčku DTComPair, ver. 1.0.3. Hodnoty spojitých proměnných byly charakterizovány prostřednictvím kvantilů (1. kvartil, medián, 3. kvartil), resp. průměru a směrodatné odchylky (SD). Kvalitativní proměnné byla reprezentovány jako absolutní a relativní četnosti. Odhadnuté charakteristiky diagnostického testu – senzitivita (SE), specifická (SP), negativní prediktivní hodnota (NPV) a pozitivní prediktivní hodnota (PPV), byly uvedeny spolu s 95% konfidenčním intervalem (CI). Porovnání distribuce věku a hodnot celkového sérového proteinu ve skupinách pacientů dle diagnózy systémové amyloidózy bylo provedeno prostřednictvím Studentova t-testu, přičemž předpoklad normality byl ověřen pomocí Shapirova-Wilkova testu. Pro analýzu kontingenčních tabulek byl využit Pearsonův chí-kvadrát test, resp. Fisherův exaktní test. Statistická významnost rozdílu prediktivních hodnot diagnostického testu (NPV, PPV) byla testována pomocí generalized score statistic tak, jak je tato metoda implementována v R balíčku DTComPair. Hladina významnosti pro všechny statistické testy a odhady intervalu spolehlivosti byla nastavena na 5 %.

6.4 Výsledky

Ve skupině 34 pacientů byla u osmnácti z nich prokázána systémová amyloidóza. V šestnácti vzorcích amyloid přítomen nebyl, z toho u čtyřech pacientů byla diagnostikována lokalizovaná amyloidóza a ve dvanácti případech vyšetření neodhalilo žádnou z forem amyloidózy.

Sledováním asociovaných hematologických onemocnění byla zjištěna přítomnost B-lymfoproliferativní choroby u 66,7 % případů (12 pacientů), přičemž nejčastěji se jednalo o mnohočetný myelom (v 11 případech) a v jednom případě o lymfoplazmocytární lymfom/Waldenströmovu makroglobulinemii.

Ve dvanácti případech obsahovaly vzorky krevní kontaminaci, ačkoliv makroskopicky při odběru toto nebylo patrné.

Hodnoty celkové bílkoviny nevykazovaly signifikantní rozdíly (Studentův t-test, $p=0,138$) mezi pozitivními (tj. pacienti s dg. systémové AL amyloidózy) a negativními vzorky, se

středními hodnotami 66,4 g/l (negativní) a 59,8 g/l (pacienti se systémovou AL amyloidózou). Obdobně nebyla prokázána signifikantní odlišnost v ukazatelích Karnofského index a WHO performance status.

Tabulka č. 3: Souhrn charakteristik a výsledků dle statistické analýzy.

		systémová amyloidóza		p-value	total
		negativní	pozitivní		
věk	Median (q25-q75)	65 (58.25-70)	62.5 (55.25-67.75)	0.991*	63.5 (55.25-69.75)
	mean (SD)	62 (12.7)	62 (9.6)		
pohlaví	ž/m	7/9	11/7	0.504 [#]	18/16
B-lymfoproliferativní onemocnění	neg./poz. (MM/LPL-WM)	11/5 (4/1)	6/12 (11/1)	0.084 [#]	17/17 (15/2)
Celková sérová bílkovina (g/l)	Median (q25-q75)	66.6 (62.9-71.85)	60.1 (46-73.65)	0.138*	64.8 (53.8-74)
	mean (SD)	66.4 (9.38)	59.8 (14.48)		
Karnofského index	<80/≥80	2/11	3/12	1 ^{##}	5/23
WHO performance status	0/1/2/3	3/8/1/1	4/8/3/0	0.7995 ^{##}	7/16/4/1
SAP	neg./poz.	4/12	0/18	0.039 ^{##}	5/30
ApoE	neg./poz.	2/14	0/18	0.214 ^{##}	3/32

* Studentův t-test

Pearsonův chí kvadrát test

Fisherův exaktní test

Ve skupině 18 pozitivních vzorků se nacházelo 17 pacientů s AL amyloidózou lambda a pouze jediný AL kappa, což je zcela v souladu s literárními údaji o převládajícím typu AL lambda.

Při porovnání paraproteinu (lehký řetězec kappa nebo lambda, M-protein) detekovaného laboratorně v séru a proteomickým stanovení amyloidogenního lehkého řetězce v analyzovaném vzorku podkožního tuku pomocí LC/MS byla zjištěna shoda v 94 % (16/17 vzorků). LC/MS metoda identifikovala v některých případech kombinaci amyloidu z lehkých a těžkých řetězců imunoglobulinů (tedy kombinaci AL a AH amyloidózy), a to díky vysokému a v minoritě případů také dominantnímu zastoupení těžkých řetězců ve vzorku. Jeden ze dvou vzorků, kde nebyla nalezena shoda, byl kontaminovaný krví, a ve výsledku byl

jako lehký řetězce stanoven Ig kappa, ačkoliv pacient má AL amyloidózu lambda. V druhém případě proběhlo vyšetření po léčbě a u pacienta s IgA lambda v séru stanovila LC/MS jako dominující fibrilární protein IgG.

LC/MS analýza je robustním nástrojem, který umožňuje detekci kompletního proteinového spektra ve vzorku. Proto jsme se ve studii zaměřili také na koprecipitované proteiny, které jsou důležitým indikátorem pro celkové posouzení proteinového spektra. Ve shodě s očekáváním obsahovaly všechny vzorky od pacientů se systémovou AL amyloidózou oba jak SAP tak apoE. Tyto dva proteiny byly vybrány jako reprezentativní zástupci přídatných amyloidových proteinů. Na druhou stranu, oba tyto proteiny byly až na jedinou výjimku přítomny také ve všech vzorcích od negativních pacientů.

Při porovnání výsledků stanovení diagnózy amyloidózy získaných oběma metodami nacházíme odlišnosti v senzitivitě i specifitě. Zatímco mikroskopické vyšetření vykazuje 100% specifitu a 94% senzitivitu, specifita LC/MS analýzy dosáhla pouze 81 % při 100% senzitivitě. Pozitivní prediktivní hodnota byla nižší u proteomické analýzy (86 %) ve srovnání s mikroskopií (100 %), avšak negativní prediktivní hodnota nevykazovala signifikantní rozdíly (generalized score statistic test method, $p=0.302$). Rozdíl v pozitivní prediktivní hodnotě byl signifikantní na 10% hladině významnosti (generalized score statistic test method, $p=0.061$).

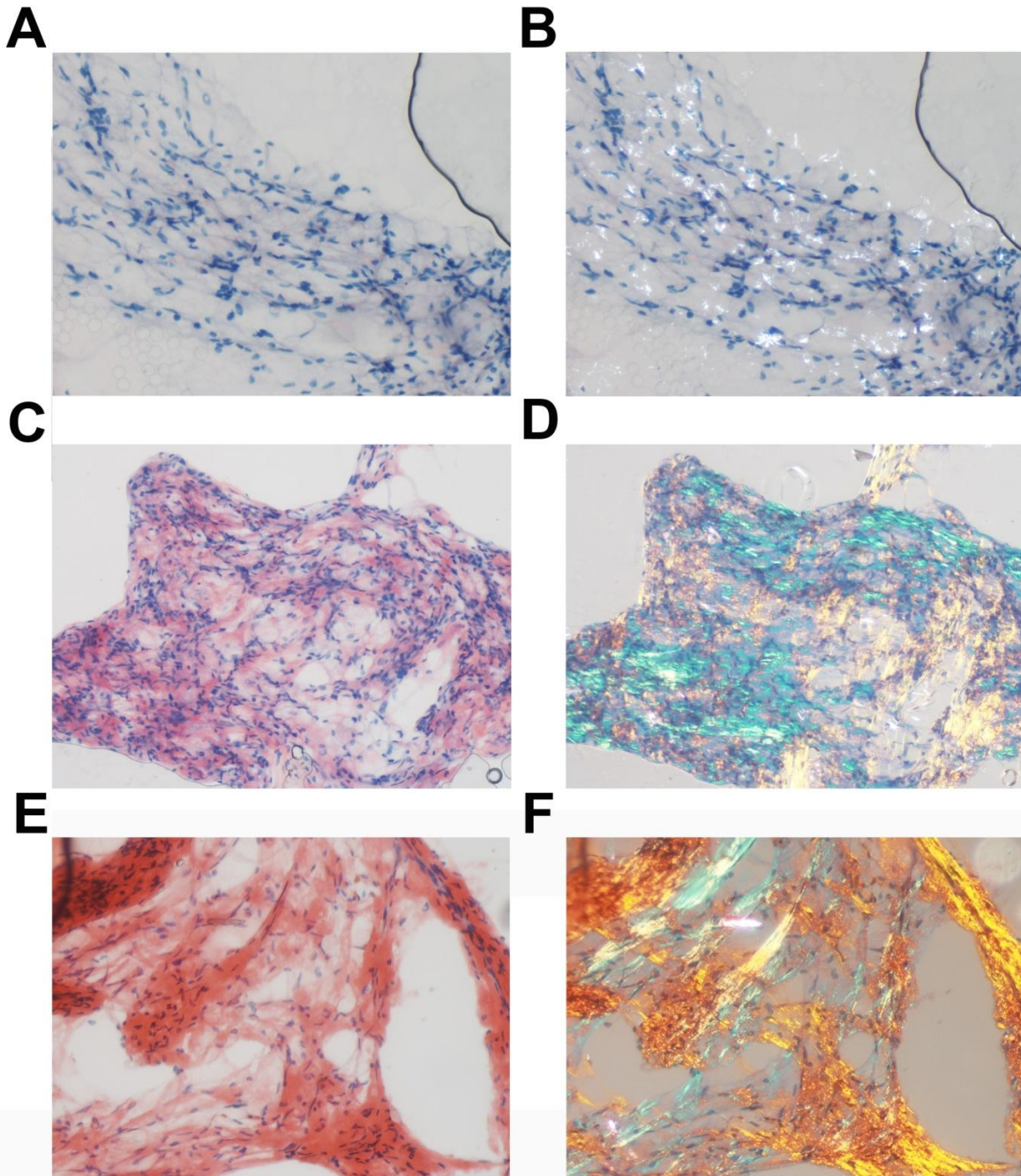
Tabulka č. 4: Srovnání výsledků získaných oběma metodami – mikroskopickým vyšetřením a proteomickou analýzou LC/MS. CI= konfidenční interval

	specifita s 95 % CI	senzitivita s 95 % CI	pozitivní prediktivní hodnota s 95 % CI	negativní prediktivní hodnota s 95 % CI	procento správně určených vzorků
mikroskopie	100 % (100 %, 100 %)	94 % (84 %, 100 %)	100 % (100 %, 100 %)	94 % (83 %, 100 %)	97.1 %
LC/MS	81 % (62 %, 100 %)	100 % (100 %, 100 %)	86 % (71 %, 100 %)	100 % (100 %, 100 %)	91.2 %

Metodou mikroskopie bylo správně diagnostikováno 33 z celkových 34 vzorků (97 %), přičemž proteomická analýza byla úspěšná v 91 % (31 vzorků). Proteomicky byly tři vzorky falešně pozitivní, ani jeden nebyl falešně negativní. Mikroskopicky byl jeden vzorek falešně

negativní a žádný falešně pozitivní. Všechny problematické vzorky ve smyslu falešné positivity se vyskytly společně s kontaminací vzorku krví, což považujeme za příčinu.

Obrázek č. 2: Nátěry podkožní tukové tkáně barvené Kongo červení, původní zvětšení 100×.

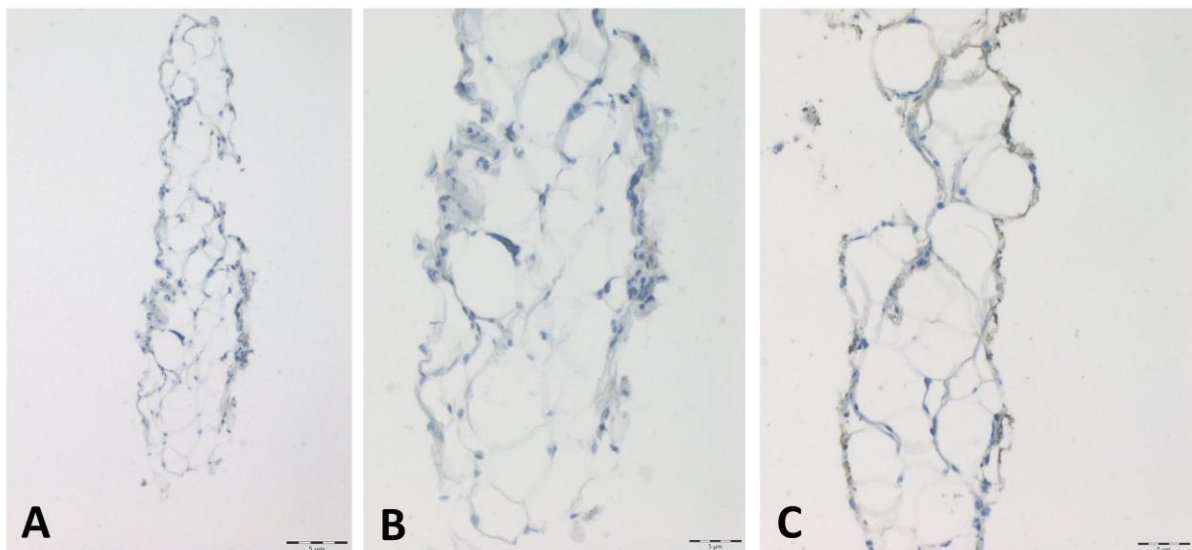


Obrázek A+B znázorňuje negativní vzorek. Vzorky C+D a E+F vykazují pozitivitu 4+ (plocha Kongo-pozitivního materiálu je nad 60 % plochy vyšetřovaného vzorku). Obrázky B, D, F znázorňují polarizační vyšetření. Odlišné barevné spektrum v polarizačním vyšetření (srov. obrázek D a F) je způsobeno odlišnou tloušťkou tukové tkáně/amyloidu.

Cytobloky vytvořené v rámci pilotní studie u dvou pacientů z části odebraného materiálu aspirátu tukové tkáně obsahovaly reprezentativní materiál v dobré přehlednosti a vyšetřitelnosti. Z cytobloků byly zhotoveny řezy k provedení základního, speciálního a imunohistochemického vyšetření. Množství tkáně, ač dosahovala velikosti řádu pouze milimetrů v největším rozměru, bylo pro všechna tato vyšetření dostačující. V porovnání s nátěrovými preparáty je přehlednost tkáně cytoblokových řezů výrazně lepší, tkáň je rovnoměrně prostorově rozložena a díky tenkému řezu je přítomna nejvýše jedna vrstva tukových buněk. Nenacházíme zde artefakty, jako jsou přeložené části tkáně za vzniku oblastí o vysoké tloušťce, které jsou pro diagnostické účely nevhodné až nepoužitelné (arteficiálně vychytávají barvivo). Velmi dobře jsou zastíženy také cévy, které jsou v morfoloické diagnostice amyloidózy důležité. Dobře zřetelné cévní struktury se v nátěrech tukové tkáně nenacházejí. Ani jeden z pacientů, od kterého byla tkáň do cytobloku zpracována, bohužel neměl diagnostikovanou systémovou amyloidózu, vzorky byly proto negativní. Abychom ověřili možnost provedení imunohistochemického vyšetření, aplikovali jsme protilátku proti S-100 proteinu, který je exprimován adipocyty, a to cytoplazmaticky. Výsledek IHC barvení byl vysoké kvality, srovnatelné s klasickou biopsií.

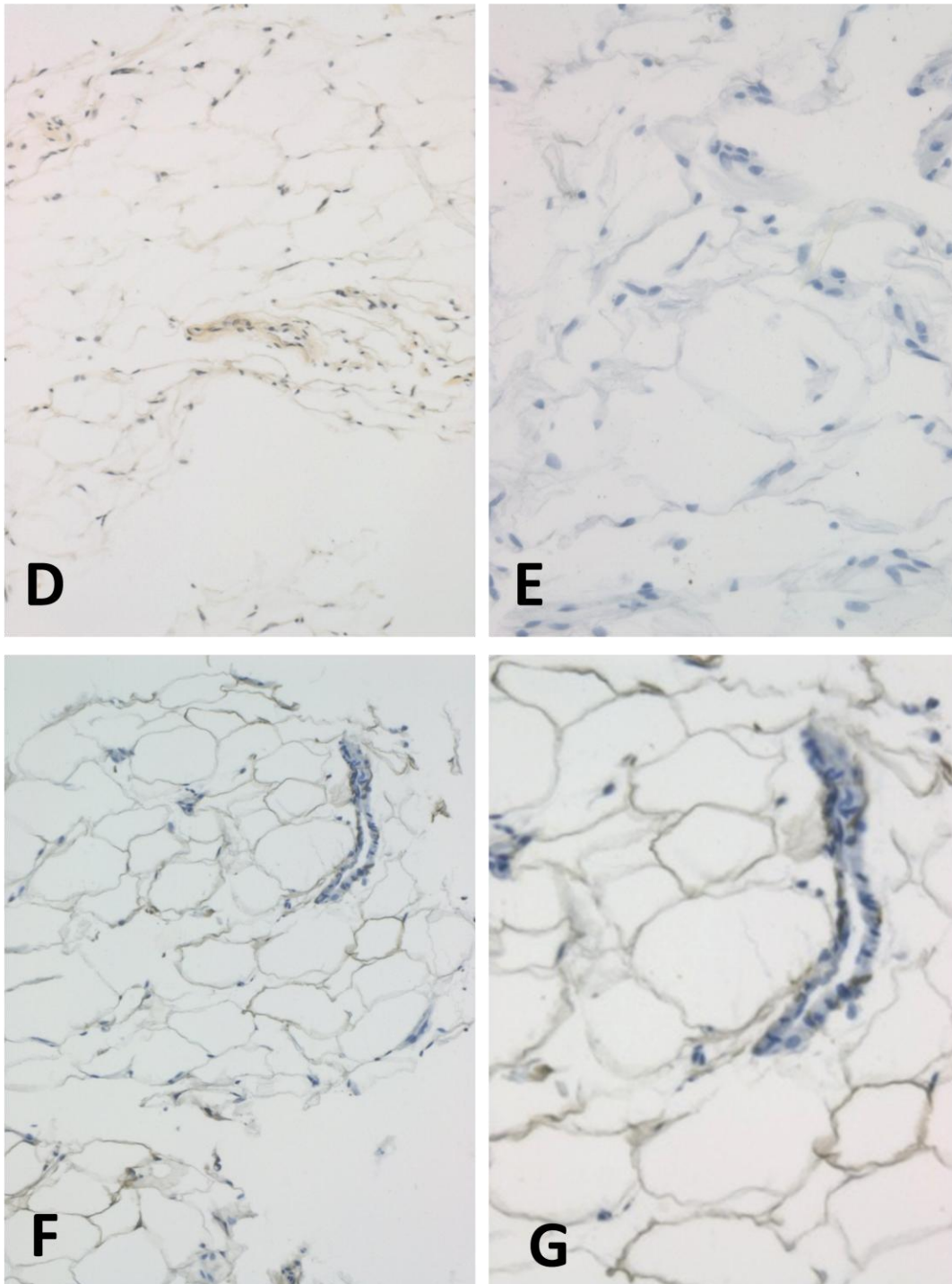
Obrázek č. 3: cytobloky.

Obr. 3.1 Tkáňové řezy z cytobloku, A-C.



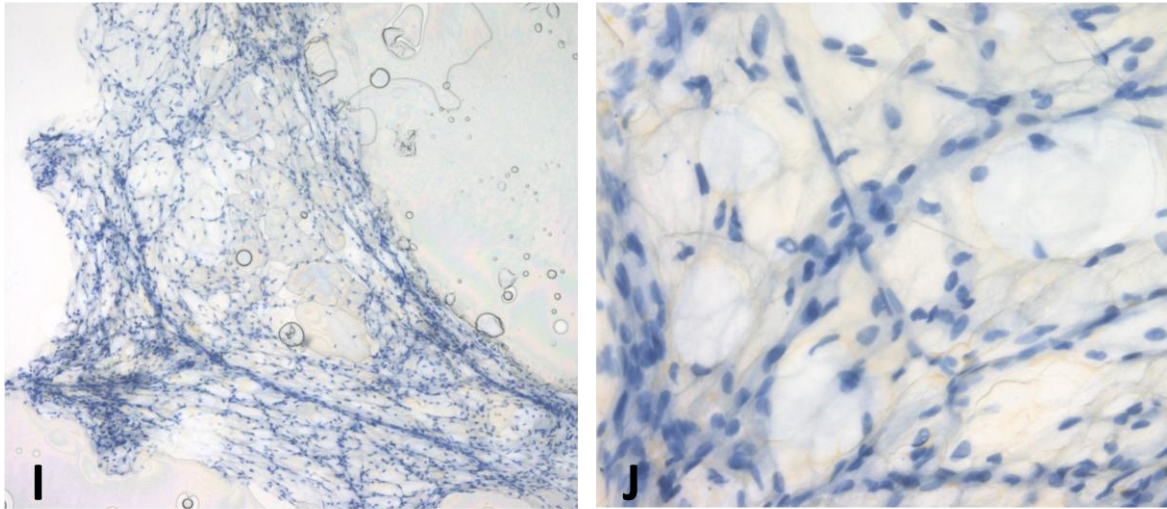
Barvení Kongo červeň, původní zvětšení 40× (A) a 100× (B), s měřítkem. V obr. A je zastížena v zorném poli celá plocha tkáně. V obr. (C) znázorněno imunohistochemické vyšetření s protilátkou anti-S100, cytoplazmatická pozitivita, původní zvětšení 100×.

