

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium chromozómových a genových změn
u mnohočetného myelomu**

Diplomová práce

Bc. Klára Nevimová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Marie Jarošová, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího magisterského studia pod vedením paní prof. RNDr. Marie Jarošové, CSc. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne _____

Poděkování:

Na prvním místě bych ráda touto cestou poděkovala paní prof. RNDr. Marii Jarošové, CSc. za odborné vedení celé diplomové práce, její cenné rady, čas a trpělivost. Ráda bych také poděkovala za poskytnutí možnosti pracovat právě na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Dále bych ráda poděkovala paní RNDr. Mileně Holzerové, Mgr. Pavle Mičkové za seznámení s prací v laboratoři, za cenné rady a připomínky a také celému kolektivu laboratoře, který mě mezi sebe přijal. Ráda bych také poděkovala panu MUDr. Tomáši Pikovi, za vyhledání klinických dat pacientů a své rodině za podporu a zázemí.

Souhrn

Diplomová práce se zabývá studiem chromozomálních a genových změn u mnohočetného myelomu.

V teoretické části jsem se zabývala hemopoézou, problematikou mnohočetného myelomu, stádiem předcházející mnohočetný myelom (MGUS), chromozómovými a genovými změnami u mnohočetného myelomu a jejich klinickým významem. Dále jsem se zabývala použitými metodami.

Náplní experimentální části byla detailní cytogenetická analýza souboru 45 pacientů, se zaměřením na studium genových změn souvisejících s translokací genu pro těžký řetězec imunoglobulinů. Pro studium chromozómových a genových změn byly použity následující cytogenetické metody – klasická cytogenetická analýza, metoda FICTION, metoda FISH a metoda mFISH. Analýza souboru nemocných určila chromozómové změny u 44 (97,7 %) nemocných. Nejčastější změnou byla přestavba genu *IgH*, která byla určena u 31 nemocných, dále početní změny chromozómu 15 a zmnožení oblasti 1q21 u 20 pacientů, delece genu *RBI* u 19 nemocných, početní změny chromozómu 17 u 8 pacientů, změny v počtu kopií oblasti 1p36 a delece genu *TP53* u 5 nemocných. Práce potvrdila význam cytogenetické analýzy u nemocných s MM a MGUS.

Summary

This thesis deals with chromosomal and gene changes in multiple myeloma.

The main focus of the theoretical part is haemopoiesis, the issue of multiple myeloma, the stage preceding multiple myeloma (MGUS), chromosomal and gene changes in multiple myeloma, prognostic significance and methods which were used in the experimental part of this thesis.

The content of the experimental part was a detailed classic cytogenetic analysis of 45 patients, focused on a study of gene changes linked with immunoglobulin heavy-chain (*IgH*) translocation. The following methods were used for the cytogenetic study of chromosomal and gene changes – classic cytogenetic analysis, FICTION analysis, FISH analysis and mFISH analysis. Analysis of the examined group of patients has identified the chromosomal changes in 44 patients (97,7 %). The *IgH* translocation was the most common and was found in 31 patients, followed by the changes in the number of chromosome 15 and the amplification of the region 1q21 found in 20 patients, the deletion of the gene *RBI* in 19 patients, the changes in the number of chromosome 17 in 8 patients, the changes in the number of copies of the region 1p36 and the deletion of gene *TP53* in 5 patients. This thesis confirmed the importance of cytogenetic analysis in patients of MM and MGUS.

Obsah

1 ÚVOD.....	9
2 CÍL PRÁCE.....	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1 KRVETVORBA (HEMOPOÉZA)	11
3.1.1 Kostní dřev	12
3.1.2 Vývoj krevních buněk	13
3.1.2.1 Kmenová buňka krvetvorby	14
3.1.2.1.1 Pluripotentní kmenová buňka.....	14
3.1.2.1.2 Progenitorová kmenová buňka	15
3.1.2.2 Myelopoéza	16
3.1.2.3 Tvorba a vývoj červených krvinek (ERYTROPOÉZA).....	17
3.1.2.3.1 Normoblastová vývojová řada.....	17
3.1.2.4 Tvorba a vývoj bílých krvinek	18
3.1.2.4.1 Granulomonocytární vývojová řada	18
3.1.2.4.2 Lymfopoéza – tvorba lymfocytů	18
3.1.2.5 Tvorba krevních destiček (megakaryopoéza).....	21
3.2 MNOHOČETNÝ MYELOM (MM)	23
3.2.1 Epidemiologie.....	23
3.2.2 Patogeneze	24
3.2.2.1 Molekulární podstata tvorby protilátek na úrovni DNA a patogeneze MM	26
3.2.3 Klinické příznaky mnohočetného myelomu (MM).....	27
3.2.4 Diagnóza.....	28
3.2.5 Léčba	31

3.3 MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE NEJASNÉHO VÝZNAMU (monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS).....	34
3.4 Chromozómové a genové změny u MM	37
3.4.1 Aneuploidie	38
3.4.2 Abnormality chromozómu 13.....	39
3.4.3 Abnormality chromozómu 1.....	40
3.4.4 Delece <i>TP53</i> na chromozómu 17	41
3.4.5 Primární a sekundární IgH translokace	42
3.4.5.1 Translokace t(11;14).....	45
3.4.5.2 Translokace t(4;14).....	46
3.4.5.3 Translokace t(14;16).....	48
3.4.5.4 Translokace t(6;14).....	48
3.5 Klinický význam genetických změn	50
4 MATERIÁL A METODIKA	52
4.1 Kultivace buněk kostní dřeně (KD) pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření	52
4.2 Zpracování materiálu pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření .	54
4.3 MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETICKÉ METODY	57
4.3.1 Molekulárně cytogenetické vyšetření FISH s lokusově specifickými (LSI) a centromerickými sondami (CEP)	58
4.3.2 Metoda FICTION	65
4.3.3 Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH)	79
5 SOUBOR ANALYZOVANÝCH NEMOCNÝCH.....	82
5.1 Detailní analýza pacientů s MGUS a asymptomatický MM	85
5.2 Detailní analýza pacientů s MM.....	85
5.2.1 Přestavba genu <i>IgH</i> u pacientů s MM	90
5.2.1.1 Translokace t(4;14) u pacientů s MM	91
5.2.1.2 Translokace t(11;14) u pacientů s MM	112

5.2.1.3 Translokace t(14;16) u pacientů s MM	114
6 DISKUZE.....	116
7 Závěr.....	121
8 Seznam použitých zkratek.....	122
9 Seznam použité literatury	123

1 ÚVOD

Mnohočetný myelom je maligní B buněčné lymfoproliferativní onemocnění, které je v současné době druhým nejčastějším hemato-onkologickým onemocněním a tvoří asi 1 % všech onkologických onemocnění. Tomuto onemocnění předchází stádium zvané MGUS (monoklonální gamapatie nejasného významu).

Normální, zdravé plazmatické buňky podléhají apoptóze a kontrolním mechanismům těla. Jejich zhoubná proměna vede k proliferaci klonálních, dlouho žijících plazmatických buněk, které nepodléhají regulačním mechanismům lidského těla. Tyto myelomové plazmatické buňky produkují protilátku (monoklonální imunoglobulin – paraprotein), která není schopna člověka bránit proti infekcím.

V těchto plazmatických buňkách se zároveň hromadí chromozómové a genové změny, které jsou charakteristické pro toto onemocnění. U pacientů s mnohočetným myelomem se vyskytují primární a sekundární genetické změny. Primární genetické změny jsou přítomny již ve stádiu MGUS a řadíme mezi ně translokace genu *IgH*, trizomii chromozómů (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21) a delecí chromozómu 13. Sekundární genetické změny jsou často spojeny s progresí onemocnění. Patří mezi ně delece genu *TP53* a nadpočetná kopie oblasti 1q21.

Jedním z nejdůležitějších vyšetření, které poskytuje důležitou informaci o prognóze pacientů, je cytogenetické vyšetření. Studie, které byly prováděny v uplynulých letech, ukázaly, že specifické chromozómové aberace představují rozhodující prognostický faktor. Díky těmto vyšetřením můžeme pacienty rozlišit do tří prognostických skupin dle genových a chromozómových změn.

2 CÍL PRÁCE

- Shromáždění dostupných literárních zdrojů
- Vypracování rešerše na téma diplomové práce
- Praktické zvládnutí metody FICTION a FISH
- Studium genových změn souvisejících s translokací genu pro těžký řetězec imunoglobulinu s důrazem na variantní nálezy translokace t(4;14), t(11;14) a t(14;16) metodou FICTION. Provedení detailní genové analýzy translokace t(4;14) s použitím komerčních i BAC sond pro geny *WHSC1/MMSET* a *FGFR3* (chromozóm 4p16.3).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 KRVETVORBA (HEMOPOÉZA)

Hemopoéza neboli krvetvorba je proces vývoje buněčných krevních elementů v krvetvorných orgánech. Zahrnuje jak proliferaci buněk v hemopoetických orgánech, tak jejich vyzrávání a dodávání funkčně zralých krevních buněk do periferní (obvodové) krve (Faber *et al*, 2012). Krvetvorba člověka má 2 odlišné fáze, prenatální a postnatální.