Obr. 3.2 Tkáňové řezy z cytobloku, D-G.



Barvení Kongo červeň, původní zvětšení 100× (D) a 200× (E). V bloku D zastíženy četné průřezy cévami. V imunohistochemickém vyšetření s protilátkou anti-S100, cytoplazmatická pozitivita, původní zvětšení 100×(F) a 200× (G).

Obr. 3.3 Nátěry tukové tkáně, I-J.



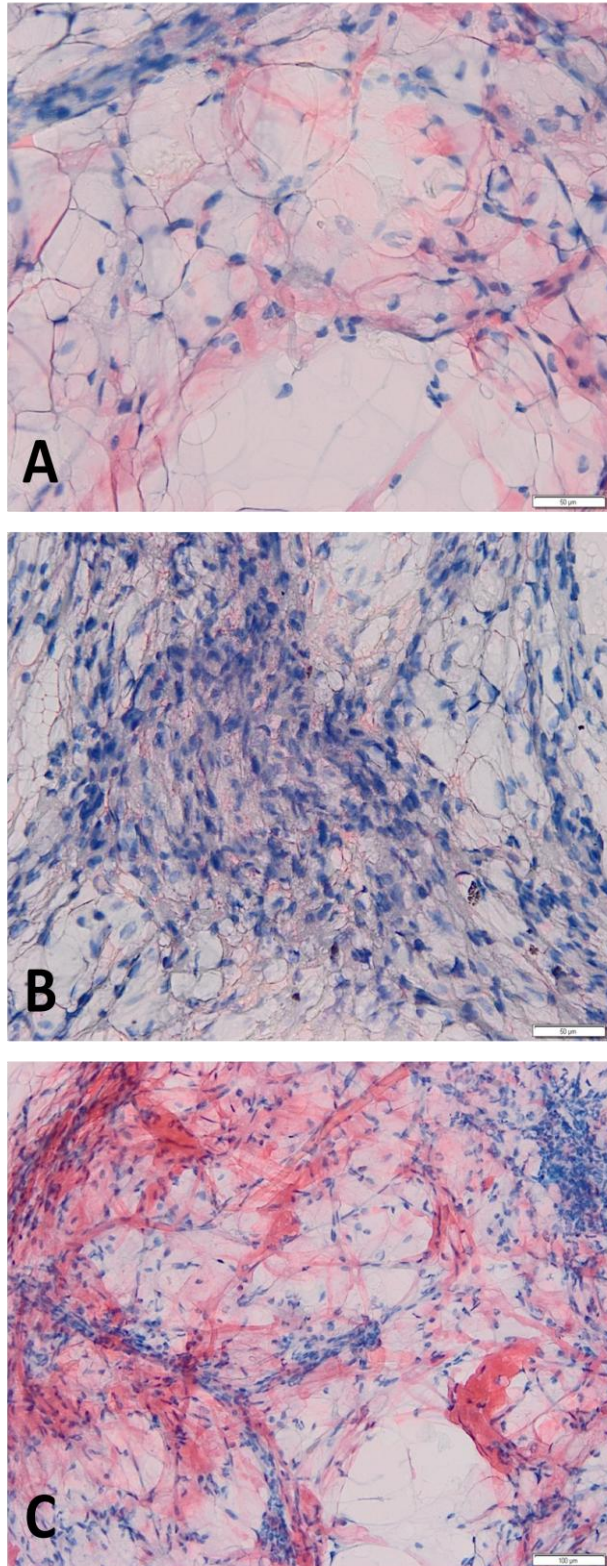
Barvení Kongo červeň, původní zvětšení 40× (I) a 200× (J). Tkáň vykazuje artefakty v podobě přeložených okrajů.

6.5 Diskuze

Studie měla zodpovědět na otázku, zda je mikroskopické vyšetření aspirátů tukové tkáně dostatečně spolehlivou metodou v diagnostice systémové AL amyloidózy ve srovnání s robustní technologií hmotnostní spektrometrie (LC/MS). Zatímco mikroskopické vyšetření nátěrů podkožního tuku barvených Kongo červení je celosvětově dostupné v patologických laboratořích i toho nejzákladnějšího vybavení, technologické zázemí LC/MS se nachází pouze ve velkých výzkumných a lékařských zařízeních. Je třeba podotknout, že správné provedení obou metod je závislé na dostatečných zkušenostech odborníků.

V případě mikroskopie je zásadní dodržet správný postup barvení za použití spolehlivého barvicího protokolu včetně pozitivní kontroly. Samotná mikroskopie vyžaduje zkušeného patologa, který rutinně provádí diagnostiku pomocí polarizačního vyšetření, neboť se jedná o náročné hodnocení.

Obrázek č. 4: Nátěry podkožní tukové tkáně v barvení Kongo červeň.



Obr. A – vzorek hodnocený jako pozitivní 2+, původní zvětšení 200×. Obr. B – vzorek hodnocený jako pozitivní 2+, původní zvětšení 200×. Obr. C – vzorek hodnocený jako pozitivní 4+, původní zvětšení 100×.

Největším nedostatkem mikroskopického vyšetření podkožního tuku je nemožnost určit konkrétní subtyp onemocnění amyloidózou. Výsledkem je pouze informace, zda je či není amyloid přítomen. Pro zahájení léčby tak ošetřující lékař potřebuje znát výsledky dalších vyšetření, což může být spojeno s dodatečnými odběry tkání (bioptické vzorky). Tato skutečnost představuje opakovanou zátěž pro pacienta a je též spojena s dalšími náklady na zpracování vzorku a imunohistochemické či imunofluorescenční vyšetření.

V historickém ohlédnutí můžeme nalézt několik metod, které umožňují určení typu amyloidu ze vzorku podkožní tukové tkáně. Jedná se např. o Western blotting (61), (62), imunohistochemie aplikovaná na tkáňové řezy z cytobloku (66), imunofluorescence (59), imunoelektronová mikroskopie (29) a ELISA (60).

Proteomická analýza pomocí LC/MS umožňuje v jednom kroku provést diagnostiku přítomnosti amyloidu i typizaci, o který konkrétní typ amyloidu se jedná, navíc zároveň určí celé proteinové spektrum vzorku. Jediné vyšetření pomocí LC/MS tak poskytne velmi mnoho podrobných informací. Velkou výhodou je možnost použití zmrazeného dlouhodoběji uchovávaného vzorku.

V naší studii jsme navázali na práci z roku 2009, Halloush et al. (66), která byla dle všeho první, která ověřovala možnost využití cytobloku v diagnostice amyloidu. Přestože jde o metodu snadno aplikovatelnou s dobrými výsledky, není literárně širěji diskutována. Dle našich výsledků lze zhotovení cytobloku z aspirátu tukové tkáně velmi doporučit, neboť přehlednost tkáně ve speciálním histologickém barvení Kongo červeně je nesrovnatelně vyšší kvality než v nátěrech a největším benefitem je možnost aplikace imunohistochemického vyšetření. Tím se z metody čistě diagnostické, kterou dosud mikroskopie podkožního tuku byla, stává metoda typizační, srovnatelná s klasickou tkáňovou biopsií, ovšem s neporovnatelně vyšším komfortem pro pacienta.

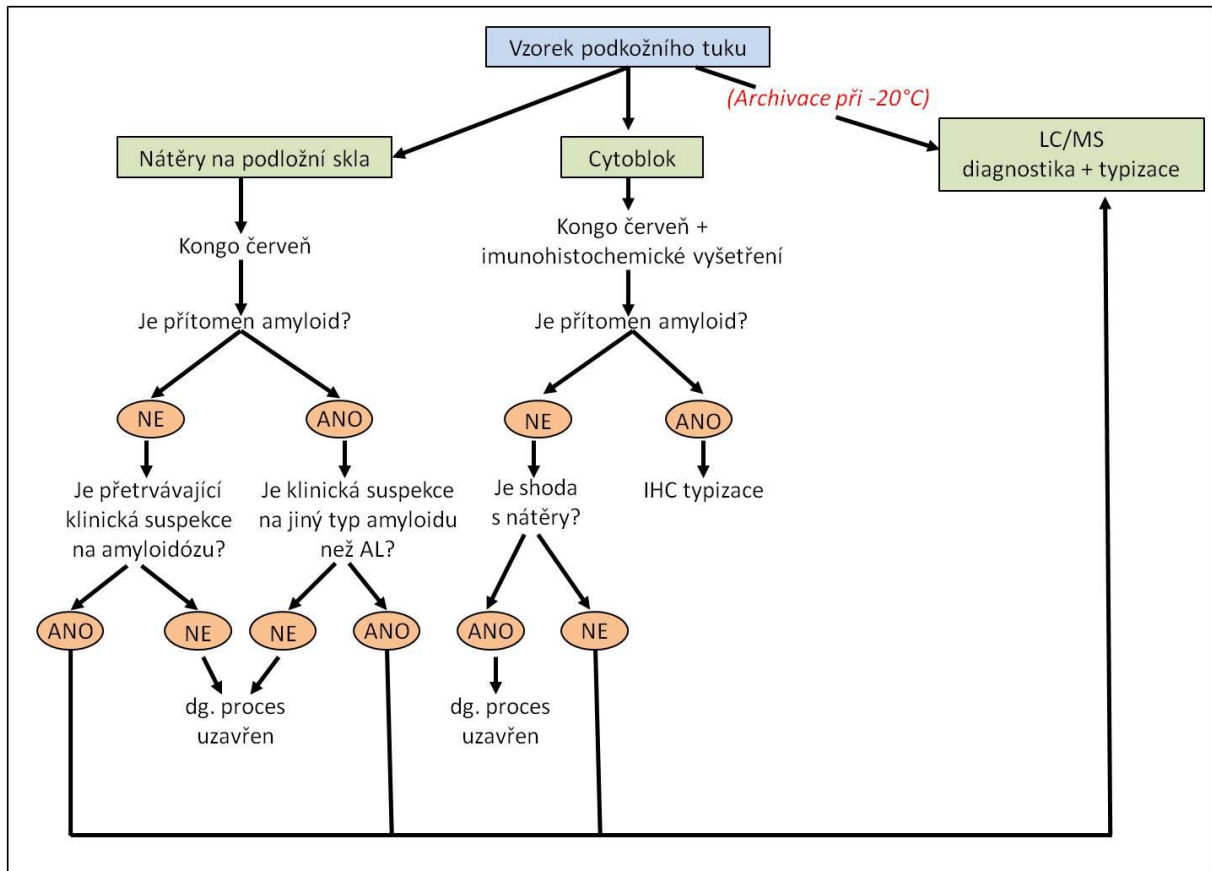
Porovnáním výhod a nevýhod obou přístupů – mikroskopie a proteomické analýzy – se jeví jako ideální diagnostický postup spojení obou do jednoho vyšetřovacího postupu. Lze tak učinit paralelně, provést obě metody zároveň, i sériově, tedy nejprve provést klasické mikroskopické vyšetření a teprve v případě neúspěchu či ve složitějším případě indikovat další analýzu – LC/MS. Tato druhá možnost vychází jako nejvíce praktický a náklady šetřící způsob plánování diagnostického procesu a zároveň lze provést tak, aby pacient byl co

nejméně zatížen, ideálně tedy pouze jediným odběrem podkožního tuku. Naše doporučení je tedy provést aspiraci podkožního tuku, získaný vzorek rozdělit na dvě části, z první části zhotovit nátěry pro barvení Kongo červení a cytoblok a druhou část vložit do zkumavky, zamrazit a uschovat pro pozdější použití. Pokud je daný případ diagnosticky obtížný nebo amyloid nebyl mikroskopicky detekován navzdory typickým klinickým projevům svědčícím pro amyloidózu, lze zamražený vzorek zaslat na specializované pracoviště umožňující analýzu LC/MS. Diagnostické rozpaky většinou budí případy koincidence dvou onemocnění, která obě samy o sobě mohou vyvolat systémovou amyloidózu (např. pacient s MM/MGUS a chronickou zánětlivou chorobou nebo nosič amyloidogenní mutace v genu pro transthyretin s nově propuknutou monoklonální gamapatií). Mezi zcela raritní případy patří výskyt dvou různých typů amyloidózy u jediného člověka, což reprezentuje skutečnou diagnostickou výzvu (67).

Mezi důležité závěry předložené studie patří zjištění, že i okem neviditelná kontaminace vzorku tukové tkáně krví významným způsobem zhoršuje spolehlivost vyšetření pomocí proteomické analýzy. Lze proto jen důrazně doporučit jako preventivní opatření zařadit do rutinního prováděcího protokolu postupy eliminující tuto kontaminaci (proplach tkáně a lýza erytrocytů), některé tyto procedury jsou literárně popsány (62).

V analýze koprecipitovaných molekul byla naše zjištění překvapivá nízkou výpovědní hodnotou přítomnosti detekovaných proteinů, neboť vybrané proteiny SAP i apoE byly rozsáhle zastoupeny i ve vzorcích pacientů, kteří systémovou amyloidózu nemají. Toto pozorování tak zpochybňuje literárně uváděné využití „proteinového podpisu“ v diagnostice amyloidu (5). Můžeme proto uzavřít, že absence těchto molekul vylučuje přítomnost amyloidu, avšak jejich přítomnost amyloidová depozita v tukové tkáni nepotvrzuje.

Obrázek č. 5: Doporučený diagnostický algoritmus pro tkáň získanou aspirací podkožního tuku.



6.6 Závěr

Na základě výsledků studie i několikaleté zkušenosti s využíváním LC/MS metody při vyšetřování pacientů s amyloidózou můžeme doporučit všem patologům, aby se v rutinní diagnostice zaměřili na jednoduchý diagnostický postup, kterým bezesporu mikroskopické vyšetření nátěrů tukové tkáně barvených Kongo červení je, zároveň však s kryoprezervací malé části vzorku nativní tukové tkáně pro případ nutnosti následné proteomické analýzy. Pokud je barvení nátěrů provedeno kvalitně dle spolehlivého protokolu a samotnou mikroskopii provádí zkušený patolog, poskytuje metoda spolehlivou informaci o přítomnosti amyloidu ve tkáni. Zároveň je vhodné zařadit do metodiky zpracování tukové tkáně také zhotovení cytobloku s adekvátním speciálním a imunohistochemickým barvením. Dle našich dlouhodobých pozorování hraje proteomická analýza nezastupitelnou roli při řešení složitých diagnostických případů, zejména takových, kde standardní postup vyšetření bioptických vzorků selhává.

Část II. Studium metylačních změn u mnohočetného myelomu

1. Úvod

1.1 Epigenetické změny

Epigenetickými modifikacemi rozumíme změny ovlivňující expresi genů, jež nejsou zakódovány v primární sekvenci DNA. Zatímco geneticky podmíněná dědičnost spočívá v přenosu informací na základě genové sekvence, epigenetika pojednává o dědičných změnách na posttranslačních úrovních genové exprese. První zmínky o epigenetických faktorech, vlivech vnějšího prostředí na projev dědičných vlastností můžeme spatřit v roce 1942, kdy Sir Waddington definoval pojem epigenetika (68). Mezi nejlépe prostudované epigenetické mechanismy se řadí metylace cytosinu (C) v DNA, modifikace chromatinu a nekódující RNA. Podstatnou vlastností epigenetických změn je ovlivnění genové exprese cestou remodelace chromatinu, vedoucí k vytvoření oblastí chromatinu, které jsou transkripčně aktivní či inaktivní. Na rozdíl od změn sekvence DNA jsou epigenetické změny dynamické a reverzibilní, což s sebou nese velký terapeutický potenciál (69), (70).

1.1.1 Methylace DNA

Methylace DNA je nejznámější epigenetickou modifikací, hraje zcela zásadní roli v kontrole jaderné architektury, jejímž důsledkem je změna genové exprese (68). Kovalentní vazba metylové skupiny z donorové sloučeniny - S-adenosylmethioninu – na pátý uhlík cytosinu DNA je zprostředkována DNA-metyltransferázami (DNMTs).

Nejčastěji jsou popisovány DNMT1, DNMT3A a DNMT3B. Zatímco exprese DNMT3A a DNMT3B je spojována s nádorovou proliferací a jsou proto označovány jako de novo DNA methyltransferázy, DNMT1 zachovává metylační vzorec po replikaci na nově syntetizovaném DNA vlákně podle vlákna kódujícího (68).

Methylace DNA je děj evolučně konzervovaný, při kterém ovlivňuje 5-methylcytosin (5mC) transkripční aktivitu genů, která je dědičná, přenosná z generace na generaci, aniž by docházelo ke změnám primární DNA sekvence (71). Methylace cytosinů probíhá na 5' cytosinu dinukleotidů CpG, jejichž lokalizace v lidském genomu není na vlákně DNA náhodná. Dinukleotidy se vyskytují v klastrech – shlucích – zvaných CpG ostrůvky, které jsou lokalizovány v oblasti promotoru až u šedesáti procent genů, zejména genů houskeepingových a tumor-supresorových (72), (69). Za vysoce frekventní výskyt CpG dinukleotidů je považován jeden CpG dinukleotid na deset nukleotidů, což naznačuje důležitost metylačních změn v ovlivnění

exprese genů. V lidském genomu je metylováno 70 – 80 % dinukleotidů CpG. V savčím genomu se však většina metylované DNA vyskytuje v oblastech repetitivních elementů, které tvoří asi 45 % genomu (72), (73).

Hypermetylace ostrůvků CpG v promotorech příslušných genů vede k jejich umlčení, jedná se o tzv. „silencing“. Genový „silencing“ se výrazně uplatňuje ve dvou situacích. První z nich je fyziologické umlčení genů, které se zapojují v ontogenezi jedince. Genomický „imprinting“ je specifické označování určitých sekvencí DNA metylací a tato modifikace může ovlivňovat transkripci genů lokalizovaných v příslušné sekvenci DNA. Imprintingu genů přítomných na X chromozomu u žen či tkáňově specifických genů hraje nenahraditelnou roli v regulaci exprese těchto genů při ontogenetickém vývoji jedince (70). Druhým případem je klíčový význam metylačních změn v DNA úsecích promotorových oblastí zejména tumor-supresorových genů vedoucí k nádorové transformaci a s tím souvisejícím vznikem a progresi nádorových onemocnění. Fyziologicky jsou ostrůvky CpG převážně hypometylované.

U nádorových onemocnění dochází kromě hypermetylace promotorů genů také ke globální hypometylaci genomu, a ta vede ke značné genomové nestabilitě (např. nádory prsu, žaludku, tlustého střeva a prostaty) (73). Na zvířecích modelech bylo zjištěno, že globální hypometylace genomu vede ke zvýšení mutačního stavu a chromozomové nestabilitě (73).

Naproti tomu hypermetylace promotorových úseků tumor-supresorových genů je typickým znakem nádorové transformace, vede ke snížení jejich exprese nebo k umlčení (silencing) jejich transkripce. Změny v nádorové patogenezi se týkají genů působících v buněčném cyklu, ovlivňujících proliferaci buněk a jejich přežití, mezibuněčné interakce nebo apoptózu (68). Komplexní metylační změny genomu (nazývané jako aberantní DNA metylační vzorec) – globální hypometylace genomu a lokální hypermetylace promotorových ostrůvků CpG klíčových genů – patří u nádorů k velmi častým molekulárním změnám (73), (70), (74).

1.1.2 Modifikace histonů

Chemické modifikace histonů, které probíhají posttranslačně a jsou reverzibilní, mohou mít charakter metylace, acetylace, ubiquitylace, fosforylace, ADP-ribosylace, sumoylace či deiminace (68), (75).

Acetylace histonů patří mezi nejvíce prostudované posttranslační modifikace a hraje hlavní roli v remodelaci chromatinové struktury a tím v modulaci transkripce genů (68). Acetylaci katalyzují histonacetyltransferázy (HAT), opačný děj potom histondeacetylázy (HDAC). Transfer acetylové skupiny z acetyl-CoA na lyzinové zbytky histonů má za následek aktivní genovou expresi a rozvolněný chromatin. Deacetylace působí opačně, chromatin je kondenzovaný a transkripčně inaktivní (75).