Prenatální fáze se dále dělí na zárodečnou a fetální (Pecka, 2002). V průběhu nitroděložního života se krvetvorba plodu značně odlišuje od krvetvorby v poporodním období (Lexová *et al*, 2000). Prenatální krvetvorba začíná ve velmi raném těhotenství a dělí se na 3 období (Pecka, 2002):

- a) Období mezoblastové – Toto období začíná velmi časně po oplodnění (Lexová *et al*, 2000), a to mezi 14. a 19. dnem nitroděložního života (Pecka, 2002). Primitivní hematopoézu lze prokázat ve žloutkovém vaku. Probíhá tedy mimo vlastní plod (extraembryonálně). Ve stěně žloutkového vaku se diferencují ostrůvky mezenchymálních elementů – tzv. krevních ostrůvků a rozlišují se v nich 3 vrstvy. Endodermální – podporující růst; centrální – vrstva hemopoetických buněk, které se nakonec vyvíjejí v erytroblasty; endoteliální – vrstva obklopující krevní ostrůvky (Lexová, S. *et al*, 2000). Mimo vlastní zárodek se nejprve vytvářejí *pluripotentní kmenové buňky*, z nichž se postupně uskutečňuje tvorba ostatních buněk. Mezoblastové období trvá od 3. do 10. týdne nitroděložního života. V 6. týdnu se tvoří základ brzlíku, který je rovněž osídlován kmenovými buňkami krvetvorby, z nichž se postupně vyvíjejí mateřské buňky lymfocytů (Pecka, 2002).
- b) Období hepatolienální (jaterní) – Tvorba krevních elementů začíná v játrech mezi 5. a 6. týdnem vývoje. Mezi třetím a šestým měsícem jsou játra hlavním místem krvetvorby (Lexová *et al*, 2000). Období hepatolienální krvetvorby trvá až do porodu (Pecka, 2002).

- c) Období medulární (dřeňové) – Od 20. týdne nitroděložního života se krvinky začínají tvořit i v kostní dřeni (medulární krvetvorba) (Pecka, 2002). Krvetvorba nejprve začíná v klíčních kostech, později i v ostatních. Vznikají centrální dutiny vyplněné silně prokrvenou pojivovou tkání. Ta začne brzy obsahovat krvetvorné buňky. Poslední tři měsíce je dřeňová krvetvorba hlavním zdrojem erytrocytů a granulocytů. Mimo dřeňová krvetvorba úplně zaniká až po narození.

Krvetvorba po narození

Po narození je aktivní červená kostní dřeň ve všech kostech, která je postupně nahrazena tukovou tkání, a to hlavně v dlouhých kostech. Nejdéle se krvetvorba uchovává v obratlích a hrudní kosti. U zdravého jedince probíhá proces tvorby a zrání krevních elementů až do konce života v kostech (Lexová *et al*, 2000). Nejdůležitějším orgánem postnatální krvetvorby je kostní dřeň.

3.1.1 Kostní dřeň (KD)

Kostní dřeň je tkáň v dutinách kostí - tvoří 3,4-5,6 % tělesné hmotnosti člověka. Denně kostní dřeň produkuje na 1 kg tělesné hmotnosti 200 miliard erytrocytů, 70 miliard bílých krvinek a asi 100 miliard krevních destiček.

Po narození se nachází *aktivní červená krvetvorná kostní dřeň* ve všech kostech. Po 4. roce života je část krvetvorné tkáně nahrazena tkání tukovou (*inaktivní tukovou kostní dřeni*). U dospělého zdravého člověka je krvetvorná tkáň rozložena v kostech osového skeletu (v tělech obratlů, pánvi, lebce, žebrech, sternu, klíčcích, lopatkách, proximální $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{3}$ humerů a femurů). Množství aktivní KD v dlouhých kostech ubývá s pokračujícím věkem a je nahrazeno tkání tukovou. Nejdéle zůstává v dospělosti aktivní kostní dřeň v obratlích a hrudní kosti. Inaktivní (tuková KD) může být při zvýšených nárocích na krvetvorbu částečně aktivována.

Kostru kostní dřeně tvoří neurovaskulární síť a „retikulární“ buňky mezenchymového původu. Kostní dřeh dále obsahuje křvetvornou tkáň, podpůrnou tkáň, cévy, nervová vlákna, lymfatickou a tukovou tkáň. Podstatnou část kostní dřeně tvoří křvetvorná tkáň. Ta se skládá z kmenových buněk, mateřských (progenitorových) buněk jednotlivých řad, z prekursorů jednotlivých řad (červené, bílé a destičkové řady) a ze zralých křvinek.

Zralé křevní buňky prostupují z parenchymu kostní dřeně přes tenkou vrstvu endotelových buněk – *sinusoid*. Sinusoidy jsou tenké kapiláry, u kterých se sousední endotelové buňky překřvávají v různém rozsahu. Při přesunu zralých křevních buněk do obvodové křve se tento rozsah může měnit. Přechod křvinek do křve se děje různými mechanismy.

Červené křvinky po vypuzení jádra (ve stádiu retikulocyty), prochází díky své snadné formovatelnosti a pružnosti mezi endotelovými buňkami do drobných cév (kapilár) a poté do nitra cévy, kde opět získávají svůj tvar. Bílé křvinky prochází do cév aktivním pohybem, který se nazývá *diapedéza*. Křvinka vytvoří výběžek cytoplazmy, který se dostane mezi endotelové buňky a za ním se „propláží“ do cévy jádro. Dozřívající křevní destičky pomocí výběžků megakaryocytů prorůstají mezi endotelovými buňkami do nitra cév a protékající křev z nich uvolňuje a odplovuje trombocyty (Pecka, 2002).