Metylace histonů je komplexnější děj s ohledem k tomu, že může existovat ve formě mono-, di-, tri-metylace lyzinových zbytků a jako mono-, di-, tri-metylace argininových zbytků. Úroveň metylace jednotlivých míst pak definuje konečný efekt tohoto stavu. Existují tedy vzorce, které jsou spojeny s aktivní genovou transkripcí (H3K4me3, H3K36me3, H3K79me3, H4R3me1, H4K20me1) a s genovým útlumem (H3K9me3, H3K27me3) (75). Zatímco metylace DNA je poměrně konstantní, stav histonových modifikací je proměnlivý v čase, jednotlivé modifikace se ovlivňují navzájem a je popsána komplexní interakce DNA metylace a histonových modifikací za účelem regulace genové exprese (75).

1.1.3 Epi-mikroRNA

Molekuly mikroRNA (miRNA) patří do velké skupiny nekódující RNA a jejich funkce je zcela zásadní v mnoha fyziologických i patologických procesech, mimo jiné je jejich cílem mRNA kódujících genů s negativním ovlivněním jejich exprese (68). Pro skupinu miRNA, které se podílí na regulaci epigenetických procesů se začal používat název epi-miRNA (68). miRNA ovlivňují jednak tumor-supresorové i onkogenní geny, jednak samotné klíčové enzymy (DNMT, HDAC) a je popsáno, že jak DNA metylace, tak histonové modifikace zpětně ovlivňují hladiny miRNA (68). Hypermetylací zprostředkovaná inhibice tumor-supresorové miRNA-10b-5p a miRNA-152 vedou k overexpresi jejich cílových genů – onkogenů DNMT1, BTRC, MYCBP a E2F3 (68). Z dalších můžeme jmenovat miRNA-29b ovlivňující DNMT3A a DNMT3B a tím působící globální hypometylací myelomových buněk (68).

1.2 Mnohočetný myelom (MM)

1.2.1 Základní informace o mnohočetném myelomu

Mnohočetný myelom je nádorové onemocnění ze skupiny plazmocelulárních dyskrazií, jehož podkladem je klonální proliferace neoplastických plazmocytů v kostní dřeni spojená s extenzivní produkcí nefunkčních monoklonálních imunoglobulinových proteinů (76), (68). Jde o druhou nejčastější hematologickou malignitu v USA a v Evropě, s incidencí přibližně

4/100 000 v České republice a mediánem věku v době diagnózy okolo 65 let (77) (78). Podle Mezinárodní pracovní skupiny pro Myelom (IMWG) vyžadují diagnostická kritéria 60 % a více klonálních plazmocytů v kostní dřeni nebo 10 % a více klonálních plazmocytů v kostní dřeni plus alespoň jeden z následujících projevů mnohočetného myelomu: hyperkalcemie, renální insuficience, anemie, osteolytické kostní léze (tyto projevy odrážejí pokročilé orgánové postižení); poměr sérových volných lehkých řetězců (FLC) ≥ 100 nebo více než jedna ložisková léze (5mm a více) zobrazená magnetickou rezonancí (79). Změny, které přinesla poslední léta v diagnostických kritériích, stagingu onemocnění a hodnocení odpovědi na léčbu, byla vyvolána rychle přibývajícími moderními možnostmi léčby mnohočetného myelomu.

Pro nádorové buňky MM je typická silná závislost na prostředí kostní dřene, extenzivní somatická hypermutace imunoglobulinových genů a absence exprese IgM (77).

Podle současných znalostí je mnohočetný myelom biologicky značně heterogenní onemocnění se širokým spektrem genetických i epigenetických změn.

1.2.2 Genetické změny u mnohočetného myelomu

Na rozdíl od některých jiných hematologických malignit (např. chronická lymfatické leukemie) není nádorový klon MM odvozen od jediné mutace, což vede k různorodosti ve fenotypu MM (80). Studium genetických změn myelomových nádorových buněk umožnilo definovat skupiny pacientů s odlišným průběhem nemoci. Primární cytogenetické změny rozlišují čtyři skupiny nemocných, a to s trizomií (jednoho či více lichých chromozomů, tento stav se označuje také jako hyperdiploidie), t (11;14), t (4;14) a tzv. MAF MM – zde patří translokace postihující geny MAF, t (14;16) a t (14;20). Dále jsou definovány sekundární cytogenetické abnormality, které mohou vzniknout u jakéhokoliv myelomu s primárními cytogenetickými změnami, k těm patří např. zisk 1q, del 17p, mutace p53, del 1p, del 13q nebo monozomie 13. Tyto změny modifikují průběh nemoci, odpověď na léčbu i prognózu pacientů. (79)

Nejčastěji ovlivňují cytogenetické změny lokus pro těžké řetězce imunoglobulinů (na chromozomu 14). Geny translokované do této oblasti se tak dostávají pod vliv silného promotoru a dochází k jejich zvýšené transkripční aktivitě. Mezi důležité geny, které jsou takto ovlivněny, patří např. cyclin D1, cyclin D3, FGFR3 a c-maf (68). Ze somatických mutací jsou u MM nejčastěji postiženy geny KRAS, NRAS, FAM46C, DIS3 a TP53 (68).

1.2.3 Epigenetické změny u mnohočetného myelomu

S rozvojem studia epigenetických změn u myelomové nádorové populace byla zaměřena pozornost na definování konkrétních modifikací, které přímo přispívají k samotnému rozvoji onemocnění i následné progresi do agresivnějších stádií nemoci.

V patogenezi MM byla prokázána souvislost metylace DNA, acetylace histonů a epimikroRNA (68). U mnohočetného myelomu je za důležitý znak v mechanismu epigenetických změn považováno stanovení globální metylace DNA (též globální metylace celkového genomu) (80).

Při porovnání s normálními plazmatickými buňkami je pro počátek myelomagenese typická globální hypometylace DNA, která dále vykazuje pokles během progresu onemocnění. Postupně ale dochází k hypermetylaci promotorů jednotlivých genů s maximem u relabovaných případů (68), (81), (80). Premaligní stav MGUS se charakterem epigenetických událostí natolik liší od MM, že je možné tyto změny použít i diagnostické markery onemocnění. Globální hypometylace se obvykle vyskytuje mimo oblasti CpG (82). Autoři některých studií předpokládají, že časná demetylace repetitivních elementů je potenciálním destabilizujícím faktorem v patogenezi MM, který spouští sekundární genetické změny vedoucí k plnému propuknutí nemoci (80). Při přechodu MGUS do MM byla popsána hypermetylace DNA uvnitř ostrůvků CpG u řady tumor supresorových genů regulujících buněčný cyklus a apoptózu (80), (82).

Podle aberantní metylace DNA lze podle některých studií vyčlenit pacienty s agresivním subtypem nemoci. Prognostický význam má epigenetický „silencing“ např. u genů CDKN2A, GPX3, RSBP1, SPARC a TGFBI, jejichž hypermetylace signifikantně zkracuje celkovou dobu přežití (68), (83), (80). S horší prognózou je spojována také hypermetylace promotoru genů BNIP-3, p16, E-CAD, DAPK-1, RASSF4, CXCR4, NFKB1) (68), (84), (69).

Metylační změny specifické pro různá vývojová období nemoci (od premaligního stavu MGUS po plazmocelulární leukemii) je předmětem metylačních analýz genů a globálního genomu (85). Cílem je definovat klíčové buněčné události a geny, které díky obrovské komplexnosti onemocnění ovlivňují myelomagenezi. Příkladem jsou regulátory transkripce s represivní funkcí, geny skupiny Polycomb (PcG). Tyto geny jsou aktivními regulátory buněčné proliferace a jejich deregulace je charakteristická pro vznik a expanzi nádorových

buněk. PHF-19, který je součástí Polycomb repressive complex-2 (PRC2), řídí stav a diferenciaci hematopoetických buněk, může být jedním z klíčových faktorů počátků myelomagenese (86). Translokace t (4;14) vede také k nadměrné expresi genu FGFR3 a genu kódující doménu SET mnohočetného myelomu (MMSET), jež oba vykazují potenciální onkogenní aktivitu (1), (87).

O významu studia aberantních metylačních stavů pacientů s MM svědčí realizované klinické studie inhibitorů DNA-metyltransferáz (DNMTi) - 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) a 5-azacytidin (azacytidine), a inhibitorů histonových deacetyláz (HDACi) v léčbě MM, a také recentní schválení panobinostatu (HDACi) v kombinaci s bortezomibem a dexametazonem při léčbě relabovaného MM (83).

2. Vybrané metody studia metylačních změn genomu

Změny metylace genomu lze studovat v rámci celého genomu či v konkrétních úsecích DNA (např. promotorech genů apod.). Výběr metody je nejvíce ovlivněn cílem dané studie, ale neméně důležitými faktory je také např. množství a kvalita dostupné DNA, robustnost a složitost jednotlivých metod, požadovaná senzitivita a specificita, dostupnost potřebného softwaru, nutnost speciálního vybavení a v neposlední řadě náklady na analýzu (88).

Stanovení celkové metylace genomu je důležité ve vztahu k epigenetickým změnám, které přispívají k nádorové progresi, nebo při výzkumu vlivu použitých léčiv na změnu metylačního stavu (88). Metod, které tuto informaci poskytnou, je velké množství a rychle přibývají zvláště v posledních letech. Spektrum technik pro studium konkrétních míst genomu, např. promotorů genů, je však ještě širší. Patří k nim sekvenační metody – pyrosekvenování nebo NGS (next generation sekvenování), metylačně specifické PCR či komparativní genomové hybridizace. Sekvenační metody pro metylační analýzy jsou založeny na bisulfitové modifikaci analyzované DNA. Pro studium vztahu metylace DNA a metylace histonů je vhodné použití chromatinová imunoprecipitace (ChIP).

2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Technika HPLC (vyvinuta v roce 1980), byla dlouhou dobu považována za zlatý standard pro kvantifikaci celkového množství deoxycytidinu (dC) a methylcytosinu (5mC)

v hydrolyzovaném vzorku DNA (88). DNA je hydrolyzována na základní stavební prvky – nukleosidové báze – a studované 5mC a dC chromatograficky separovány a následně změřeny. Poměr 5mC a dC je stanoven pro každý vzorek. Nevýhodou je potřeba poměrně velkého množství DNA (3-10μg) (88). V mnoha studiích je HPLC využívána jako srovnávací metoda pro novější přístupy (72), (73).

2.2 Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)

V poslední době je to nejčastěji používaná metoda pro stanovení zastoupení 5mC v analyzovaném vzorku. Princip metody byl popsán v roce 2005 (71). Pro kvantifikaci 5mC stačí řádově nižší množství DNA, (rutinně se používá 50-100ng, ale je možné úspěšně analyzovat i pouhých 5ng DNA) a výsledek není nepříznivě ovlivněn špatnou kvalitou DNA (88). Problémem zůstává náročnost technického a softwarového vybavení. Je také důležitým faktem, že metody založené na kapalinové chromatografii neposkytnou informaci o tom, na kterém místě genomu se metylace vyskytuje (89).

2.3 Metody na principu ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Na principu ELISA existuje několik komerčně dostupných kitů, které umožňují rychlé stanovení globální metylace DNA. Jsou však náchylné k vysoké variabilitě a jsou proto určeny pouze pro hrubý odhad metylačního stavu (88). Princip metody ELISA spočívá v označení 5mC primární protilátkou, jejím překrytí sekundární protilátkou a následné kolorimetrické či fluorometrické detekci (88).

2.4 Analýzy repetitivních sekvencí

Repetitivní sekvence tvoří asi 45 % lidského genomu a obsahují velké množství míst CpG (až 80 % ze všech dinukleotidů CpG) (73). Byly proto vyvinuty postupy, které detekují metylační změny v oblastech jako jsou například Alu sekvence, což je nejčastější typ rozptýlené repetitivní DNA (SINE, short interspersed nuclear elements) v lidském genomu, nebo LINE-1 (long interspersed nuclear elements-1), které tvoří asi 17 % lidského genomu (88). Mohou být založeny i na principu ELISA, ale přesnější jsou postupy používající DNA po bisulfitové modifikaci s následným sekvenováním konkrétních repetitivních sekvencí (88), (73), (72).

2.5 Luminometric Methylation Assay (LUMA)

Metoda celogenomové analýzy metylace DNA poprvé publikovaná v roce 2006 je založena na štěpení genomové DNA pomocí páru restričních endonukleáz, z nichž jeden enzym je metylačně senzitivní a druhý enzym nikoliv (90). Získané fragmenty DNA jsou kvantifikovány pomocí luminometrické polymerázové extenze (90). V historickém kontextu navazuje LUMA na práci Pogribného z roku 1999, který zavedl postup cytosinové extenze – „cytosine-extension assay“ (91). Jednonukleotidová extenze probíhala u tohoto stanovení s využitím radioaktivně značeného [(3)H]dCTP.

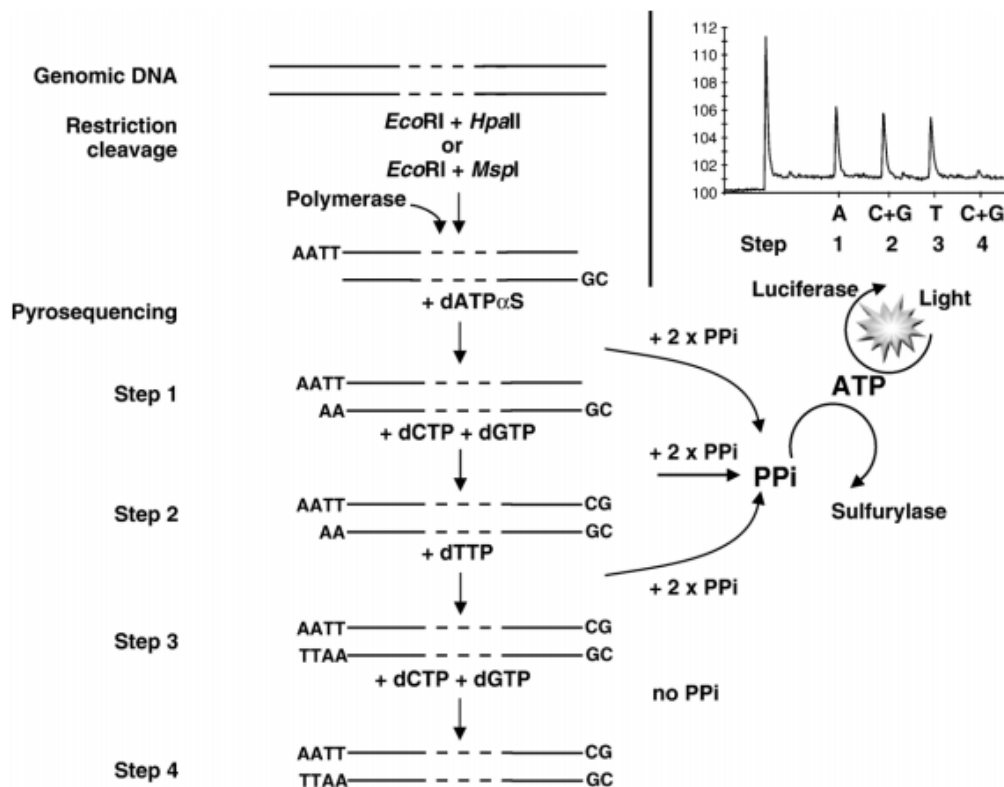
Extenze v rámci LUMA může probíhat na pyrosekvenační platformě, ale v principu lze použít jakékoliv zařízení se světelným detektorem (luminometr). Enzymový pár isoschizomerů, který se nejčastěji používá, je endonukleáza *HpaII* (CpG metylačně senzitivní) a endonukleáza *MspI* (není citlivá na metylaci CpG míst), oba enzymy štěpí ve stejné sekvenci C/CGG. Štěpnými produkty jsou fragmenty s lepivými konci 5'-CG. Radioaktivně značený nukleotid je u tohoto postupu nahrazen biotinylovaným dCTP (90).

Třetím enzymem, který je v reakci použit, je endonukleáza *EcoRI*, jejíž aktivita není závislá na metylaci DNA a její štěpné místo je mimo oblasti ostrůvků CpG (restriční místo je G/AATTC, produktem je 5'-AATT lepivý konec). Její funkce je odstranit rozdíly v množství DNA vstupující do reakce, jde tedy o vnitřní kontrolu celého procesu.

Princip metody dle Karimi et al (92):

- dvojice vzorků DNA je naštěpena restričními enzymy, v jedné zkumavce jsou k DNA přidány enzymy *HpaII* a *EcoRI*, ve druhé zkumavce pak *MspI* a *EcoRI*
- v pyrosekvenátoru proběhne luminometrická polymerázová extenze
 - o pomocí pyrosekvenační platformy jsou jednotlivé nukleotidy dNTP přidávány v přesně definovaném pořadí, celá reakce probíhá pouze ve čtyřech pipetovacích krocích (nukleotid ATP je chemicky modifikovaný jako dATP α S [deoxyadenosin alfa-thiotrifosfát], aby nemohl sloužit jako substrát pro přítomnou luciferázu)
 - o jakmile je daný nukleotid inkorporován do řetězce, uvolní se anorganický pyrofosfát (PPi), ten je ihned přeměněn na ATP (v reakci katalyzované ATP-sulfurylázou)

- vzniklý ATP umožní přeměnu luciferinu na oxyluciferin (za katalýzy luciferázou), což je doprovázeno viditelným světlem, které je detekováno kamerou a vizualizováno pomocí softwaru jako pík v grafu
- je možné provést export výsledků ve formě číselných hodnot výšky píků v jednotlivých vzorcích a s nimi dále počítat
- množství emitovaného viditelného světla je přímo úměrné počtu inkorporovaných nukleotidů (de facto také počtu vzniklých štěpných míst daného enzymu)
- pomocí jednoduchého výpočtu (dosazením naměřených hodnot do vzorce) se spočítá poměr normalizovaných (tj. vztažených k hodnotám *EcoRI*) hodnot *HpaII* k *MspI*
- konečný výsledek ukáže v procentech hodnotu celkové metylace DNA u vyšetřovaného vzorku



Obrázek č. 6: Princip metody LUMA.

Převzato z: Karimi M, Johansson S, Stach D, Corcoran M, Grander D, Schalling M, Bakalkin G, Lyko F, Larsson C, Ekström TJ. LUMA (LUMinometric Methylation Assay)--a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp Cell Res.* 2006 Jul 1;312(11):1989-95.

2.6 Bisulfitová modifikace (bisulfitová konverze)

Bisulfitová reakce umožňuje modifikaci analyzované DNA zafixováním rozdílů mezi metylovanými a nemetylovanými úseky. V principu jde o biochemickou modifikaci vzorku DNA působením hydrogensířičitanu sodného (sodium bisulfit, NaHSO₃). Inkubační podmínky bisulfitové reakce však mohou vést k částečné fragmentaci DNA a tím i k její ztrátě během následné purifikaci, která je však nutná k odstranění použitých chemikálií. Reakce probíhá cyklicky se střídáním fází denaturace DNA, sulfonace, deaminace cytosinu. Po konverzi cytosinů se jednovláknová DNA naváže na membránu, následně je promyta, desulfonována a znovu promyta. Závěrečným krokem je eluce čisté DNA elučním puforem.

Metodou bisulfitové modifikace dosáhneme přeměny všech nemetylovaných cytosinů v uracil. Oproti tomu metylované cytosiny v sekvencích CpG zůstanou nedotčeny, tedy metylovaný cytosin zůstává cytosinem. V průběhu následné reakce PCR je uracil nahrazen thyminem. Sekvence DNA je analyzována následujícím způsobem: přeměna cytosinu v thymin znamená nemetylovaný cytosin v původní analyzované DNA, cytosin v původní i výsledné sekvenci znamená metylovaný cytosin v původním vlákně DNA.

3. Experimentální část

3.1 Úvod

Je zřejmé, že epigenetické změny mohou hrát významnou roli při ovlivňování léčebné odpovědi u různých typů nádorů a mohou být vést například k rezistenci na chemoterapii (80). Poznáním charakteristických epigenetických modifikací za účelem vyčlenění agresivních subtypů nemoci či nestandardní odpovědi na léčbu můžeme v budoucnu definovat nemocné, kteří budou profitovat z tzv. „tailored therapy“, tedy z léčby šité na míru.

3.1.1 Studované geny

CDKN2B

Gen CDKN2B je tumor-supresorový gen, který kóduje protein p15^{INK4b}, známý také jako inhibitor B cyklin-dependentní kinázy 4. S funkcí CDKN2B úzce souvisí také CDKN2A, gen lokalizovaný v blízkosti CDKN2B, který kóduje protein p16^{INK4a}. CDKN2B a CDKN2A patří mezi geny, jejichž hypermetylace je nejčastěji uváděná v souvislosti s MM (69). p15^{INK4b} spolu s p16^{INK4a} inhibuje cyklin-dependentní kinázu 4 (CDK4) a 6 (CDK6) a brání tak interakci

s cyklinem D1. p15^{INK4b} svou inhibicí buněčného cyklu v G1 fázi plní úlohu tumor supresorového genu s úlohou jeho regulátoru. CDKN2B se nachází na krátkém raménku chromozomu 9 (9p21), v oblasti, která je u nádorů často pozměněna (93). Inaktivace tohoto genu může nastat v důsledku homozygotní delece, bodové mutace nebo metylace DNA. Hypermetylace promotorové oblasti CDKN2B byla kromě MM pozorována např. u glioblastomu, akutní lymfoblastické leukemie či folikulárního lymfomu (93). Přesný mechanismus, jakým přispívá aberantní metylace rozvoji MM však zůstává nejasná (93). Tím, že p15^{INK4b} brání v buněčném cyklu přechodu z G1 fáze do S fáze, může spíše než s maligní transformací souviset s imortalizací plazmatických buněk (93).

Velkou provázanost mechanismů naznačuje také fakt, že cyklin D1 je utlumen léčbou inhibitory histonových deacetyláz (94). U myelodysplastického syndromu (MDS) vede léčba demetylačním činidlem decitabinem k demetylaci hypermetylovaného CDKN2B, tím se obnoví jeho normální exprese a tumor-supresorová funkce (95).

PDLIM4

Gen PDLIM4 (PDZ and LIM domain 4), známý také jako RIL (reversion-induced LIM domain) se nachází na dlouhém raménku 5. chromozomu (5q31.1) a kóduje vysoce konzervovaný protein, který je členem ALP/Enigma rodiny cytoskeletálních proteinů. PDLIM4 obsahuje jednu PDZ doménu (na NH₂- konci) a jednu LIM doménu (na COOH- konci), což umožňuje interakci se širokým spektrem molekul – s aktinem asociovanými proteiny, cytoplazmatickými signálními molekulami a membránovými receptory. LIM doména může interagovat jednak s PDZ doménou jiného proteinu PDLIM4 nebo s PDZ doménou protein-tyrosin-fosfatázy PTP-BL. Naproti tomu PDZ doména může interagovat také s LIM doménou proteinu TRIP-6, který je koaktivátor jaderného faktoru κB (NF-κB), tím může docházet k regulaci apoptózy. Na základě výsledků několika studií byl PDLIM4 popsán v souvislosti s různými nádorovými onemocněními, např. karcinomem prostaty, karcinomem prsu, myelodysplastickým syndromem a akutní myeloidní leukemií (96), (97), (98). Podle některých autorů, kteří zjistili při zvýšené expresi PDLIM4 zástavu buněčného cyklu v G1 cyklu, může hrát tento protein roli v inhibici proliferace buněk, čímž nabývá funkce tumor-supresorového genu (98). V literatuře se však objevuje i hypotéza, že PDLIM4 může mít funkci onkogenu, díky které podporuje motilitu buněk a přispívá tak k šíření nádorů (99).

Oblast 5. chromozomu, kde je gen PDLIM4 lokalizován, je často bialelicky inaktivována, a to mechanismy ztráty heterozygoty (LOH) a metylací promotoru (98).

3.1.2 Globální metylace genomu z pohledu prediktivních a prognostických markerů

V souvislosti s rozvojem nových terapeutik pro léčbu MM se objevují také snahy o definici prediktivních markerů. Zatímco v rámci cytogenetických změn a mutací byly jednoznačně definovány skupiny pacientů, u kterých lze pozorovat příznivější či naopak agresivní průběh nemoci, tak v případě predikce odpovědi na léčbu nejsou u těchto analýz závěry jednoznačné (69). Z dalších faktorů, u nichž je zvažován vliv na léčebnou odpověď, můžeme jmenovat polymorfismy nukleových kyselin (SNP – Single Nucleotide Polymorphism), miRNA a metylace DNA (84). Právě globální metylace DNA byla popsána jako nezávislý prognostický faktor u pacientů léčených bortezomibem, kdy pacienti s relabujícím či refrakterním MM a zvýšenou globální metylací genomu vykazovali delší OS po léčbě bortezomibem (84). Dále bylo zjištěno, že hypermethylace genů CDKN2A, CDKN2B, TNF a RB je častější u pacientů s relabovaným MM léčených bortezomibem.

O významu epigenetických změn svědčí také zjištění, že zapojení epigenetické terapie jako je aplikace inhibitorů DNMTs s demetylačním účinkem do konvenčních léčebných režimů umožňuje překonání rezistence na bortezomib nebo glukokortikoidy (80).

Z faktorů patřících do epigenetických změn, u kterých byl potvrzen signifikantní vliv na prognózu nemocných s MM, stojí na prvním místě globální hypomethylace genomu, která je spojována se špatnou prognózou (80). Zjištění, že globální hypomethylace genomu u pacientů v remisi zkracuje jejich celkovou dobu přežití, nabízí otázku, zda mají být pacienti s globální hypomethylací v době remise léčení intenzivněji (69).

3.2 Cíle studie

Vzhledem k tomu, že u mnohočetného myelomu je za důležitý faktor v mechanismu epigenetických změn považováno stanovení globální metylace DNA (globální metylace celkového genomu), zaměřili jsme se v naší práci na zavedení metody LUMA (LUMA (Luminometric Methylation Assay)). K ověření uživatelské a výpovědní hodnoty metody LUMA jsme použili kohortu nesortovaných vzorků od pacientů s MM, a to v různých fázích jejich onemocnění.

Pro studium metylačních změn konkrétních genů jsme do studie zařadili také analýzu sekvence DNA genu CDKN2B v oblasti promotoru a prvního exonu, a sekvence DNA v oblasti promotoru genu PDLIM4.

Na základě získaných dat a jejich statistického zhodnocení bylo cílem definovat možné prognostické markery v souvislostech studovaných metylačních změn patřících k epigenetickým modifikacím.

3.3 Materiál a metody

3.3.1 Soubor pacientů

Do studie byli zařazeni pacienti, kteří byli vyšetřováni na Hemato-onkologické klinice FNOL, a to v rámci primodiagnostiky plazmocelulární dyskrázie či v rámci sledování v průběhu léčby. Celkem jsme analyzovali 94 vzorků od jedinců s diagnózou MGUS a MM v různých fázích nemoci. Vzorky – aspiráty kostní dřeně – byly odebrány do zkumavek s heparansulfátem a nebyly žádným dalším způsobem upravovány. DNA izolovaná ze vzorků kostní dřeně byla použita pro následné analýzy. Vzorky byly použity ve shodě s informovaným souhlasem, který pacienti podepsali.

3.3.2 Izolace DNA

DNA byla ze vzorků kostní dřeně izolována pomocí kitu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Principem této metody je adsorpce DNA na silikátový povrch speciální kolony. Následně je DNA promyta za účelem odstranění kontaminantů a na závěr pomocí elučního pufru uvolněna. Koncentrace a čistota získaného vzorku DNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.3.3 Bisulfitová modifikace

Bisulfitová modifikace vzorků pro pyrosekvenování byla provedena pomocí EpiTect® Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Německo).

Postup probíhá v následujících krocích:

1. konverze nemetylovaných cytosinů zprostředkovaná hydrogensíranem sodným
2. navázání konvertované jednovláknové DNA na membránu kolonky
3. promytí
4. desulfonace DNA navázané na membráně

5. promytí k odstranění desulfonačního činidla

6. eluce konvertované DNA z kolonky

3.3.4 Pyrosekvenační analýza

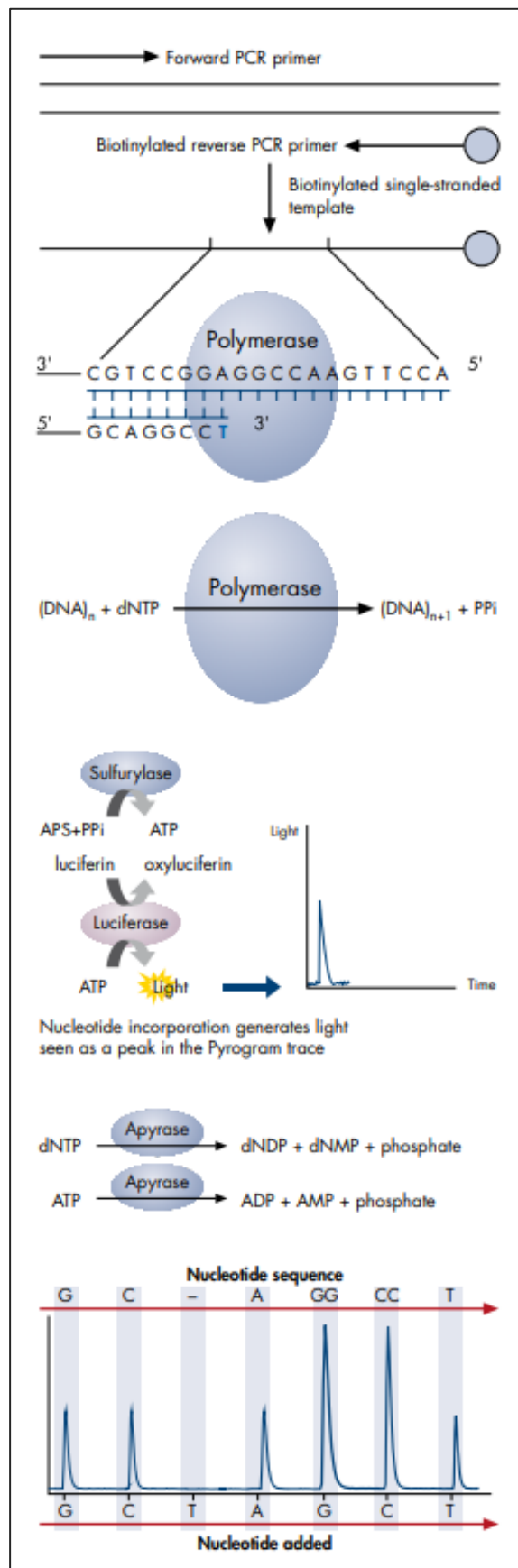
Přístrojové vybavení: Pro pyrosekvenování byl použit přístroj PyroMark Q96ID (Qiagen, Hilden, Německo).

Pyrosekvenační analýza má dvě základní části. V první části probíhá příprava templátové DNA pomocí PCR, v další fázi potom samotné pyrosekvenování.

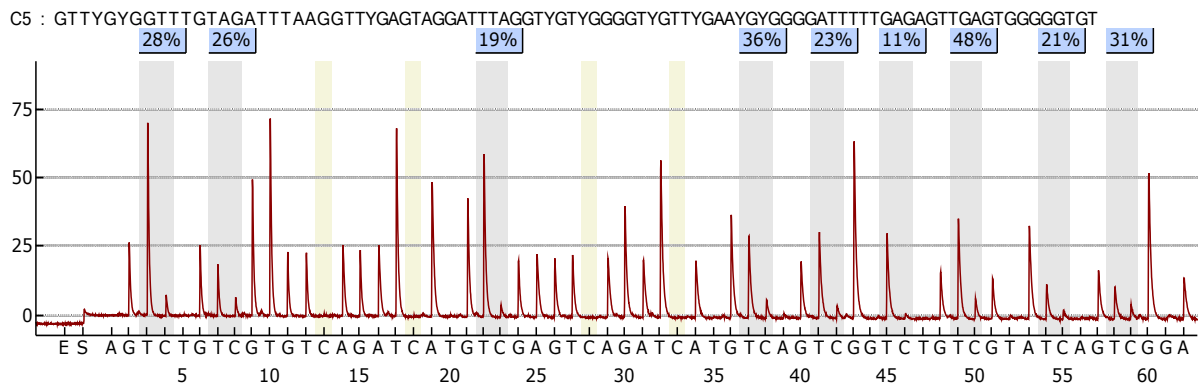
Postup (dle QIAGEN, Hilden, Německo):

1. V prvním kroku je amplifikován cílový segment DNA (např. sledovaný promotor vyšetřovaného genu), vlákno sloužící v dalším postupu jako pyrosekvenační templát je biotinylováno pomocí primeru. Po denuraci je jednovláknový biotinylovaný PCR amplikon izolován a hybridizován se sekvenačním primerem.
2. Primer hybridizovaný k templátu je inkubován spolu s enzymy DNA polymeráza, ATP sulfuryláza, luciferáza a apyráza a se substráty adenosin-5'-fosfosulfát a luciferin.
3. Po přidání prvního dNTPs do reakce je v případě komplementarity začleněn do vznikajícího řetězce, což je doprovázeno uvolněním pyrofosfátu (PPi) v ekvimolárním množství k počtu inkorporovaných nukleotidů.
4. ATP sulfuryláza přemění PPi na ATP (za přítomnosti adenosin-5'-fosfosulfátu), vzniklý ATP umožní konverzi luciferinu na oxyluciferin a tato reakce je doprovázena uvolněním viditelného světla, jehož množství je úměrné vzniklému ATP. Světlo je detekováno přístrojem a znázorněno jako pík v grafu. Výška píku je proporcionální k množství inkorporovaných nukleotidů.
5. Výsledná sekvence je určena dle píků v grafu.

Obrázek č. 7: Princip pyrosekvenování. Převzato z: www.qiagen.com

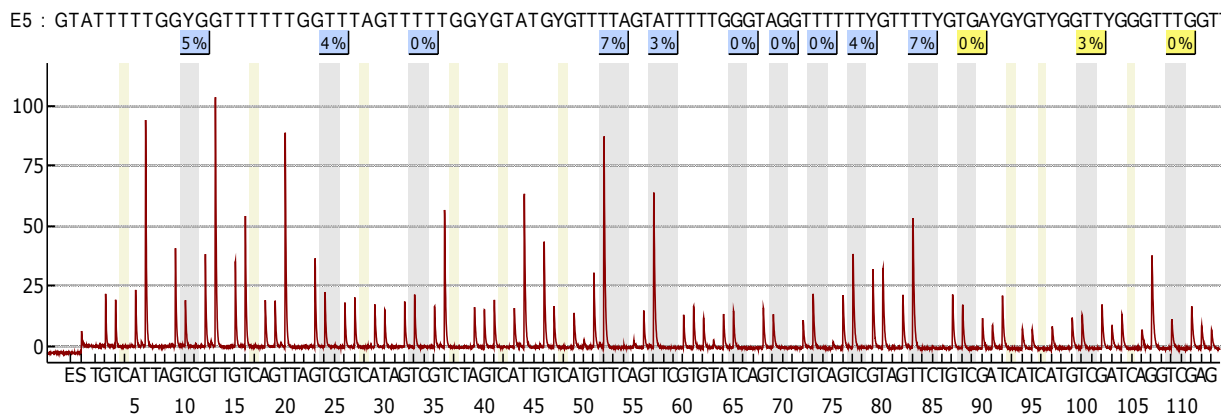


Obrázek č. 8: Výsledný graf po pyroskvenování – tzv. Pyrogram.



Jde o vzorek MM, analyzovaná sekvence je PDLIM4 promotor. Procenta v horní části obrázků udávají metylaci daného CpG místa, výsledné číslo pro daný vzorek je následně softwarově spočítáno jako průměrná metylace všech CpG míst vyšetřované sekvence. V tomto případě činila hodnota metylace promotorové oblasti 27 %.

Obrázek č. 9: Výsledný graf po pyroskvenování – tzv. Pyrogram.



Jde o vzorek MM, analyzovaná sekvence je CDKN2B promotor. Procenta v horní části obrázků udávají metylaci daného CpG místa, výsledné číslo pro daný vzorek je následně softwarově spočítáno jako průměrná metylace všech CpG míst vyšetřované sekvence. V tomto případě činila hodnota metylace promotorové oblasti CDKN2B 3 %.

3.3.5 LUMA

Přístrojové vybavení, materiál, chemikálie, enzymy:

Pro pyrosekvenování byl použit přístroj PyroMark Q96ID (Qiagen, Hilden, Německo).

Změření koncentrace a čistoty DNA – NanoDrop spektrofotometr ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)

Enzymy *HpaII* (10U/1μl), *MspI* (10U/1μl), *EcoRI* (10U/1μl) - Biogen Praha s.r.o.

10× Tango Buffer – Biogen Praha s.r.o.

PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Gold Q96 Reagents (dNTPs, enzymový mix, substrátový mix) – Qiagen, Hilden, Německo

Postup:

I. část: štěpení DNA

1. Každý vzorek byl vyšetřován jako Mix A a Mix B, a to v tripletech (3× Mix A, 3× Mix B)

2. **Mix A:** 20μl

250-500 ng genomické DNA + ddH₂O v celkovém objemu 17μl

EcoRI 0,5μl

HpaII 0,5μl

Tango Buffer 2μl

Mix B: 20μl

250-500 ng genomické DNA + ddH₂O v celkovém objemu 17μl

EcoRI 0,5μl

MspI 0,5μl

Tango Buffer 2μl

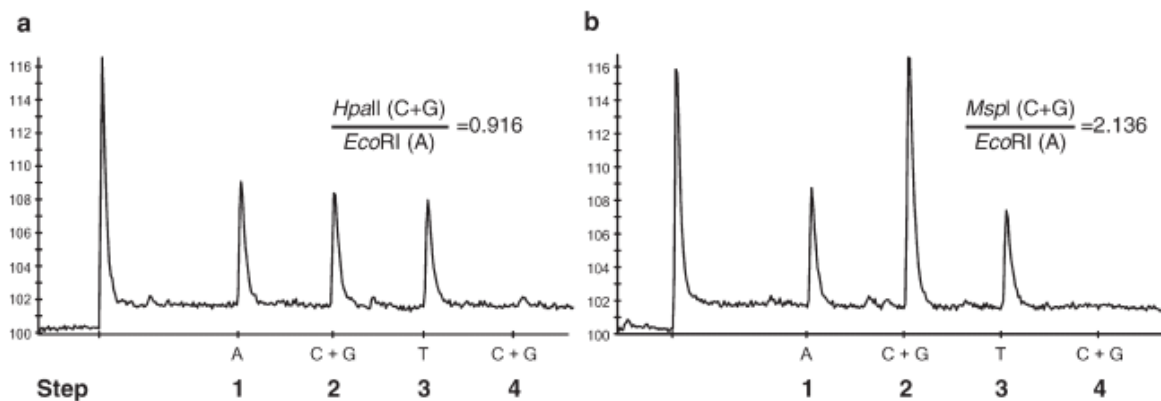
3. Vzorky byly pipetovány do originální reakční destičky s 96 jamkami, překryty k zabránění evaporace a inkubovány při 37°C po dobu 4 hodin.

4. Po ukončení inkubace byl do každé reakční jamky přidán Annealing Buffer, 20μl

II. Pyrosekvenační reakce

1. Pyrosekvenátor byl puštěn v režimu SNP (single nucleotide polymorphism), sekvence byla definována jako AC/TCGA, pořadí přidávaných nukleotidů jako ACTCGA
2. Do cartridge pyrosekvenátoru byly napipetovány potřebné reagensie:
Enzymový mix do oddílu E
Substrátový mix do oddílu S
směs dATPαS (50μl) + H₂O (50μl) do oddílu A
směs dTTP (50μl) + H₂O (50μl) do oddílu T
směs dCTP (50μl) + dGTP (50μl) do oddílu C
H₂O (100μl) do oddílu G
3. Po vložení vzorků byla spuštěna analýza.
4. Po dokončení reakce byla data analyzována v AQ módu a exportována pro další zpracování.

Obrázek č. 10: Reprezentativní příklady výsledných grafů, graf „a“ znázorňuje výsledek vzorku po štěpení enzymy *HpaII* (metylačně senzitivní) a *EcoRI*, graf „b“ znázorňuje výsledek vzorku po štěpení enzymy *MspI* a *EcoRI*.



Převzato z: Karimi M, Johansson S, Stach D, Corcoran M, Grander D, Schalling M, Bakalkin G, Lyko F, Larsson C, Ekström TJ. LUMA (LUMinometric Methylation Assay) – a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp Cell Res.* 2006 Jul 1;312(11):1989-95.

3.3.6 Sledované charakteristiky pacientů

U vzorků byly pro hodnocení použity následující charakteristiky:

Klinické stádium mnohočetného myelomu dle D-S (dle Durieho a Salmona), klinické stádium MM dle ISS (International Staging System), typ a koncentrace sérového paraproteinu, dominantní lehký řetězec v séru, vybrané cytogenetické změny (del17, t(4;14), t(14;16), t(11;14), amplifikace 1, hyperdiploidie, změny na 13. chromozomu, delRb1), typ léčby a léčebná odezva (CR, VGPR, PR, MR, SD, PD), délka doby do progresu, celkové přežití.

Všechny charakteristiky pacientů a získané výsledky jsou uvedeny v příloze v Tabulce č. 7.