3.1.2 Vývoj křevních buněk

Vývoj křevních buněk probíhá v kostní dřeni od kmenových buněk přes buňky progenitorové, až po velmi diferencované buňky, které se účastní transportu křsíliku (erytrocyty), procesů srážení křve (trombocyty) a obranyschopnosti organizmu (lymfocyty, monocyty, granulocyty). V kostní dřeni jsou stovky miliard křevních buněk, z tohoto počtu jen malou část tvoří *kmenové buňky* (Pecka, 2002).

3.1.2.1 Kmenová buňka krvetvorby

Výchozí buňkou všech krvinek je buňka *mezenchymu*, která se diferencuje v *retikulární buňku* a ta se pak stává základem nosného systému pro krvinky. Mění se v *hemocytoblast*, který se stává v zárodečném období *kmenovou buňkou*. Během života organismu probíhá v řadě tkání, tedy i v kostní dřeni, neustálá obnova již opotřebovaných buněk, které jsou nahrazovány buňkami novými. Rozsáhlý proces obnovy buněk závisí na početně malé populaci *hemopoetických kmenových buněk* (*Hemopoetic Stem Cell – HSC*). Kmenové buňky jsou schopny dlouhodobé obnovy krvetvorby a mají dvě základní vlastnosti, schopnost sebeobnovy a schopnost diferencovat do všech dalších typů buněk krvetvorby (Pecka, 2002).

Všechny krvinky v obvodové krvi mají po narození i v dospělosti jedince, jedinou společnou hemopoetickou tzv. *pluripotentní kmenovou buňku*, která se v rámci hemopoézy může vyvíjet jakýmkoli směrem, tj. v mateřské buňky (červené krvinky, bílé krvinky a krevní destičky). *Totipotentní kmenová buňka* je schopna vyvíjet se v kteroukoli buňku organismu. Podle současných studií o diferenciaci kmenových buněk je pluripotentní kmenová buňka v porovnání s totipotentní kmenovou buňkou již buňka částečně diferencována (Pecka, 2002).

3.1.2.1.1 Pluripotentní kmenová buňka

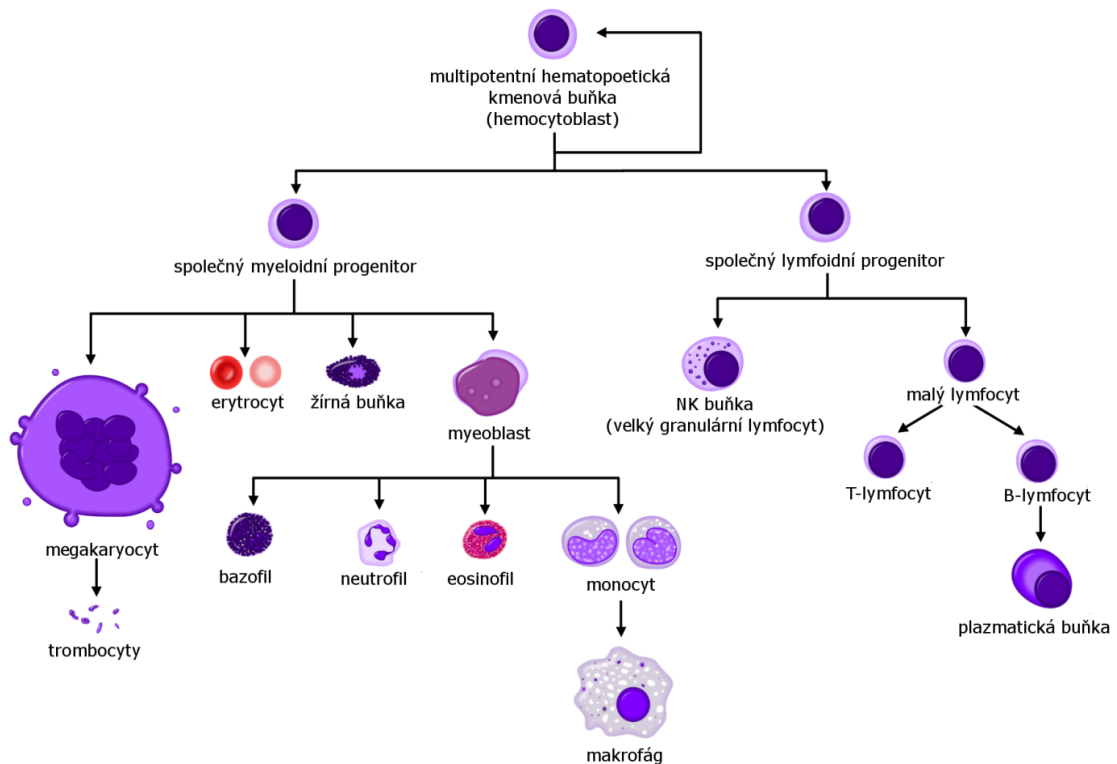
Pluripotentní kmenové buňky jsou *mononukleární buňky*, o velikosti 7-10 μm a mají jemně rozpletený chromatin. V jádru jsou viditelná 1-3 jádérka (Faber *et al*, 2012). Na povrchu buněk je navázána řada antigenů, z nichž některé chybí na diferencovaných progenitorových buňkách. Pluripotentní kmenové buňky nesou antigen CD34 a postrádají specifické znaky specifické pro jednotlivé krevní řady – CD38. Z kmenové pluripotentní buňky vznikají v průběhu několika prvních dělení buňky, které jsou schopny se množit *in vitro* a dát vzniku dlouhodobé kultuře krvetvorných buněk, tzn. *LTC-IC* (*Long-Term Culture-Initiating Cell*). Dalším