3.3.7 Statistická analýza

Pro porovnání hodnot globální metylace a metylace promotoru PDLIM4, promotoru CDKN2B a prvního exonu CDKN2b byla použita Spearmanova korelační analýza. Porovnání cytogenetických změn a hodnot metylace (globální, PDLIM4 promotor, CDKN2B promotor a první exon) byl aplikován Mann-Whitney U test. Zjišťování, zda souvisí míra metylace s hloubkou léčebné odpovědi, bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu. Vztah mezi celkovou metylací genomu a PFS a OS byl sledován pomocí Kaplan-Meierových křivek.

3.4 Výsledky

Sledovaný soubor sestával z 94 jedinců s následujícím spektrem diagnóz: MGUS, doutnající myelom (SMM), MM v době diagnózy (MMdg.), MM v době remise (MMrem.), MM v době relapsu (MMrel.), MM nezařazený (ostatní; MMost.).

Tabulka č. 5: Přehled skupin zastoupených v souboru se základními charakteristikami.

	počet	ženy	muži	dominantní typ paraproteinu	dominantní lehký řetězec
MGUS	10	5	5	IgG (70 %)	lambda (60 %)
SMM v době diagnózy	6	3	3	IgG (83,3 %)	Kappa (66,7 %)
MM v době diagnózy	52	26	26	IgG (53,8 %)	Kappa (57,7 %)
MM v době remise	3	2	1	NA	Lambda (66,7 %)
MM v době relapsu	19	11	8	IgG (68,4 %)	Kappa (63,2 %)
MM ostatní	4	1	3	IgG (50 %)	Kappa (75 %)

3.4.1 Cytogenetické změny

Z pohledu cytogenetických změn byly ve skupině MMdg. nejvíce zastoupeny hyperdiploidie (34,6 %), změny 13. chromozomu (34,6 %), delRb1 (32,7 %) a amplifikace 1 (28,8 %).

Tabulka č. 6: Přehled cytogenetických změn ve skupinách MGUS, MMdg. a MMrel.

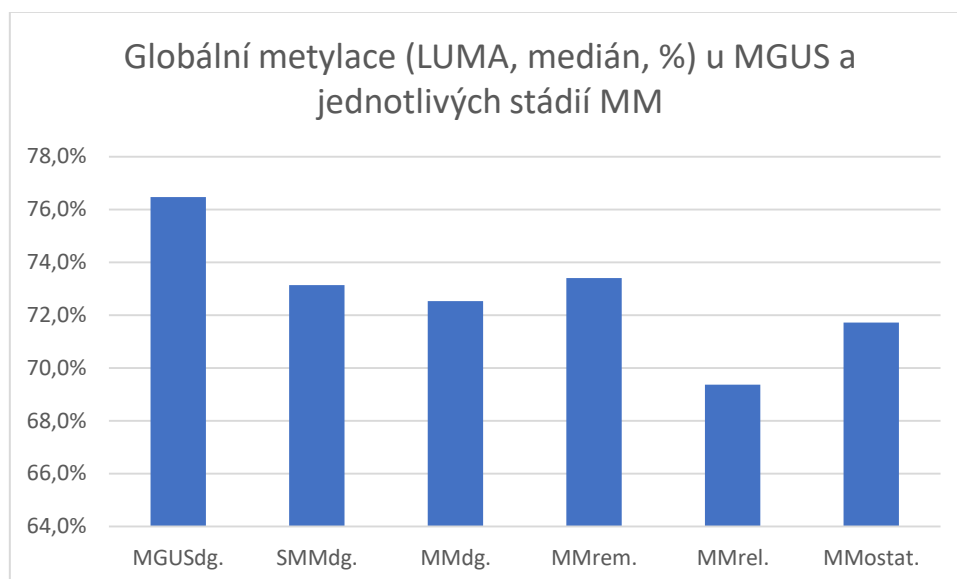
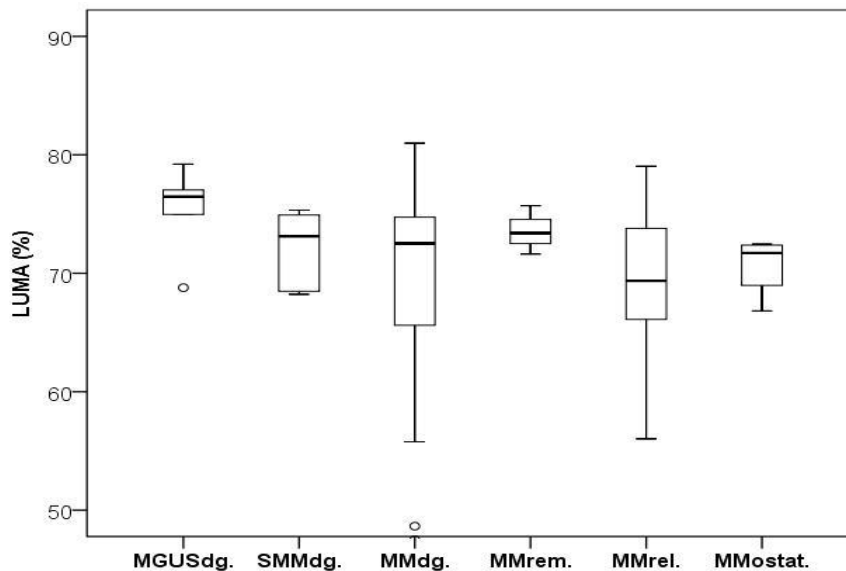
		MGUSdg.		SMMdg.		MMdg.		MMrel.	
		Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
del17	Ano					5	9,6 %	3	15,8 %
	Ne	6	60,0 %	5	83,3 %	29	55,8 %	9	47,4 %
	nevyš.	4	40,0 %	1	16,7 %	18	34,6 %	7	36,8 %
t(4;14)	Ano			1	16,7 %	6	11,5 %		
	Ne	3	30,0 %	2	33,3 %	19	36,5 %	3	15,8 %
	nevyš.	7	70,0 %	3	50,0 %	27	51,9 %	16	84,2 %
t(14;16)	Ano	1	10,0 %			2	3,8 %		
	Ne	2	20,0 %	2	33,3 %	17	32,7 %	3	15,8 %
	nevyš.	7	70,0 %	4	66,7 %	33	63,5 %	16	84,2 %
amplif. 1	Ano	2	20,0 %	1	16,7 %	15	28,8 %	7	36,8 %
	Ne	4	40,0 %	4	66,7 %	16	30,8 %	6	31,6 %
	nevyš.	4	40,0 %	1	16,7 %	21	40,4 %	6	31,6 %
t(11;14)	Ano					2	3,8 %		
	Ne	3	30,0 %	2	33,3 %	19	36,5 %	3	15,8 %
	nevyš.	7	70,0 %	4	66,7 %	31	59,6 %	16	84,2 %
Hyperdiploidie	Ano	1	10,0 %	1	16,7 %	18	34,6 %	7	36,8 %
	Ne	5	50,0 %	4	66,7 %	15	28,8 %	5	26,3 %
	nevyš.	4	40,0 %	1	16,7 %	19	36,5 %	7	36,8 %
změny 13.chromozomu	Ano			2	33,3 %	18	34,6 %	3	15,8 %
	Ne	6	60,0 %	2	33,3 %	15	28,8 %	2	10,5 %
	nevyš.	4	40,0 %	2	33,3 %	19	36,5 %	14	73,7 %
delRb1	Ano			2	33,3 %	17	32,7 %	3	15,8 %
	Ne	6	60,0 %	2	33,3 %	15	28,8 %	1	5,3 %
	nevyš.	4	40,0 %	2	33,3 %	20	38,5 %	15	78,9 %

Všechny analyzované genetické změny jsme porovnávali s hodnotami globální metylace DNA a metylace promotorových úseků genů PDLIM4 a CDKN2B, a úseku v oblasti 1. exonu genu CDKN2B. Žádná ze sledovaných genetických změn však nevykazovala signifikantně odlišné hodnoty metylace. Naše hypotéza, že konkrétní genetické změny mohou být doprovázeny některými ze sledovaných metylačních parametrů, se proto nepotvrdila.

3.4.2 Hodnocení celkové metylace

Výsledné hladiny globální metylace genomu stanovené metodou LUMA znázorňuje graf č. 1. Ve shodě s literárními údaji námi detekovaná globální metylace genomu vykazuje pokles v závislosti na progresi myelomagenese. Nejvyšší hodnoty byly detekovány u jedinců s MGUS a pacientů MM v remisi. Snižování úrovně globální metylace DNA směřuje k hypometylovanému stavu genomu v závislosti na fázích onemocnění s nejnižší úrovní globální metylace ve skupině relabujícího onemocnění MM.

Graf č.1a (kvartilový box graf) a 1b (sloupcový graf): Globální metylace vyšetřená pomocí LUMA ve skupině MGUS a v jednotlivých skupinách MM.

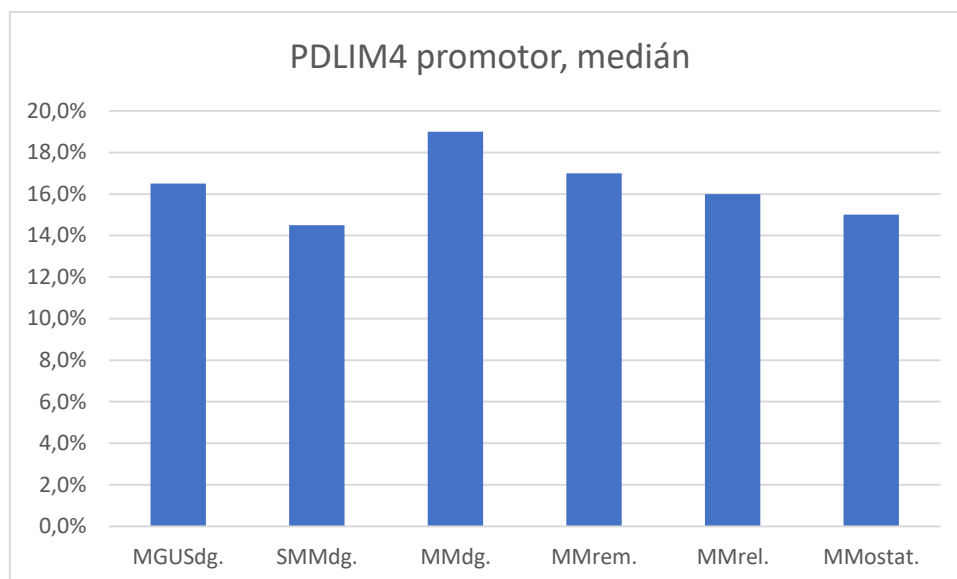
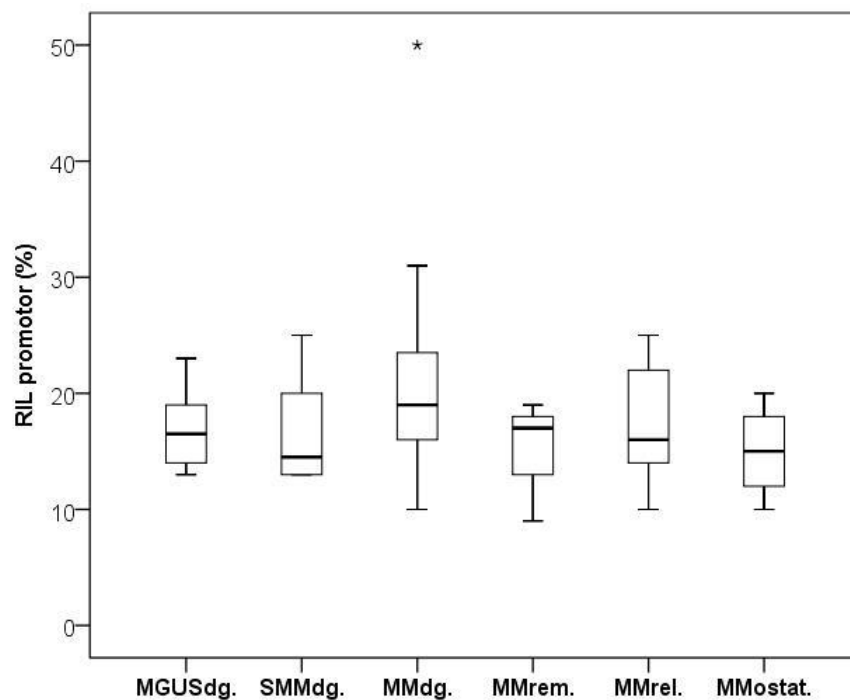


Na základě statistického vyhodnocení získaných dat nebyla ve skupinách pacientů MMdg. a MMrel. zjištěna signifikantně průkazná závislost mezi úrovní celkové metylace DNA a hloubkou léčebné odpovědi. Stejně tak vztah mezi celkovou metylací DNA a PFS nebo OS nevykazuje statisticky významnou závislost.

3.4.3 Methylace genu PDLIM4

Methylace promotorové oblasti genu PDLIM4 se zvyšuje v závislosti na fázi onemocnění. Nejvyšší úroveň metylací ve sledovaných promotorových úsecích genu PDLIM4 byla stanovena ve skupině MMdg., zatímco v premaligním stádiu MGUS a u SMM je úroveň metylačních změn nižší. Trend snížené úrovně metylace v promotoru PDLIM4 je zřejmý ve skupinách MMrem., MMrel. a MMost. (graf č. 2a a 2b).

Graf č. 2a (kvartilový box graf), 2b (sloupcový graf): Hodnoty metylace promotorové oblasti genu PDLIM4 v závislosti na sledované skupině pacientů.

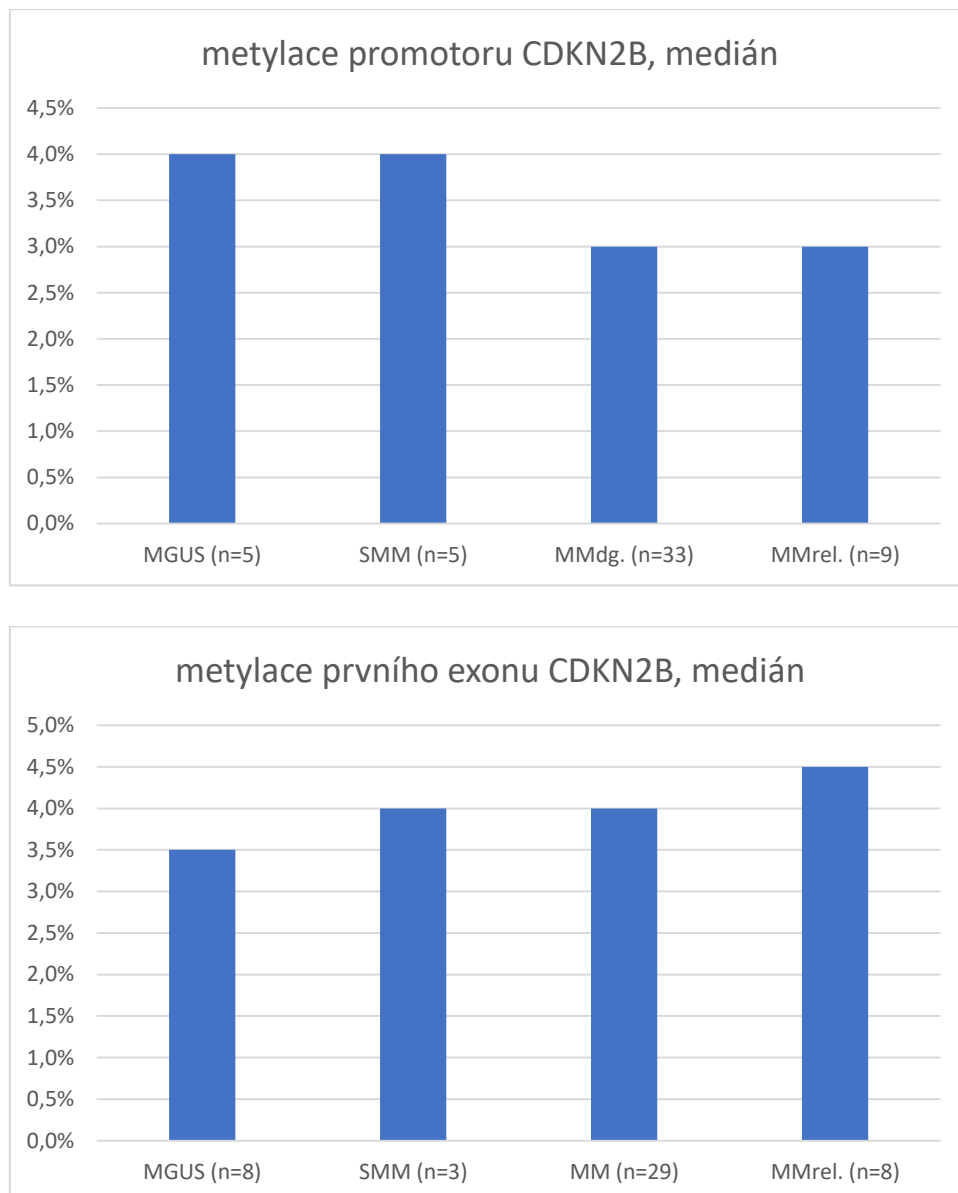


Ve skupině MMdg. byla zjištěna slabá negativní korelace mezi globální metylací genomu a metylací promotoru PDLIM4 ($r = -0,323$, p -value 0,021). Porovnáním úrovně globální metylace DNA a úrovně metylace v promotoru a prvním exonu genu CDKN2B nebyla zjištěna statisticky významná závislost.

3.4.4 Metylace genu CDKN2B

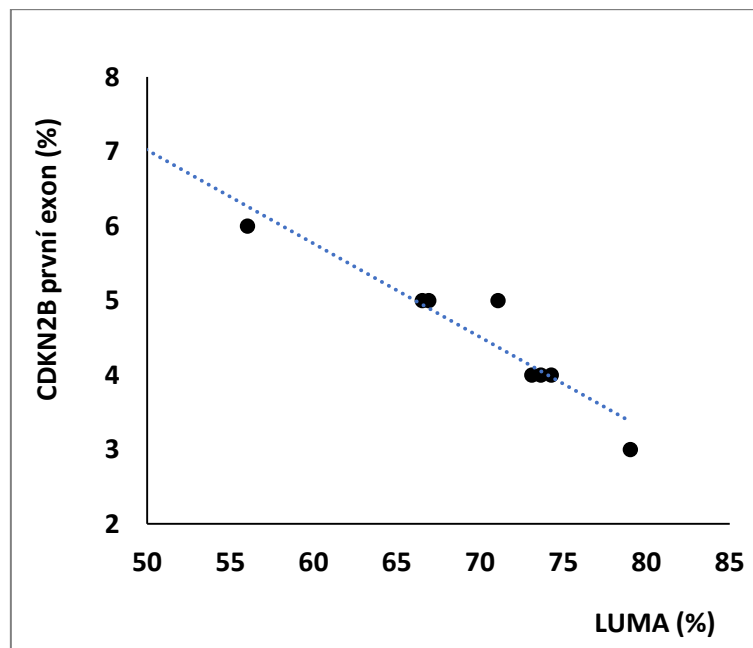
Metylační analýzy úseků v promotoru a 1. exonu genu CDKN2B vykazovaly nízkou úroveň metylace a nelišily se mezi jednotlivými skupinami MGUS, SMM, MMdg. a MMrel., přičemž skupiny MMost. a MMrem. obsahovaly nedostatečný počet patientských vzorků pro statistické vyhodnocení (graf č. 3a a 3b).

Graf č. 3a a 3b: Znázornění metylace genu CDKN2B v oblasti promotoru a prvního exonu ve skupinách MGUS, SMM, MMdg. a MMrel.



Spearmanovou korelační analýzou byla ve skupině MMrel. zjištěna silná negativní korelace ($r = -0,951$) mezi hodnotami globální metylace DNA a úrovní metylace úseku v 1. exonu genu CDKN2B, která je signifikantní při hladině významnosti $p < 0,01$ ($p\text{-value}=0,0003$); znázorněno v grafu č. 4.

Graf č. 4: Znázornění silné negativní korelace mezi globální metylací (LUMA, %) a metylací prvního exonu genu CDKN2B ve skupině MMrel.



3.5 Diskuze

Hlavním cílem překládané studie bylo zavedení metody LUMA pro stanovení globální metylace genomu a její aplikaci do vyšetřovací praxe u pacientů s MM. Tato metoda se ukázala jako velmi efektivní pro snadno aplikovatelný přístup s poměrně malou časovou náročností a spolehlivými výsledky, jejichž hodnoty jsou srovnatelné s literárními údaji. Do studie byla použita nesortovaná populace buněk izolovaných z kostní dřeně, bez separace myelomových buněk sortováním. Sortování zkoumané populace je obecně doporučovaný postup ke zlepšení citlivosti a přesnosti prováděných vyšetření, je však zároveň limitací celého postupu, neboť ne vždy je možné získat dostatečné množství materiálu k analýze. Dostupnost sortování se navíc široce rozvíjí teprve v posledních letech. V rámci postupu zpracování odebraného vzorku navíc přináší další logistickou komplikaci. Je zajímavé, že literárně uváděné závěry některých analýz naznačují, že použití sortované a nesortované

populace nevykazuje signifikantní odlišnosti (100). Vzhledem k výše uvedenému jsme se rozhodli posoudit vhodnost metody LUMA pro kvantitativní stanovení globální metylace DNA, která je izolována z právě z nesortované buněčné populace neupraveného vzorku odebrané kostní dřeně. Naše výsledky tak mohou výrazněji přispět ke vhodnosti použití této metody a její aplikaci ve vyšetřování globální metylace genomu ze vzorku kostní dřeně pacientů s MM bez nutnosti sortování buněčné populace.