dělením a diferenciací vznikají z těchto buněk progenitorové buňky. Při mitóze se většinou jedna dceřiná buňka diferenciuje dál, kdežto druhá zůstává kmenovou buňkou (Pecka, 2002).

3.1.2.1.2 Progenitorová kmenová buňka

Progenitorové kmenové buňky jsou schopny diferenciaci do jedné či více krevních řad. Tyto buňky nemají schopnost sebeobnovy a jsou citlivé na růstové faktory. Progenitorové kmenové buňky značíme CFU – *Colony Forming Unit*. Progenitorové kmenové buňky jsou již určené pro jednu nebo více krevních řad, např: CFU-E (Erythrocyte) a BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) pro červenou řadu; CFU-GEMM (Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte) pro buňky myelopoézy; CFU-GM (Granulocyte Macrophage) pro granulocytární a makrofágovou řadu; CFU-N (Neutrophile) pro neutrofilní řadu; CFU-Eos (Eosinophile) pro eozinofilní řadu; CFU-Baso (Basophile) pro bazofilní řadu; CFU-M (Macrophage) pro monocytární řadu a CFU-Meg (Megakaryocyte) pro megakaryocytární řadu (Faber et al, 2012).

Obrázek č. 1: Zjednodušené schéma hematopoézy (převzato: <http://cs.wikipedia.org/>, 2014).



3.1.2.2 Myelopoéza

Myelopoéza zahrnuje vývoj části bílé řady (myeloidní buňky), červené (erytroidní řady) a destičkové (megakaryocytové řady). Krevní elementy, jako jsou erytrocyty, granulocyty, monocyty a trombocyty, mají svůj původ v pluripotentní kmenové buňce a ve vlastní mateřské (progenitoreové) buňce CFU-GEMM (Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte). Při diferenciaci buněk myelopoézy dochází ke změnám v cytoplazmě a v jádře. V cytoplazmě dochází ke ztrátě bazofilie cytoplazmy a v cytoplazmě granulocytů se nachází specifická granula (neutrofilní, eozinofilní a bazofilní). Ke změnám v jádře patří vypuzení jádra u červené řady, u granulocytů se jádro zahušťuje a chromatin ztrácí jemné uspořádání a tvar jádra (původně kulatý či oválný) se postupně mění na členitý (Faber *et al*, 2012).

3.1.2.3 Tvorba a vývoj červených krvinek (ERYTROPOÉZA)

Erytropoéza je proces, ve kterém se tvoří a vyvíjejí červené krvinky v červené (erytroidní) vývojové řadě. Nejdříve se tvoří z nediferencovaných kmenových buněk prekursorů, které obsahují jádro. Vypuzením nebo fragmentací jádra vznikají retikulocyty, které během 2 dnů vyzrávají na erytrocyty. Řízení červené krvetvorby se děje pomocí hormonu erytropoetinu (Pecka, 2002).

3.1.2.3.1 Normoblastová vývojová řada

Během několika dní vznikají erytrocyty z erytroidních kmenových buněk. Počet buněčných dělení, kterým projde buňka v průběhu erytropoézy se odhaduje na 5-7. Erytroidní progenitorové kmenové buňky (BFU-E, CFU-E) dávají pak vzniknout buněčným vývojovým formám (prekursorům), z nichž první morfologicky odlišitelnou buňkou je proerytroblast. Ten přechází postupně až do stádia erytrocytu. Vývojová řada erytrocytu začíná proerytroblastem, následuje bazofilní normoblast, polychromní normoblast, ortochromní normoblast, retikulocyt a konečným stádiem je erytrocyt. Při vyzrávání buněk červené krevní řady dochází k řadě biochemicko – morfologickým změn. Retikulocyt je důležitým mezistádiem mezi jaderným erytroblastem a zralým erytrocytem. Retikulocyt je vlastně malý erytrocyt o velikosti 7-9 μm , u kterého zůstávají v cytoplazmě po vypuzení jádra zbytky původní struktury některých organel (Pecka, 2002). Erytrocyt je malá bezjaderná krvinka, které má bikonkávní tvar. Její velikost je 6,7-7,7 μm a je bezjadernou buňkou (Faber *et al*, 2012).

3.1.2.4 Tvorba a vývoj bílých krvinek

3.1.2.4.1 Granulomonocytární vývojová řada

V granulomonocytární řadě se tvoří granulocyty (neutrofilní, eozinofilní a bazofilní) a monocyty (makrofágy a histiocyty). Mateřskou buňkou této řady je progenitorová buňka CFU-GM. Od stádia této buňky je dále oddělují 4 vývojové linie (neutrofilní, eozinofilní, bazofilní a monocytová). První buňkou granulomonocytární vývojové řady je myeloblast, dále promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, nesegmentovaný granulocyt a segmentovaný granulocyt (neutrofilní, eozinofilní a bazofilní segment). U vývojové linie monocytů je první buňkou monoblast, další buňkou promonocyt a monocyt, který je posledním stádiem (Pecka, 2002).

3.1.2.4.2 Lymfopoéza – tvorba lymfocytů

Lymfopoéza zahrnuje produkci lymfoidních krevních buněk (Pecka, 2002). Morfologie lymfoidních buněk pouze v některých případech umožňuje jejich dostatečnou identifikaci, která je jednoznačně daná expresí povrchových a intracytoplazmatických antigenů, popřípadě expresí nebo přeskupením genů. V přesné diagnostice lymfoidních malignit je proto funkce imunofenotypizace nádorových elementů nezastupitelná. Morfologicky odpovídají T-lymfocyty, ale i B-lymfocyty tzv. malým lymfocytům. Lymfoblasty, plazmoblasty a proplazmocyty lze za normálních okolností zachytit pouze v kostní dřeni, a to výjimečně. V lymfatických uzlinách lze mezi přítomnými lymfoidními elementy zachytit také tzv. centrocyty, centroblasty a imunoblasty (Faber *et al*, 2012).

Lymfocyty se tvoří z mateřských lymfoidních kmenových buněk, které dávají vznik lymfocytům, ale také jiným krevním elementům. Lymfopoéza probíhá v lymfatické tkáni (primární a sekundární). Primárními lymfatickými tkáněmi jsou

kostní dřeň, ve které zrají B-lymfocyty a thymus, který umožňuje zrání T-lymfocytů. Mezi sekundární lymfatické orgány řadíme lymfatické uzliny, slezinu, lymfatické tkáně ve sliznicích a tonzily. Celkové množství lymfatické tkáně u dospělých tvoří asi 1 % tělesné hmotnosti. V primární lymfatické tkáni se vytváří progenitorové lymfoidní buňky, které dále vyžívají a dávají vzniknout B-lymfocytům. Prothymocyty přestupují z kostní dřeně prostřednictvím cirkulace krve do thymu a zrají v T-lymfocyty. Tento proces dozrání přečká asi jen 1-2% prothymocytů. Z kostní dřeně a thymu přechází B a T-lymfocyty a také NK buňky do krve a následně do sekundárních lymfatických orgánů. Po svém vzniku se lymfocyty dostávají do cirkulace a odtud do lymfatických uzlin a tkání (Pecka, 2002).

B-lymfocyty

B-lymfocyty se u člověka tvoří ve fetálním období v játrech a v dospělosti v kostní dřeni. Nacházejí se především na povrchové vrstvě lymfatických uzlin a sleziny, v lymfoidní tkáni zažívacího ústrojí, rozptýlené jsou i v kostní dřeni a obvodové krvi. V tkáních (lymfatických uzlinách, slezině, mandlích apod.) osídlují B-lymfocyty tzv. D-dependentní oblasti a vytváří kulatá zárodečná centra – folikuly. Většina B-lymfocytů přežívá jen 10-20 dní (Pecka, 2002).

Vazba antigenu na specifický receptor B-lymfocytů:

Po aktivaci antigenem proběhne další vývoj buňky, který vede k terminální diferenciaci B-lymfocytů a k produkci specifických paměťových a plazmatických buněk zajišťujících imunitní ochranu organismu. B-lymfocyty dávají po dostatečné aktivaci specifickým antigenem vznik buňkám, které tvoří v organismu protilátky (říkáme jim *plazmocyty – plazmatické buňky*). Jednotlivá stádia po aktivaci specifickým antigenem jsou plazmoblast, proplazmocyt a plazmocyt.

Plazmoblast má průměr 16 μm . Jádro je velké, kulaté s 1 nebo více jadérky. V cytoplazmě nejsou přítomna žádná zrna, ani vakuoly.

Proplazmocyty mají průměr 20-25 μm . Jádro je uloženo centrálně až excentricky. Chromatin jádra má výraznou strukturu s rozeznatelnými 1-4 jadérky. Cytoplazma je šedomodrá s vakuolami.