Dalším předmětem studia bylo provedení metylační analýzy na úrovni DNA ve vybraných sekvencích genů CDKN2B a PDLIM4, ve vztahu k celkové úrovni metylace DNA a jednotlivým fázím onemocnění. Gen CDKN2B byl vybrán jako tumor-supresorový gen s předpokládanou úlohou regulátora buněčného cyklu v patogenezi MM. Nezanedbatelným faktorem důležitosti tohoto genu byla také v několika studiích zmiňovaná hypermethylace jeho promotoru (101), (102), (103).

V předkládané práci jsme porovnávali hodnoty metylace ve vybraných úsecích promotoru a prvního exonu genu CDKN2B, a to mezi jednotlivými stádii MM včetně premaligního stavu MGUS. Hodnoty metylace v sekvencích obou sledovaných částí genu dosahovaly nízkých hodnot, bez statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami. Naše výsledky se neshodují s již publikovanými analýzami, které popisují hypermethylaci v promotoru i sekvencích genu CDKN2B (104), (105). Na rozdíl od těchto studií jsme u skupiny pacientů s relabujícím myelomem zjistili silnou negativní korelaci mezi úrovní globální metylace DNA (použitím metody LUMA) a úrovní metylační změn ve vybraném úseku exonu genu CDKN2B.

Na základě metylačních analýz promotoru genu PDLIM4 jsme detekovali nejvyšší úroveň metylačních změn u nově diagnostikovaných pacientů s mnohočetným myelomem. Analogicky k ostatním genům, které jsou popisovány v patogenezi MM zejména v progresi onemocnění mezi jednotlivými stádii onemocnění, předkládané výsledky tak potvrzují důležitost genu PDLIM4 při vzniku a propuknutí symptomatického myelomu u nově diagnostikovaných pacientů s mnohočetným myelomem.

3.6 Závěr

Poznatky o účasti epigenetických modifikací nejen v patogenezi mnohočetného myelomu, ale i v prognóze nemocných a predikci na indikovanou terapii nás vedou k hledání nových, snadno aplikovatelných metod ke zjišťování stavu epigenetických změn v genomu. Jednou z takovýchto dostupných analýz je LUMA assay, která dokáže určit hladinu globální metylace genomu z nesortovaného vzorku kostní dřeně, což značí zjednodušení a zrychlení zpracování vzorku. Využití získaných výsledků globální metylace je předmětem intenzivních studií ve smyslu prognostických a prediktivních faktorů a jejich praktické aplikace. Hypotézu zapojení PDLIM4 genu v patogenezi onemocnění MM ve funkci inhibice genové exprese tumor supresorového genu je třeba ověřit na větším souboru vzorků, jde však o poznatek shodující se se zjištěními také u jiných nádorových onemocnění. Nález nezměněného metylačního stavu promotoru genu CDKN2B v souboru MGUS a MM může svědčit o tom, že funkce genu CDKN2B v myelomagenezi je mnohem komplexnější a méně přímočará, než se dosud ukazovalo.

25	MMdg.	III A	2	lgG	31,12	kappa	5,99	55,04	ne	ne	ne	ne	ano	ne	ne	ne	ne	ne	VMIP	PR	15	60	73,02 %	RIL promotor	p15 exon	p15 promotor	4 %
26	MMrel.	II A	1	lgG	25,78	lambda	1004,13	5,36	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	nevys.	ne	nevys.	ne	ne	CVD	PR	19	76	73,65 %		4 %	
27	MMdg.	II A	2	lgG	17,81	kappa	14,9	671,48	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	VMIP	PR	31	32	74,81 %		3 %	
28	MMrel.	III A	2	lgG	13,64	kappa	10,55	18,79	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	ne	RD	VGPR	2	2	71,09 %		4 %	
29	MGUS	NA	NA	lgA	7,71	lambda	299,21	7,03	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	75	NA	19 %		4 %
30	MMrel.	II A	1	lgG	23,57	kappa	4,43	410,92	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	ne	nevys.	ne	nevys.	nevys.	ne	RD	PR	14	31	66,54 %		4 %	
31	MGUSd r.	NA	NA	lgG	5,2	kappa	10,58	27,6	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	75	77,03 %		4 %	
32	SMM	I A	1	lgG	27,71	lambda	22,19	7,07	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	nevys.	ne	nevys.	ne	ne	NA	NA	NA	75	72,81 %		4 %	
33	MMdg.	II A	2	lgG	35,88	kappa	9,25	61,23	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	ne	nevys.	ne	nevys.	nevys.	ne	Carf.MP	NA	2	3	78,13 %		4 %	
34	MMrel.	II A	1	lgG	12,94	kappa	9	684,66	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	nevys.	ne	nevys.	ne	VD	MR	14	54	74,28 %		2 %		
35	MMdg.	III A	2	lgG	30,71	kappa	16,69	134,59	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	ne	nevys.	ne	nevys.	nevys.	ne	Carf.MP	sCR	39	39	75,82 %		3 %	
36	MMrel.	III A	1	lgG	13	kappa	0,82	78,52	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	CTD	PR	9	15	73,11 %		3 %		
37	MMdg.	II A	2	lgG	17,63	lambda	463,97	12,8	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	VMIP	PR	45	46	NA		5 %		
38	MMdg.	II A	UN/B2M	lgA	39,12	kappa	1,11	1563,5	ne	nevys.	nevys.	nevys.	ne	nevys.	ne	nevys.	ne	ne	MP	SD	51	5	72,53 %		2 %		
39	SMMdg.	I A	1	lgA	14,4	lambda	902,65	5,25	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	NA	NA	NA	74	74,92 %		2 %		
40	MMdg.	II A	2	nonsec.	0		32,87	8,39	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	ne	nevys.	ne	nevys.	nevys.	BAD	CR	74	74	77,43 %		14 %		
41	MMdg.	I A	1	lgG	30,5	kappa	8,21	333,31	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	74	78,49 %		2 %		
42	MMdg.	III A	3	lgG	70,31	lambda	790,53	0,75	ne	ne	nevys.	ne	ne	ne	nevys.	ne	nevys.	ne	BAD	CR	74	74	70,20 %		3 %		
43	MMdg.	III B	3	LC only	1,91	kappa	6,81	18039,36	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	CVD	VGPR	41	74	69,32 %		12 %		
44	MGUS	NA	NA	lgG	12,48	lambda	219,68	9,83	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	ne	nevys.	ne	nevys.	nevys.	ne	NA	NA	NA	74	NA	19 %		4 %
45	MMrel.	II A	UN/B2M	lgA	14,75	kappa	1,05	592,18	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	nevys.	ne	nevys.	ne	nevys.	nevys.	RAD	PR	11	15	69,37 %		6 %		
46	MMdg.	III A	2	lgA	33,26	kappa	1,13	47,12	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	VMIP	PR	21	73	44,26 %		4 %		
47	MMdg.	I A	2	lgA	12,6	lambda	494,97	8,45	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	CVD	PR	8	46	65,58 %		6 %		
48	MMdg.	III B	3	LC only	3,4	lambda	18740	8,89	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	VD	CR	26	61	63,80 %		1 %		

	diagnóza	stádium dle D-S (pouze u MM)	stádium dle ISS (pouze u MM)	typ paraproteinu (IgG, IgA, IgD, IgE)	koncentrace paraproteinu [g/l]	dominantní lehký řetězec (k, l)	konc. lehkého řetězce lambda [g/l]	konc. lehkého řetězce kappa [g/l]	del17	t(4;14)	t(14;16)	amplif. 1	t(11;14)	hyperdiploidie	změny 13. chromozomu	delRb1	typ léčby	léčebná odezva	délka doby do progresu (PFS)	celkové přežití (od data vyšetření)	LUMA	RIL promotor	p15 exon	p15 promotor
49	SMMdg.	I A	1	IgG	7,1	kappa	9,42	12,21	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	73	68,23 %	14 %	NA	3 %
50	SMMrel.	I A	1	IgG	9,9	kappa	11,29	790,96	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	NA	NA	NA	27	73,45 %	25 %	NA	6 %
51	MMrem.	III A	2	IgG	0	lambda	11,29	10,01	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	CVD	sCR	28	40	71,63 %	17 %	NA	1 %
52	MMdg.	III A	2	IgG	66,39	kappa	0,76	30,42	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	BAD	VGPR	19	73	62,73 %	18 %	NA	1 %
53	MMrel.	II A	2	IgG	13,03	kappa	1245,94	7,81	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	RD	PR	3	10	29,55 %	22 %	NA	3 %
54	MMrem.	III A	3	IgD	0	kappa	8,74	13,65	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	CVD	sCR	32	56	75,71 %	19 %	5 %	NA
55	SMM	I A	2	IgG	14,56	kappa	10,17	405,14	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	72	68,49 %	13 %	4 %	NA
56	MUGUdg.	NA	NA	IgG	5,4	kappa	20,05	27,86	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	73	NA	14 %	3 %	NA
57	MMrel.	II A	1	IgG	12,41	kappa	6,27	79,4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	VD	PR	21	56	56,04 %	22 %	6 %	NA
58	MMdg.	III A	1	IgA	5,21	kappa	7,69	13,37	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	CVD	sCR	35	65	67,05 %	10 %	4 %	NA
59	MMrem.	II A	2	LC only	0	lambda	12,97	13,67	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	CVD	CR	79	72	73,40 %	9 %	6 %	NA
60	MMdg.	II A	2	IgA	8,25	lambda	378,14	14,69	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	BAD	sCR	62	72	75,44 %	21 %	4 %	NA
61	MMostat.	II A	1	IgG	3,52	kappa	19,84	19,21	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	TAD	VGPR	83	71	72,29 %	14 %	20 %	NA
62	MMostat.	II A	1	IgA	4,24	lambda	1,09	0,89	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	TD	MR	3	19	71,15 %	16 %	9 %	NA
63	MUGUdg.	NA	NA	IgG	2,9	lambda	9,63	13,71	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	71	NA	13 %	3 %	NA
64	MMdg.	III A	3	IgA	54,19	kappa	1,83	652,25	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	Dex.	NA	0,1	0,3	73,41 %	20 %	3 %	NA
65	MMdg.	III A	2	IgG	21,09	kappa	5,94	3044,96	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	Dex.	NA	1	1	70,46 %	17 %	4 %	NA
66	MMdg.	III B	3	LC only	7,76	lambda	12995,68	11,09	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	BAD	PR	28	28	56,76 %	27 %	3 %	NA
67	MUGUdg.	NA	NA	LC only	0,8	kappa	6,24	2286,94	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	71	68,79 %	23 %	2 %	NA
68	MUGUdg.	NA	NA	IgG	8,7	kappa	9,99	43,07	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	71	74,96 %	14 %	4 %	NA
69	MUGUdg.	NA	NA	IgA	1,3	lambda	201,44	53,43	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	NA	NA	NA	25	76,50 %	14 %	NA	NA
70	MMdg.	NA	NA	IgG	0	kappa	15,56	28,88	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	CTD	VGPR	NA	11	73,51 %	16 %	NA	NA
71	MMdg.	III A	2	IgM	66,81	lambda	62,41	25,52	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	BAD	VGPR	18	31	72,96 %	28 %	NA	NA
72	MMdg.	III A	2	IgA	50,5	kappa	1,1	302,27	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	VMP	PR	17	24	72,15 %	17 %	NA	NA

	diagnóza	stádium dle D-S (pouze u MM)	stádium dle ISS (pouze u MM)	typ paraproteinu (IgG, IgA, IgD, IgE)	koncentrace paraproteinu [g/l]	dominantní lehký řetězec (k, l)	konc. lehkého řetězce lambda [g/l]	konc. lehkého řetězce kappa [g/l]	del17	t(4;14)	t(14;16)	amplif. 1	t(11;14)	hyperdiploidie	změny 13. chromozomu	delRb1	typ léčby	léčebná odezva	délka doby do progresu (PFS)	celkové přežití (od data vyšetření)	LUMA	RIL promotor	p15 exon	p15 promotor
73	MMdg.	II A	1	IgG	4,34	kappa	1,43	1492,2	nevyš.	ne	ano	ano	ne	ano	ne	ne	VMP	VGPR	18	69	72,90%	20%	NA	NA
74	MMdg.	II A	1	IgA	20,17	kappa	1,22	281,1	ne	nevyš.	ano	ano	nevyš.	ano	ano	ano	VMP	sCR	29	79	75,54%	17%	NA	NA
75	MMostát	III B	3	IgG	2	kappa	5,05	11,28	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	CD	PR	54	69	72,47%	10%	NA	NA
76	MMdg.	III A	2	IgG	37,34	kappa	5,48	1371,82	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ne	ne	VMP	SD	13	69	66,24%	14%	NA	NA
77	MMdg.	III A	3	LC only	4,41	lambda	2772,08	0,67	ne	nevyš.	nevyš.	ano	nevyš.	ano	nevyš.	nevyš.	CVD	sCR	68	68	64,97%	15%	NA	NA
78	MMrel.	III B	3	IgG	24,72	kappa	6,02	12046,56	ano	nevyš.	nevyš.	ano	nevyš.	ano	ano	ano	RD	PR	7	7	73,92%	16%	NA	NA
79	MMrel.	II A	1	IgA	21,72	lambda	553,43	5,52	ano	nevyš.	nevyš.	ano	nevyš.	ano	nevyš.	nevyš.	DPACE	PR	13	14	76,07%	14%	NA	NA
80	MMdg.	III A	3	IgG	89,5	kappa	7,52	360,9	ne	ne	ano	ano	ne	ano	ne	ne	Carf,MP	SD	1	1	48,66%	26%	NA	NA
81	MMdg.	III A	2	IgG	29,5	lambda	22,07	18,89	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ne	ne	Carf,MP	PR	14	68	65,65%	24%	NA	NA
82	MMrel.	III A	1	IgA	22,87	kappa	1,27	30,65	ne	nevyš.	nevyš.	ano	nevyš.	ne	nevyš.	nevyš.	RD	VGPR	8	8	60,11%	24%	NA	NA
83	MMostát	III A	1	nonsec.	0	kappa	230,64	8,21	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	RD	PR	42	34	66,82%	20%	NA	NA
84	MMdg.	III B	3	IgG	58,25	kappa	2,13	283,87	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ne	ne	VD	SD	3	3	74,19%	28%	NA	NA
85	MMrel.	III B	3	IgG	7,58	kappa	29,12	1073,61	nevyš.	nevyš.	nevyš.	ne	nevyš.	ano	nevyš.	nevyš.	RD	VGPR	27	67	77,41%	12%	NA	NA
86	MMdg.	III A	3	LC only	2,3	lambda	18800,96	15,05	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	Carf,MP	SD	1	1	73,26%	17%	NA	NA
87	MMrel.	II A	1	IgA	26,35	lambda	280,71	8,24	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	CD	SD	15	20	71,39%	12%	NA	NA
88	MMdg.	II A	2	IgG	83,8	kappa	5,57	3400	ne	ano	nevyš.	ano	nevyš.	ne	ano	ano	BAD	PR	11	37	62,05%	31%	NA	NA
89	MMdg.	II A	2	IgA	49,76	kappa	8,37	382,86	ne	ano	nevyš.	ne	nevyš.	ne	ano	ano	BAD	VGPR	53	65	68,86%	21%	NA	NA
90	MMrel.	II A	NA	IgG	10,17	kappa	18,21	393,21	ne	nevyš.	nevyš.	ne	nevyš.	ne	nevyš.	nevyš.	RD	PR	4	4	67,34%	15%	NA	NA
91	MMrel.	III B	2	IgA	9,4	lambda	2262,56	7,19	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	RD	VGPR	7	14	67,58%	17%	NA	NA
92	MMrel.	III A	1	IgG	18,23	lambda	227,33	8,46	ne	nevyš.	nevyš.	ano	nevyš.	ano	nevyš.	nevyš.	VD	PR	39	65	65,68%	14%	NA	NA
93	MMdg.	III A	2	IgG	29,28	kappa	0,24	148,71	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	CVD	PR	27	64	70,75%	14%	NA	NA
94	MMrel.	II A	2	IgG	18,31	kappa	0,61	30,74	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	nevyš.	NA	NA	NA	19	56,35%	10%	NA	NA

Seznam zkratek

AH	amyloid na bázi těžkých řetězců imunoglobulinu
AL	amyloid na bázi lehkých řetězců imunoglobulinu
APOA4	apolipoprotein A4
APOE	apolipoprotein E
ATP	adenosintrifosfát
CDKN2A	inhibitor A cyklin-dependentní kinázy 4
CDKN2B	inhibitor B cyklin-dependentní kinázy 4
CPHPC	[(R)-1-[6-[(R)-2-carboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxo-hexanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid
CR	kompletní remise
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA-metyltransferáza
dNTPs	deoxynukleotidy
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
HAT	histonacetyltransferáza
HDAC	histondeacetyláza
IHC	imunohistochemie
LC/MS	kapalinová chromatografie spřažená s hmotnostní spektrometrií
LINE-1	long interspersed nuclear elements-1
LMD	laserová mikrodisekce
LMD-LC/MS	laserová mikrodisekce – kapalinová chromatografie spřažená s hmotnostní spektrometrií
LUMA	luminometric methylation assay
MALDI-IMS MSI	matrix-assisted laser desorption/ionization mass spektrometry imaging coupled with ion mobility separation
MDS	myelodysplastický syndrom
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance)
miRNA	mikroRNA
MM	mnohočetný myelom

MMdg.	mnohočetný myelom v době diagnózy
MMost.	mnohočetný myelom nezařazený
MR	minimální léčebná odpověď
MMrel.	mnohočetný myelom v době relapsu
MMrem.	mnohočetný myelom v době remise
MS	hmotností spektrometrie
MudPIT	multidimensional protein identification technology
NA	data nejsou k dispozici (not available)
OS	celkové přežití
PD	progrese onemocnění
PFS	přežití bez progrese nemoci (progression free survival)
PR	parciální remise
SAP	sérový amyloidový protein P
SD	stabilní nemoc
SMM	doutnající myelom (smouldering multiple myeloma)
VGPR	velmi dobrá parciální remise

Práce související s dizertační prací

Původní vědecká publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. Pika T, Hegenbart U, **Flodrova P**, Maier B, Kimmich C, Schönland SO. First report of ibrutinib in IgM-related amyloidosis: few responses, poor tolerability and survival. *Blood*. 2017 Nov 27. pii: blood-2017-09-806463. doi:10.1182/blood-2017-09-806463. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29180400. IF:17,794
2. Holub D, **Flodrova P**, Pika T, Flodr P, Hajduch M, Dzubak P. Mass Spectrometry Amyloid Typing Is Reproducible across Multiple Organ Sites. *Biomed Res Int*. 2019 Jan 31;2019:3689091. doi: 10.1155/2019/3689091. PMID: 30834260; PMCID: PMC6374819. IF:2,276

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Pika T., Lochman P., Vymětal J., Metelka R., Flodr P., Minařík J., **Látalová P.**, Zapletalová J., Bačovský J., Ščudla V. Význam stanovení kardiálních biomarkerů ve stratifikaci a sledování nemocných s AL-amyloidózou – zkušenosti jednoho centra. *Vnitřní lékařství* 2013, roč. 59, č. s. 771-781.
2. Pika T., Lochman P., Flodr P., Minařík J., **LÁTALOVÁ P.**, Bačovský J., Ščudla V. Význam stanovení vybraných laboratorních parametrů v diagnostice, stratifikaci a sledování nemocných s AL amyloidózou. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2013, **21**(2), 79-82. ISSN 1210-7921.
3. Pika T., Lochman P., Vymětal J., Metelka R., Minařík J., **Látalová P.**, Zapletalová J., Bačovský J., Ščudla V. Dosažení kompletní hematologické remise je zásadní pro prodloužení přežití nemocných s AL amyloidózou a srdečním postižením. *Klinická onkologie*. 2013, **26**(5), 343-347.
4. Ščudla V., Adam Z., Hájek R., Krejčí R, Pika T., Maisnar V., Flodr P., Kuřová Z., **Látalová P.**, Potáčková A., Ryšavá R., Špička I., Tichý M., Všianská P. Souhrn doporučení 2013 "Diagnostika a léčba systémové AL amyloidózy". *Transfuze a hematologie dnes*. 2013, roč. 19, Supplementum, s. 5, 7-12.
5. Ščudla V., Pika T., **Látalová P.**, Flodr P., Maisnar V., Hájek R., Česká myelomová skupina. Diagnostika a stratifikace systémové AL amyloidózy ve světle „Doporučení České myelomové skupiny 2013“. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2014, roč. 22, č. 2, s. 49-60. ISSN: 1210-7921.
6. Pika T., Flodr P., Novák M., Lochman P., **Látalová P.**, Minařík J., Ščudla V. Klinická problematika IgM monoklonálních gamapatií. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2014, roč. 22, č. 2, s. 61-64. ISSN: 1210-7921
7. **Látalová P.**, Pika T., Flodr P. AL amyloidóza v obrazech. *Transfuze a hematologie dnes* 2014, 20(3):76-80.

8. Pika T., Lochman, **Látalová P**, Minařík J., Krhovská P., Bačovský J., ŠČUDLA V. Problematika stanovení monoklonálního imunoglobulinu u nemocných s AL amyloidózou. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2015, **23**(2), 37-41.
9. Pika T., **Látalová P.**, Hůlková H., Vlášková H., Otruba P., Mejzlík V., Ščudla V. Familiární amyloidová polyneuropatie – kazuistika. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2015, 78(6), 710-714.

Přehledné/souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. **Flodrova P**, Flodr P, Pika T, Vymetal J, Holub D, Dzubak P, Hajduch M, Scudla V. Cardiac amyloidosis: from clinical suspicion to morphological diagnosis. *Pathology*. 2018 Apr;50(3):261-268. doi: 10.1016/j.pathol.2017.10.012. Epub 2018 Feb 12. PMID: 29448998. IF:3,744

Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Pika T., Heřmanová Z., **Flodrová P.**, Laboratorní aspekty systémové AA amyloidózy. *Klin. Biochem. Metab.*, 25 (46), 2017, No. 2, p. 56-58.
2. Aiglová R, Táborský M, **Flodrová P**, Schee A. Srdeční transthyretinová amyloidóza. *Cor Vasa*. 2020;62(3):267-271.
3. Aiglová R., Táborský M., **Flodrová P.** Srdeční amyloidóza – klinická manifestace a diagnostika. *Medicína po promoci*. 2020, **21**(2), 146-150.

Kapitoly v monografiích

1. **Flodrova P.**, Pika T., Flodr P.: Chapter 4 - Tissue examination in a diagnostic procedure; in: WATTS, Raquel, ed. *Amyloidosis: Risk Factors, Treatment Options and Clinical Aspects*. New York: Nova Science Publishers, 2017. ISBN 978-1-63485-884-7.

Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech

1. Přednáška: *Diagnostika amyloidózy z pohledu patologa*, **Látalová P.** „XI. workshop mnohočetný myelom a roční setkání České myelomové skupiny“, konané 26. - 27. 4. 2013 v Mikulově.
2. Poster: *Akutní myeloidní leukemie z pohledu epigenetických změn detekovatelných v periferní krvi*, **Látalová P.**, Smešný Trtková K., Sztokowski T. XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, XVII. Konference ošetřovatelství a zdravotních laborantů, 6th Symposium on Advances in Molecular Hematology“, konané 12. - 14. 5. 2013
3. Přednáška: *Amyloidóza v morfologickém a klinickém obraze*, **Látalová P.**, Pika T., Flodr P., Holub D. The 10th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, 100. olomoucký meziregionální mezioborový diagnostický seminář Společnosti českých patologů a české sekce International Academy of Pathology, konané 24. - 26. 4. 2014 v Olomouci

4. Poster: *CpG island methylation of the RIL and p15INK4b genes in patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance*, **Latalova P.**, Smesny Trtkova K., Minarik J., Navratilova L. 26th European Congress of Pathology, London, United Kingdom, from 30 August - 3 September 2014
5. Poster: *Analysis of CpG Island DNA Methylation of p15INK4b and RIL in Bone Marrow Samples of Patients with Monoclonal Gammopathies*, **Pavla Latalova**, MD, Katerina Smesny Trtkova, Ing., Lucie Navratilova, Mgr, Vlastimil Scudla, prof, MD PhD, Jiri Minarik, MD PhD. 2014 American Society of Hematology Annual Meeting, December 6-9, 2014
6. Poster: *Amyloid typing using immunohistochemical and proteomic analysis*, **P. Látalová**, D. Holub, T. Pika, P. Flodr, M. Hajduch 27th European Congress of Pathology, 5. - 9. 9. 2015, Bělehrad, Srbsko
7. Přednáška: *Vyšetření tkání při diagnostice amyloidu*. **Flodrová P.**, Pika T., Flodr P. XXX. Olomoucké hematologické dny, XX. Konference ošetřovatelství a zdravotních laborantů, IX. Symposium on Advances in Molecular Hematology, 29. - 31. 5. 2016, Olomouc
8. Přednáška: *Role vyšetření tkáně v diagnostickém procesu u pacientů s amyloidózou*, **Flodrová P.** The 12th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, 103. olomoucký diagnostický seminář a české divize International Academy of Pathology, 7. dny histologických laborantů, 2. - 3. 6. 2016
9. Poster: *Diagnostika amyloidózy u pacientů se syndromem karpálního tunelu*, **Flodrová P.**, Krhovská P., Pika T., Holub D., Flodr P. Dni molekulovej patologie, 13. sympóziu molekulovej patologie s medzinárodnou účasťou a Martinské dni nelékařských pracovníkov v patológii, 22. - 23. 6. 2017, Martin, Slovenská republika.
10. Poster: *Vliv metylačních změn na expresi RIL/PDLIM4 u mnohočetného myelomu*, **Flodrová P.**, Lužná P., Minařík J., Krhovská P., Smešný-Trtková K. Dni molekulovej patologie, 13. sympóziu molekulovej patologie s medzinárodnou účasťou a Martinské dni nelékařských pracovníkov v patológii, 22. - 23. 6. 2017, Martin, Slovenská republika.

Ostatní publikace

Původní vědecká publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. Gachechiladze M, Skarda J, Ibrahim M, Tichý T, Flodr P, **Latalova P**, Ehrmann J, Trojanec R, Kolář Z. Primitive neuroectodermal tumor (PNET) of the lung in an adult woman. *World J Surg Oncol*. 2014 Dec 5;12:374. IF:1,963
2. Minarik J, Hermanova Z, Petrova P, Hrbek J, Zapletalova J, Krhovska P, Flodr P, Pika T, Bacovsky J, **Flodrova P**, Herman M, Scudla V. Prospective study of signalling pathways in myeloma bone disease with regard to activity of the disease, extent of skeletal involvement and correlation to bone turnover markers. *Eur J Haematol*. 2016 Aug;97(2):201-7. IF:2,22

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Flodr P., **Látalová P.**, Tichý M., Kubová Z., Papajík T., Šváchová M., Radová L., Jarošová M. Clinicopathological correlations of the immunoprofile in diffuse large B-cell lymphoma NOS - a single institution's experience. *Čes.-slov. Patol.*, 52, 2016, No. 1, p. 47-54.
2. Navrátilová L, Procházková P, Bardoň J, Novotný R, Zápalka M, Jakubec P, Zatloukal J, Kolek V, Kopřiva F, **Flodrová P**, Raclavský V. Performance of pyrosequencing versus MALDI-TOF MS in bacteria identification in chronic lung disease. *J Biol Methods*. 2016 Aug 13;3(4):e52.

Přehledné/souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. Flodr P, **Latalova P**, Tichy M, Kubova Z, Papajik T, Svachova M, Vrzalikova K, Jarosova LR, Murray P. Diffuse large B-cell lymphoma: The history, current view and new perspectives. *Neoplasma*. 2014 Jul 17. doi: 10.4149/neo_2014_062. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25030433. IF:1,721

Reference

- (1) BENSON, Merrill, Joel BUXBAUM, David EISENBERG, Giampaolo MERLINI, Maria SARAIVA, Yoshiki SEKIJIMA, Jean SIPE a Per WESTERMARK. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* [online]. 2020, **27**(4), 217-222 [cit. 2021-01-10]. ISSN 1350-6129. Dostupné z: doi:10.1080/13506129.2020.1835263
- (2) SIPE, Jean a Alan COHEN. Review: History of the Amyloid Fibril. *Journal of Structural Biology* [online]. 2000, **130**(2-3), 88-98 [cit. 2017-07-19]. ISSN 10478477. Dostupné z: doi:10.1006/jsbi.2000.4221
- (3) PEPYS, Mark B. Amyloidosis. *Annual Review of Medicine* [online]. 2006, **57**(1), 223-241 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00664219. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.med.57.121304.131243
- (4) VRANA, J., J. GAMEZ, B. MADDEN, J. THEIS, H. BERGEN a A. DOGAN. Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood* [online]. 2009, **114**(24), 4957-4959 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-07-230722
- (5) VRANA, J., J. THEIS, S. DASARI et al. Clinical diagnosis and typing of systemic amyloidosis in subcutaneous fat aspirates by mass spectrometry-based proteomics. *Haematologica* [online]. 2014, **99**(7), 1239-1247 [cit. 2019-11-15]. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2013.102764
- (6) D'SOUZA, Anita, Jason THEIS, Patrick QUINT et al. Exploring the amyloid proteome in immunoglobulin-derived lymph node amyloidosis using laser microdissection/tandem mass spectrometry. *American Journal of Hematology* [online]. 2013, **88**(7), 577-580 [cit. 2017-07-19]. ISSN 03618609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.23456
- (7) GREENWALD, Jason a Roland RIEK. Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation. *Structure* [online]. 2010, **18**(10), 1244-1260 [cit. 2017-07-19]. ISSN 09692126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2010.08.009
- (8) CHITI, Fabrizio a Christopher DOBSON. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2006, **75**(1), 333-366 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00664154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901
- (9) VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika: učebnice pro střední zdravotnické školy, studijní obor zdravotnický laborant*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1988.
- (10) GERTZ, Morie a S. RAJKUMAR, ed. *Amyloidosis: Diagnosis and Treatment*. 1. New York: Humana Press, 2010, 238 s. ISBN 978-1-60761-630-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-631-3
- (11) HOWIE, Alexander, Douglas BREWER, Daniel HOWELL a Adrian JONES. Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light. *Laboratory Investigation* [online]. 2008, **88**(3), 232-242. ISSN 00236837. Dostupné z: doi:10.1038/labinvest.3700714
- (12) SIPE, Jean, Merrill BENSON, Joel BUXBAUM, Shu-ichi IKEDA, Giampaolo MERLINI, Maria SARAIVA a Per WESTERMARK. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* [online]. 2016, **23**(4), 209-213 [cit. 2018-03-20]. ISSN 1350-6129. Dostupné z: doi:10.1080/13506129.2016.1257986
- (13) WESTERMARK, G.T., K.H. JOHNSON a P. WESTERMARK. Staining methods for identification of amyloid in tissue. *Methods in Enzymology* [online]. 1999, **309**, 3-25 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00766879. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(99)09003-5

- (14) ELGHETANY, M.T., A. SALEEM a K. BARR. The Congo red stain revisited. *Annals of Clinical and Laboratory Science* [online]. 1989, **19**(3), 190-195 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00917370. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselc&AN=edselc.2-52.0-0024591775&site=eds-live&authtype=shib&custid=s7108593>
- (15) PUCHTLER, Holde, Faye SWEAT a M. LEVINE. ON THE BINDING OF CONGO RED BY AMYLOID. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* [online]. 1962, **10**(3), 355-364 [cit. 2019-11-16]. ISSN 00221554. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=edo&AN=ejs41812753&lang=cs&site=eds-live&authtype=shib&custid=s7108593>
- (16) MARCUS A, , SADIMIN E, RICHARDSON M, GOODELL L a FYFE B. Fluorescence microscopy is superior to polarized microscopy for detecting amyloid deposits in Congo red-stained trephine bone marrow biopsy specimens. *American Journal Of Clinical Pathology* [online]. 2012, **138**(4), 590-3 [cit. 2017-07-19]. ISSN 19437722. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=23010714&site=eds-live&authtype=shib&custid=s7108593>
- (17) KHURANA, Ritu, Chris COLEMAN, Cristian IONESCU-ZANETTI, Sue CARTER, Vinay KRISHNA, Rajesh GROVER, Raja ROY a Shashi SINGH. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology* [online]. 2005, **151**(3), 229-238 [cit. 2017-07-19]. ISSN 10478477. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsb.2005.06.006
- (18) BIANCALANA, Matthew a Shohei KOIDE. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. 2010, **1804**(7), 1405-1412 [cit. 2017-07-19]. ISSN 15709639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2010.04.001
- (19) LEUNG, N., S. NASR a S. SETHI. How I treat amyloidosis: the importance of accurate diagnosis and amyloid typing. *Blood* [online]. 2012, **120**(16), 3206-3213 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2012-03-413682
- (20) AMANN, Kerstin a Christian HAAS. What you should know about the work-up of a renal biopsy. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. 2006, **21**(5), 1157-1161 [cit. 2021-01-16]. ISSN 1460-2385. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfk037
- (21) SCHONLAND, S., U. HEGENBART, T. BOCHTLER, A. MANGATTER, M. HANSBERG, A. HO, P. LOHSE a C. ROCKEN. Immunohistochemistry in the classification of systemic forms of amyloidosis: a systematic investigation of 117 patients. *Blood* [online]. 2012, **119**(2), 488-493 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2011-06-358507
- (22) KEBBEL, A a C ROCKEN. Immunohistochemical classification of amyloid in surgical pathology revisited. *AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY* [online]. 2006, **30**(6), 673-683 [cit. 2017-07-19]. ISSN 01475185. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edswsc&AN=000238069100002&site=eds-live&authtype=shib&custid=s7108593>
- (23) CHEE, Cheng, Martha LACY, Ahmet DOGAN, Steven ZELDENRUST a Morie GERTZ. Pitfalls in the Diagnosis of Primary Amyloidosis. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* [online]. 2010, **10**(3), 177-180 [cit. 2017-07-19]. ISSN 21522650. Dostupné z: doi:10.3816/CLML.2010.n.027
- (24) WINTER, Martin, Andreas THOLEY, Arnt KRISTEN a Christoph RÖCKEN. MALDI Mass Spectrometry Imaging: A Novel Tool for the Identification and Classification of Amyloidosis. *PROTEOMICS* [online]. 2017, **17**(22), 1700236 [cit. 2021-01-17]. ISSN 16159853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201700236
- (25) SATOSKAR, Anjali, Yvonne EFEBERA, Ayesha HASAN, Sergey BRODSKY, Gyongyi NADASDY, Ahmet DOGAN a Tibor NADASDY. Strong Transthyretin Immunostaining. *The American Journal of Surgical Pathology* [online]. 2011, **35**(11), 1685-1690 [cit. 2017-07-19]. ISSN 01475185. Dostupné z: doi:10.1097/PAS.0b013e3182263d74

- (26) FRADLEY MG, , THAKURIA JV, COLLINS AB, MOORE SA a STONE JR. Direct tissue evaluation via immunofluorescence: in the diagnosis of hereditary transthyretin cardiac amyloidosis. *Texas Heart Institute Journal* [online]. 2012, **39**(1), 71-5 [cit. 2017-07-19]. ISSN 15266702. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=22412233&site=eds-live&authtype=shib&custid=s7108593>
- (27) COLLINS, A., R. SMITH a James STONE. Classification of amyloid deposits in diagnostic cardiac specimens by immunofluorescence. *Cardiovascular Pathology* [online]. 2009, **18**(4), 205-216 [cit. 2017-07-19]. ISSN 10548807. Dostupné z: doi:10.1016/j.carpath.2008.05.004
- (28) STEUSLOFF, Karen, Christoph RÖCKEN a Wolfgang SAEGER. Basement Membrane Proteins and Apolipoprotein E in Growth Hormone Secreting Adenomas and their Correlation to Amyloid: An Immunoelectron Microscopic Study. *Endocrine Pathology* [online]. 2000, **11**(1), 49-56 [cit. 2021-01-16]. ISSN 1046-3976. Dostupné z: doi:10.1385/EP:11:1:49
- (29) ARBUSTINI, E, L VERGA, M CONCARDI, G PALLADINI, L OBICI a G MERLINI. Electron and immuno-electron microscopy of abdominal fat identifies and characterizes amyloid fibrils in suspected cardiac amyloidosis. *AMYLOID-JOURNAL OF PROTEIN FOLDING DISORDERS* [online]. 2002, **9**(2), 108-114 [cit. 2017-07-19]. ISSN 13506129. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edswsc&AN=000176807600005&site=eds-live&authtype=shib&custid=s7108593>
- (30) BRAMBILLA, Francesca, Francesca LAVATELLI, Giampaolo MERLINI a Pierluigi MAURI. Clinical proteomics for diagnosis and typing of systemic amyloidoses. *PROTEOMICS - Clinical Applications* [online]. 2013, **7**(1-2), 136-143 [cit. 2017-07-19]. ISSN 18628346. Dostupné z: doi:10.1002/prca.201200097
- (31) BRAMBILLA, F., F. LAVATELLI, D. DI SILVESTRE et al. Reliable typing of systemic amyloidoses through proteomic analysis of subcutaneous adipose tissue. *Blood* [online]. 2012, **119**(8), 1844-1847 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2011-07-365510
- (32) CASADONTE, Rita a Richard M CAPRIOLI. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nature Protocols* [online]. 2011, **6**(11), 1695-1709 [cit. 2017-07-19]. ISSN 17542189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2011.388
- (33) CASADONTE, Rita, Mark KRIEGSMANN, Sören-Oliver DEININGER et al. Imaging mass spectrometry analysis of renal amyloidosis biopsies reveals protein co-localization with amyloid deposits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(18), 5323-5331 [cit. 2017-07-17]. ISSN 16182642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8689-z
- (34) COHEN, Oliver C. a Ashutosh D. WECHALEKAR. Systemic amyloidosis: moving into the spotlight. *Leukemia* [online]. 2020, **34**(5), 1215-1228 [cit. 2021-01-17]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-020-0802-4
- (35) PEPYS-VERED ME a PEPYS MB. Targeted treatment for amyloidosis. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ* [online]. 2014, **16**(5), 277-80 [cit. 2017-07-19]. ISSN 15651088. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=24979830&site=eds-live&authtype=shib&custid=s7108593>
- (36) RICHARDS, Duncan B., Louise M. COOKSON, Alienor C. BERGES et al. Therapeutic Clearance of Amyloid by Antibodies to Serum Amyloid P Component. *New England Journal of Medicine* [online]. 2015, **373**(12), 1106-1114 [cit. 2017-07-17]. ISSN 00284793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1504942
- (37) KOLSTOE, Simon E., Michelle C. JENVEY, Alan PURVIS, Mark E. LIGHT, Darren THOMPSON, Peter HUGHES, Mark B. PEPYS a Stephen P. WOOD. Interaction of serum amyloid P component with hexanoyl bis(D -proline) (CPHPC). *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* [online]. 2014, **70**(8), 2232-2240 [cit. 2017-07-17]. ISSN 13990047. Dostupné z: doi:10.1107/S1399004714013455