Plazmocyty představují konečné stádium B-lymfocytu do efektorových buněk. Po antigenní stimulaci přechází nejprve B-lymfocyt do blastického stádia, pak se vyvíjí do buňky plazmatické (Lexová *et al.*, 2000). Plazmocyty mají vzhled oválný nebo kulatý. Jeho průměr je 14-20 μm . Jádro je malé hutné, uloženo excentricky a kolem jádra je projasnění. Chromatin jádra je hustý a uspořádaný do trámčů. Cytoplazma je tmavomodrá až modrofialová. Vakuolizace může dávat buňce až pěnovitý vzhled. Endoplazmatické retikulum může vytvářet hroznovité útvary tzv. *Russelova tělíska*. Zastoupení v kostní dřeni je 0,01-0,05 (Pecka, 2002).

Plazmatické buňky mají význam u humorální imunity. Produkují specifické protilátky na bázi imunoglobulinů. Imunitní systém je schopný pomocí protilátek rozlišit 10^6 - 10^8 rozdílných antigenních determinantů. Specifita protilátky odpovídá receptoru, který navázal daný antigen. Tyto protilátky se vážou na antigeny, které jejich tvorbu vyvolaly. Komplex antigen - protilátka je následně destruován fagocyty. Plazmocyty bývají uloženy okolo vaziva v lymfatických uzlinách a tkáních. V plazmocytech můžeme nalézt i krystalické útvary. Jsou známy i Mottovy buňky, které jsou naplněny Russelovými tělísky a jsou totožné s „grape cells“. Plazmocyty žijí poměrně krátce (3-4 dny). Některé plazmatické buňky mají 2-3 jádra. Pouze asi 3 % nezralých lymfocytů, vytváří paměťové buňky, které u člověka přežívají až několik desetiletí (Pecka, 2002).

T-lymfocyty

T-lymfocyty jsou modifikované thymem. Při zrání se lymfocyty přesunují hlouběji do kůry a poté hlouběji do dřene thymu. Ve dřeni získávají lymfocyty

povrchové a cytoplazmatické markery a jejich morfologie a fenotyp jsou pak identické se zralými periferními T-lymfocyty (Pecka, 2002).

NK buňky

NK buňky jsou buňky, které nemohou být identifikované jako T a B-buňky nebo monocyty. Jsou schopny působit cytotoxicky na buňky infikované viry nebo buňky nádorové a další buňky, které mají na svém povrchu xenoantigeny. Jedním z úkolů je vyhledávat a ničit buňky s nedospělými a nedokonalými povrchovými bílkovinami (Pecka, 2002).

3.1.2.5 Tvorba krevních destiček (megakaryopoéza)

Krevní destičky vznikají v kostní dřeni fragmentací nebo odštěpováním periferní cytoplazmy megakaryocytů (Pecka, 2002).

Megakaryocyty vznikají z pluripotentní kmenové buňky, podobně jako ostatní typy dřeňových buněk. Zrání megakaryocytu je stimulováno celou řadou faktorů. První morfologicky rozlišitelnou buňkou této řady je megakaryoblast. Je to buňka nejvýše diploidní a prochází opakovaně atypickou mitózou, při které dochází ke zmnožení jaderného materiálu (polyploidii). Během zrání megakaryocytů nově vytvořená membrána ohraničuje periferní části cytoplazmy, které se uvolňují v podobě krevních destiček. Na obvodě zralých megakaryocytů se pak tvoří hnízda oddělujících se trombocytů.

Polyploidní megakaryocyty (zhruba od 8 n) mohou tvořit krevní destičky. Ze zralého megakaryocytu se může vytvořit až několik tisíc krevních destiček (2-4 tisíce). K tvorbě destiček dochází v kostní dřeni nebo v plicní tkáni. Krevní destičky mohou vznikat z megakaryocytů dvěma způsoby. Jedním z nich je tvorba pseudopodií a následná fragmentace. Další způsob je přímý rozpad megakaryocytů.

Regulace trombopoézy je závislá na trombopoetinu (TPO) a několika dalších endogenních faktorech (Pecka, 2002).

3.2 MNOHOČETNÝ MYELOM (MM)

Mnohočetný myelom (MM) je maligní B buněčné lymfoproliferativní onemocnění charakteristické proliferací klonálních, dlouho žijících plazmatických buněk v kostní dřeni (Anderson *et Carrasco*, 2011), osteolytických lézí ve skeletu a přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig) v séru nebo moči (Hájek *et al*, 2011). Monoklonální imunoglobuliny a další cytokiny způsobují neobyčejně pestré a různě intenzivně vyjádřené příznaky onemocnění (Adam *et al*, 2001).

3.2.1 Epidemiologie

MM tvoří asi 1 % všech onkologických onemocnění, ale 10 % všech hematologických onemocnění (Hájek *et al*, 2011). Je druhým nejčastějším hemato-onkologickým onemocněním po ne-hodgkinských lymfomech (Bahlis *et al*, 2006). Medián věku onemocnění u mužů je asi 62 let a u žen 61. Pouze 2 % pacientů jsou mladší 40 let. V USA každý rok přibude 20 000 nových pacientů, u kterých se potvrdí onemocnění mnohočetný myelom.