- (38) RICHARDS, Duncan B., Louise M. COOKSON, Sharon V. BARTON et al. Repeat doses of antibody to serum amyloid P component clear amyloid deposits in patients with systemic amyloidosis. *Science Translational Medicine* [online]. 2018, **10**(422), 422 [cit. 2021-01-17]. ISSN 1946-6234. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aan3128
- (39) ŠČUDLA, Vlastimil a Tomáš PIKA. Současné možnosti diagnostiky a léčby systémové AL-amyloidózy. *Vnitřní lékařství*. 2009, **55**(1), 77-87. ISSN 0042-773X.
- (40) Guidelines on the diagnosis and management of AL amyloidosis. *British Journal of Haematology* [online]. 2004, **125**(6), 681-700 [cit. 2021-01-21]. ISSN 00071048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04970.x
- (41) TELIO, David, Denis BAILEY, Christine CHEN, Michael CRUMP, Donna REECE a Vishal KUKRETI. Two distinct syndromes of lymphoma associated AL amyloidosis: A case series and review of the literature. *American Journal of Hematology* [online]. 2010, **85**(10), 805-808 [cit. 2017-08-08]. ISSN 03618609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.21814
- (42) ZHANG, Qi, Cady POERNICH, Annie KURIAN, Angelika F. HAHN, Christopher HOWLETT, Jessica SHEPHERD a Kamilia RIZKALLA. Amyloid deposition in extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: A clinicopathologic study of 5 cases. *Pathology - Research and Practice* [online]. 2016, **212**(3), 185-189 [cit. 2017-08-08]. ISSN 03440338. Dostupné z: doi:10.1016/j.prp.2015.08.007
- (43) KUMAR, S., A. DISPENZIERI, J. A. KATZMANN et al. Serum immunoglobulin free light-chain measurement in primary amyloidosis: prognostic value and correlations with clinical features. *Blood* [online]. 2010, **116**(24), 5126-5129 [cit. 2017-07-19]. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-06-290668
- (44) DESPORT, Estelle, Frank BRIDOUX, Christophe SIRAC et al. AL Amyloidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 2012, **7**(1), 54- [cit. 2017-07-19]. ISSN 17501172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-7-54
- (45) PIKA, Tomáš, Pavel LOCHMAN, Jiří VYMĚTAL et al. Význam stanovení kardiálních biomarkerů ve stratifikaci a sledování nemocných s AL-amyloidózou - zkušenosti jednoho centra. *Vnitřní lékařství*. 2013, **59**(9), 776-781.
- (46) PIKA, Tomáš, Pavla LÁTALOVÁ, Helena HŮLKOVÁ, H. VLÁŠKOVÁ, P. OTRUBA, V. MEJZLÍK a Vlastimil ŠČUDLA. Familiární amyloidová polyneuropatie - kazuistika. *Cesk Slov Neurol N*. 2015, **78111**(6), 710-715.
- (47) DUBREY, Simon, Elizabeth ACKERMANN a Julian GILLMORE. The transthyretin amyloidoses: advances in therapy. *Postgraduate Medical Journal* [online]. 2015, **91**(1078), 439-448 [cit. 2017-07-24]. ISSN 00325473. Dostupné z: doi:10.1136/postgradmedj-2014-133224
- (48) ADAMS, David, Ole B. SUHR, Ernst HUND et al. First European consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Current Opinion in Neurology* [online]. 2016, **29**, 14-26 [cit. 2017-07-17]. ISSN 13507540. Dostupné z: doi:10.1097/WCO.0000000000000289
- (49) GERTZ, Morie A., Michelle L. MAUERMANN, Martha GROGAN a Teresa COELHO. Advances in the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis: A review. *Brain and Behavior* [online]. 2019, **9**(9), 01371 [cit. 2021-01-21]. ISSN 2162-3279. Dostupné z: doi:10.1002/brb3.1371
- (50) LUIGETTI, M., A. ROMANO, A. DI PAOLANTONIO, M. SABATELLI a G. BISOGNI. Diagnosis and treatment of hereditary transthyretin amyloidosis (Hattr) polyneuropathy: Current perspectives on improving patient care. *Therapeutics and Clinical Risk Management* [online]. 2020, **16**, 109-123 [cit. 2020-07-10]. ISSN 1178203X. Dostupné z: doi:10.2147/TCRM.S219979
- (51) YAMAMOTO, Hiroyuki a Tomoki YOKOCHI. Transthyretin cardiac amyloidosis: an update on diagnosis and treatment. *ESC Heart Failure* [online]. 2019, **6**(6), 1128-1139 [cit. 2021-01-21]. ISSN 2055-5822. Dostupné z: doi:10.1002/ehf2.12518

- (52) BRUNGER, Anne Floor, Hans L. A. NIENHUIS, Johan BIJZET a Bouke P. C. HAZENBERG. Causes of AA amyloidosis: a systematic review. *Amyloid* [online]. 2020, **27**(1), 1-12 [cit. 2021-01-22]. ISSN 1350-6129. Dostupné z: doi:10.1080/13506129.2019.1693359
- (53) SUN, Lei a Richard D. YE. Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism. *Gene* [online]. 2016, **583**(1), 48-57 [cit. 2021-01-22]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2016.02.044
- (54) REAL DE ASUA, Diego, Jose Maria GALVAN, Maria Teresa FILIGGHEDU, Davinia TRUJILLO, Ramon COSTA a Julen CADINANOS. Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Clinical Epidemiology* [online]. , 369- [cit. 2017-07-17]. ISSN 11791349. Dostupné z: doi:10.2147/CLEP.S39981
- (55) WESTERMARK, Per a Björn STENKVIST. A New Method for the Diagnosis of Systemic Amyloidosis. *Archives of Internal Medicine* [online]. 1973, **132**(4), 522-523 [cit. 2019-11-15]. ISSN 15383679. Dostupné z: doi:10.1001/archinte.1973.03650100040007
- (56) QUARTA, Candida cristina, Esther GONZALEZ-LOPEZ, Janet a. GILBERTSON et al. Diagnostic sensitivity of abdominal fat aspiration in cardiac amyloidosis. *EUROPEAN HEART JOURNAL* [online]. 2017, **38**(24), 1905-1908 [cit. 2019-11-15]. ISSN 0195668X. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehx047
- (57) MUCHTAR, Eli, Angela DISPENZIERI, Martha LACY et al. Overuse of organ biopsies in immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis: The consequence of failure of early recognition. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* [online]. 2017, **35**(7), 545-551 [cit. 2019-11-15]. ISSN 0732183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e19532
- (58) GIORGADZE, T.a., N. SHIINA, Z.w. BALOCH, J.e. TOMASZEWSKI a P.k. GUPTA. Improved detection of amyloid in fat pad aspiration: An evaluation of congo red stain by fluorescent microscopy. *Diagnostic Cytopathology* [online]. 2004, **31**(5), 300-306 [cit. 2019-11-15]. ISSN 87551039. Dostupné z: doi:10.1002/dc.20131
- (59) ORFILA, Claudine, Patrick GIRAUD, Anne MODESTO a Jean-Michel SUC. Abdominal fat tissue aspirate in human amyloidosis. *Human Pathology* [online]. 1986, **17**(4), 366-369 [cit. 2019-11-15]. ISSN 00468177. Dostupné z: doi:10.1016/S0046-8177(86)80459-2
- (60) OSLEN, Karen Ege, Knut SLETTEN a Per WESTERMARK. The Use of Subcutaneous Fat Tissue for Amyloid Typing by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 1999, **111**(3), 355-362 [cit. 2019-11-15]. ISSN 0002-9173. Dostupné z: doi:10.1093/ajcp/111.3.355
- (61) KAPLAN, Batia, Gloria GALLO, Ruben VIDAL, Asok KUMAR a Jorge GHISO. Immunochemical microanalysis of amyloid proteins in fine-needle aspirates of abdominal fat. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 1999, **112**(3), 403-407 [cit. 2019-11-15]. ISSN 00029173. Dostupné z: doi:10.1093/ajcp/112.3.403
- (62) WESTERMARK, Per, Eva DAVEY, Karolina LINDBOM a Stina ENQVIST. Subcutaneous fat tissue for diagnosis and studies of systemic amyloidosis. *Acta Histochemica* [online]. 2006, **108**(3), 209-213 [cit. 2019-11-15]. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2006.03.011
- (63) HOLUB, Dusan, Pavla FLODROVA, Tomas PIKA, Patrik FLODR, Marian HAJDUCH a Petr DZUBAK. Mass Spectrometry Amyloid Typing Is Reproducible across Multiple Organ Sites. *BioMed Research International* [online]. 2019, **2019**, 1-9 [cit. 2019-11-15]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2019/3689091
- (64) ELIUK, Shannon a Alexander MAKAROV. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry* [online]. 2015, **8**(1), 61-80 [cit. 2019-11-16]. ISSN 1936-1327. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-anchem-071114-040325
- (65) COX, Jürgen, Ivan MATIC, Maximiliane HILGER, Nagarjuna NAGARAJ, Matthias SELBACH, Jesper V OLSEN a Matthias MANN. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nature Protocols* [online]. 2009, **4**(5), 698-705 [cit. 2019-

- 11-16]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2009.36
- (66) HALLOUSH, Ruba, Elena LAVROVSKAYA, Dina MODY, Donna LAGER a Luan TRUONG. Diagnosis and typing of systemic amyloidosis: The role of abdominal fat pad fine needle aspiration biopsy. *CytoJournal* [online]. 2009, **6**(1), 24-24 [cit. 2019-11-15]. ISSN 09745963. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=edsdoj&AN=edsdoj.4422d75f402e427f828e3f7395e365ea&lang=cs&site=eds-live&authtype=shib&custid=s7108593>
- (67) SIDIQI, M. Hasib, Ellen D. MCPHAIL, Jason D. THEIS et al. Two types of amyloidosis presenting in a single patient: a case series. *Blood Cancer Journal* [online]. 2019, **9**(3), 30 [cit. 2021-01-19]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/s41408-019-0193-9
- (68) CAPRIO, Cinzia, Antonio SACCO, Viviana GIUSTINI a Aldo ROCCARO. Epigenetic Aberrations in Multiple Myeloma. *Cancers* [online]. 2020, **12**(10), 2996 [cit. 2021-01-23]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12102996
- (69) MARTÍNEZ-BAÑOS, Déborah, Beatriz SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, Guadalupe JIMÉNEZ, Georgina BARRERA-LUMBRERAS a Olga BARRALES-BENÍTEZ. Global methylation and promoter-specific methylation of the P16, SOCS-1, E-cadherin, P73 and SHP-1 genes and their expression in patients with multiple myeloma during active disease and remission. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. 2017, **13**(5), 2442-2450 [cit. 2021-01-26]. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2017.4274
- (70) KARIMI, Mohsen, Sofia JOHANSSON, Dirk STACH et al. LUMA (LUminometric Methylation Assay)—A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Experimental Cell Research* [online]. 2006, **312**(11), 1989-1995 [cit. 2021-01-23]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2006.03.006
- (71) CHOWDHURY, Basudev, Il-Hoon CHO a Joseph IRUDAYARAJ. Technical advances in global DNA methylation analysis in human cancers. *Journal of Biological Engineering* [online]. 2017, **11**(1), 10 [cit. 2021-01-23]. ISSN 1754-1611. Dostupné z: doi:10.1186/s13036-017-0052-9
- (72) LISANTI, Sofia, Wan OMAR, Bartłomiej TOMASZEWSKI et al. Comparison of Methods for Quantification of Global DNA Methylation in Human Cells and Tissues. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(11), 79044 [cit. 2021-01-23]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0079044
- (73) WU, Hui-Chen, Lissette DELGADO-CRUZATA, Julie FLOM, Maya KAPPIL, Jennifer FERRIS, Yuyan LIAO, Regina SANTELLA a Mary TERRY. Global methylation profiles in DNA from different blood cell types. *Epigenetics* [online]. 2014, **6**(1), 76-85 [cit. 2021-01-23]. ISSN 1559-2294. Dostupné z: doi:10.4161/epi.6.1.13391
- (74) JONES, Peter A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2012, **13**(7), 484-492 [cit. 2021-01-25]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3230
- (75) DIMOPOULOS, K, P GIMSING a K GRØNBÆK. The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood Cancer Journal* [online]. 2014, **4**(5), 207-207 [cit. 2021-01-23]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2014.29
- (76) BAIN, Barbara, David CLARK a Bridget WILKINS. *Bone Marrow Pathology* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2019 [cit. 2021-01-23]. ISBN 9781119398929.
- (77) RÖLLIG, Christoph, Stefan KNOP a Martin BORNHÄUSER. Multiple myeloma. *The Lancet* [online]. 2015, **385**(9983), 2197-2208 [cit. 2021-01-23]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(14)60493-1
- (78) ŠTORK, Martin, Jitka VACULOVÁ, Luděk POUR, Viera SANDECKÁ, Zdeněk ADAM, Marta KREJČÍ a Zdeněk KRÁL. Novinky v léčbě mnohočetného myelomu. *Interní Med.* 2017, **19**(1), 20-22. ISSN 1803-5256. Dostupné z: doi:10.36290/int.2017.003

- (79) RAJKUMAR, S. a Shaji KUMAR. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer Journal* [online]. 2020, **10**(9), 94 [cit. 2021-01-23]. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/s41408-020-00359-2
- (80) ISSA, Mark E., Farnaz Sedigheh TAKHSHA, Chandra Sekhar CHIRUMAMILLA, Claudina PEREZ-NOVO, Wim VANDEN BERGHE a Muriel CUENDET. Epigenetic strategies to reverse drug resistance in heterogeneous multiple myeloma. *Clinical Epigenetics* [online]. 2017, **9**(1), 17 [cit. 2021-01-25]. ISSN 1868-7075. Dostupné z: doi:10.1186/s13148-017-0319-5
- (81) HEUCK, Christoph J., Jayesh MEHTA, Tushar BHAGAT et al. Myeloma Is Characterized by Stage-Specific Alterations in DNA Methylation That Occur Early during Myelomagenesis. *The Journal of Immunology* [online]. 2013, **190**(6), 2966-2975 [cit. 2021-01-23]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1202493
- (82) SIVE, Jonathan I., Andrew FEBER, Dean SMITH, John QUINN, Stephan BECK a Kwee YONG. Global hypomethylation in myeloma is associated with poor prognosis. *British Journal of Haematology* [online]. 2016, **172**(3), 473-475 [cit. 2021-01-27]. ISSN 00071048. Dostupné z: doi:10.1111/bjh.13506
- (83) BRUYER, Angélique, Ken MAES, Laurie HERVIOU et al. DNMTi/HDACi combined epigenetic targeted treatment induces reprogramming of myeloma cells in the direction of normal plasma cells. *British Journal of Cancer* [online]. 2018, **118**(8), 1062-1073 [cit. 2021-01-24]. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/s41416-018-0025-x
- (84) FERNÁNDEZ DE LARREA, Carlos, Beatriz MARTÍN-ANTONIO, María Teresa CIBEIRA et al. Impact of global and gene-specific DNA methylation pattern in relapsed multiple myeloma patients treated with bortezomib. *Leukemia Research* [online]. 2013, **37**(6), 641-646 [cit. 2021-01-25]. ISSN 01452126. Dostupné z: doi:10.1016/j.leukres.2013.01.013
- (85) WALKER, Brian A., Christopher P. WARDELL, Laura CHIECCHIO et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* [online]. 2011, **117**(2), 553-562 [cit. 2021-01-23]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-04-279539
- (86) VIZÁN, Pedro, Arantxa GUTIÉRREZ, Isabel ESPEJO et al. The Polycomb-associated factor PHF19 controls hematopoietic stem cell state and differentiation. *Science Advances* [online]. 2020, **6**(32), 2745 [cit. 2021-01-28]. ISSN 2375-2548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.abb2745
- (87) XIE, Zhigang a Wee Joo CHNG. MMSET: Role and Therapeutic Opportunities in Multiple Myeloma. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**, 636514 [cit. 2021-01-28]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/636514
- (88) KURDYUKOV, Sergey a Martyn BULLOCK. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* [online]. 2016, **5**(1), 3 [cit. 2021-01-23]. ISSN 2079-7737. Dostupné z: doi:10.3390/biology5010003
- (89) BECK, Stephan a Vardhman RAKYAN. The methylome: approaches for global DNA methylation profiling. *Trends in Genetics* [online]. 2008, **24**(5), 231-237 [cit. 2021-01-23]. ISSN 01689525. Dostupné z: doi:10.1016/j.tig.2008.01.006
- (90) MOHSEN, Karimi, Sofia JOHANSSON a Tomas EKSTRÖM. Using LUMA: a Luminometric-Based Assay for Global DNA-Methylation. *Epigenetics* [online]. 2006, **1**(1), 45-48 [cit. 2021-01-23]. ISSN 1559-2294. Dostupné z: doi:10.4161/epi.1.1.2587
- (91) POGRIBNY, Igor, Ping Yi a S. Jill JAMES. A Sensitive New Method for Rapid Detection of Abnormal Methylation Patterns in Global DNA and within CpG Islands. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1999, **262**(3), 624-628 [cit. 2021-01-23]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1999.1187
- (92) KARIMI, Mohsen, Karin LUTTROPP a Tomas EKSTRÖM. Global DNA Methylation Analysis Using the Luminometric Methylation Assay. TOLLEFSBOL, Trygve O., ed., Trygve TOLLEFSBOL. *Epigenetics Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, s. 135-144 [cit. 2021-01-23].

- Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-315-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-316-5_11
- (93) WANG, Xuan, Yan-Bin ZHU, Hai-Peng CUI a Ting-Ting YU. Aberrant promoter methylation of p15 INK4b and p16 INK4a genes may contribute to the pathogenesis of multiple myeloma: a meta-analysis. *Tumor Biology* [online]. 2014, **35**(9), 9035-9043 [cit. 2021-01-23]. ISSN 1010-4283. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-014-2054-2
- (94) HU, Jing a Nancy H. COLBURN. Histone Deacetylase Inhibition Down-Regulates Cyclin D1 Transcription by Inhibiting Nuclear Factor- κ B/p65 DNA Binding. *Molecular Cancer Research* [online]. 2005, **3**(2), 100-109 [cit. 2021-01-29]. ISSN 1541-7786. Dostupné z: doi:10.1158/1541-7786.MCR-04-0070
- (95) DASKALAKIS, Michael, Tudung T. NGUYEN, Carvell NGUYEN, Per GULDBERG, Gabriele KÖHLER, Pierre WIJERMANS, Peter A. JONES a Michael LÜBBERT. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* [online]. 2002, **100**(8), 2957-2964 [cit. 2021-01-29]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V100.8.2957
- (96) KRAVCHENKO, D.S., A.E. IVANOVA, E.S. PODSHIVALOVA a S.P. CHUMAKOV. PDLIM4/RIL-mediated regulation of Src and malignant properties of breast cancer cells. *Oncotarget* [online]. 2020, **11**(1), 22-30 [cit. 2021-01-29]. ISSN 19492553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.27410
- (97) BOUMBER, Yanis A., Yutaka KONDO, Xuqi CHEN et al. RIL , a LIM Gene on 5q31, Is Silenced by Methylation in Cancer and Sensitizes Cancer Cells to Apoptosis. *Cancer Research* [online]. 2007, **67**(5), 1997-2005 [cit. 2021-01-29]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3093
- (98) VANAJA, Donkena Krishna, Michael E. GROSSMANN, John C. CHEVILLE et al. PDLIM4, An Actin Binding Protein, Suppresses Prostate Cancer Cell Growth. *Cancer Investigation* [online]. 2009, **27**(3), 264-272 [cit. 2021-01-29]. ISSN 0735-7907. Dostupné z: doi:10.1080/07357900802406319
- (99) KRAVCHENKO, D. S., A. E. IVANOVA, E. S. PODSHIVALOVA a S. P. CHUMAKOV. PDLIM4/RIL-mediated regulation of Src and malignant properties of breast cancer cells. *Oncotarget* [online]. 2020, **11**(1), 22-30 [cit. 2021-01-29]. ISSN 19492553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.27410
- (100) SEIDL, Sonja, Jutta ACKERMANN, Hannes KAUFMANN, Andrea KECK, Thomas NÖSSLINGER, Christoph C. ZIELINSKI, Johannes DRACH a Sabine ZÖCHBAUER-MÜLLER. DNA-methylation analysis identifies the E-cadherin gene as a potential marker of disease progression in patients with monoclonal gammopathies. *Cancer* [online]. 2004, **100**(12), 2598-2606 [cit. 2021-01-29]. ISSN 0008543X. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.20295
- (101) BRAGGIO, Esteban, Angelo MAIOLINO, Maria E. GOUVEIA, Roberto MAGALHÃES, João T. SOUTO FILHO, Márcia GARNICA, Marcio NUCCI a Ilana Zalcborg RENAULT. Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma. *International Journal of Hematology* [online]. 2010, **91**(1), 87-96 [cit. 2021-01-29]. ISSN 0925-5710. Dostupné z: doi:10.1007/s12185-009-0459-2
- (102) GUILLERM, Gaëlle, Stéphane DEPIL, Darius WOLOWIEC a Bruno QUESNEL. Different prognostic values of p15(INK4b) and p16(INK4a) gene methylations in multiple myeloma. *Haematologica* [online]. 2003, **88**(3), 476-478 [cit. 2021-01-29]. Dostupné z: doi:10.3324/%x
- (103) STANGANELLI, Carmen, Jorge ARBELBIDE, Dorotea Beatriz FANTL, Claudia CORRADO a Irma SLAVUTSKY. DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Annals of Hematology* [online]. 2010, **89**(2), 191-199 [cit. 2021-01-29]. ISSN 0939-5555. Dostupné z: doi:10.1007/s00277-009-0818-3

- (104) NG, M.H.L., Y.F. CHUNG, K.W. LO, N.W.R. WICKHAM, J.C.K. LEE a D.P. HUANG. Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* [online]. 1997, **89**(7), 2500-2506 [cit. 2021-01-29]. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.v89.7.2500
- (105) IVY H. N., Wong, Ng MARGARET H. L., Lee JOSEPH C. K., Lo KWOK-WAI, Chung YUK-FEI a Huang DOLLY P. Transcriptional silencing of the p16 gene in human myeloma-derived cell lines by hypermethylation. *British Journal of Haematology* [online]. 1998, **103**(1), 168-169 [cit. 2021-01-29]. ISSN 00071048. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsovi&AN=edsovi.00002328.1998.10000.00025&lang=cs&site=eds-live&scope=site&authtype=shib&custid=s7108593>