Incidence onemocnění se pohybuje v různém rozmezí ve světě. V Číně je 1 nemocný na 100 000 obyvatel, ve většině rozvinutých zemí asi 4 nemocní na 100 000 obyvatel (Raab *et al*, 2009). V ČR je incidence MM u mužů 2,62 a u žen 2,55/100 000 obyvatel. Jde o nemoc starších lidí. Ve věkové kategorii 75-79 let je incidence tohoto onemocnění 15,57/100 000 obyvatel. U mladých lidí (ve věku 20-40 let) se tato choroba vyskytuje vzácně (Adam *et al*, 2001). Onemocnění se častěji vyskytuje u mužů než u žen. Medián přežití při konvenční léčbě je 3-4 roky. Poté může následovat autologní transplantace kmenových buněk, ta může rozšířit medián přežití na 5-7 let (Raab *et al*, 2009).

3.2.2 Patogeneze

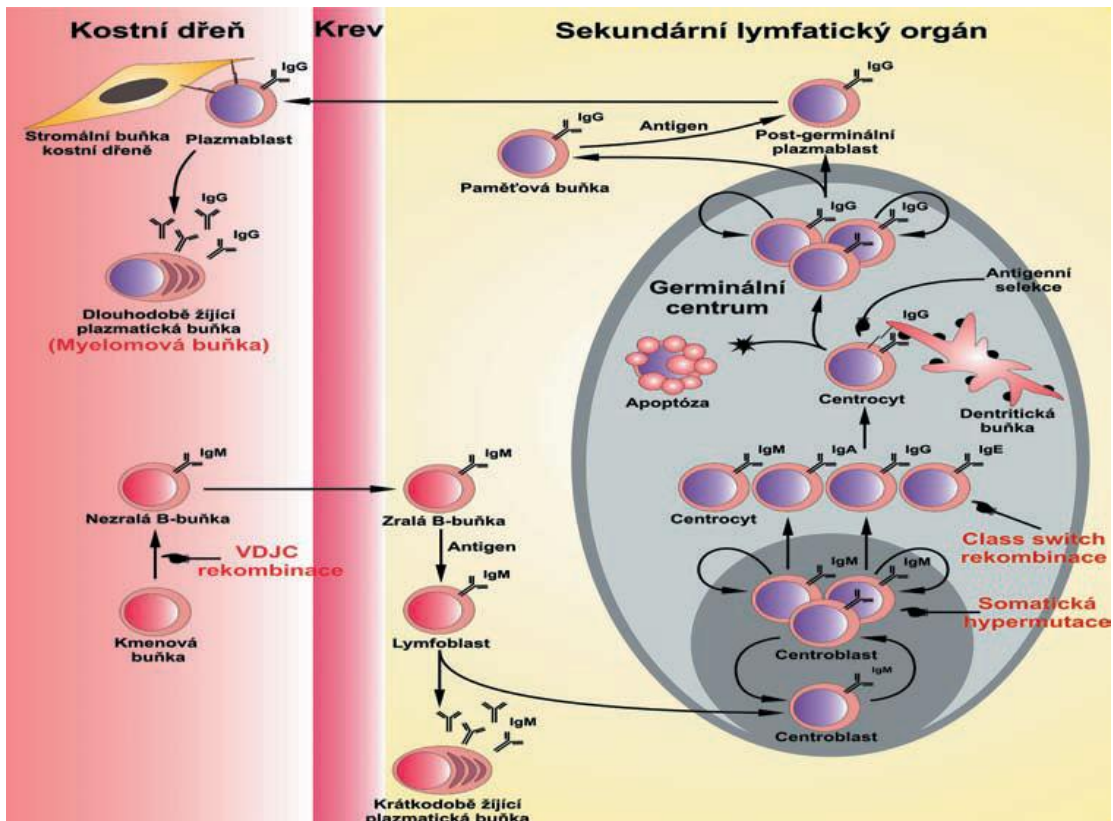
Vývojová řada B-lymfocytu končí plazmatickou buňkou, která je konečnou diferenciovanou, nedělící se buňkou, která produkuje specifické protilátky. Z počátku vytvořené plazmatické buňky nemají somaticky mutované imunoglobulinové geny. Tyto buňky žijí krátkou dobu a podléhají apoptóze. Podstatou MM je maligní mutace na úrovni B-lymfocytu ve folikulu lymfatické tkáně (Adam *et al*, 1999), klonální proliferace a akumulace z něho vzniklé populace plazmatických buněk v kostní dřeni (Němec *et al*, 2008). V patogenních myelomových buňkách jsou detekovány četné genové aberace. Proteiny, které jsou díky těmto změnám produkovány buňkou, způsobují její maligní chování - přežití, migraci, její růst a rezistenci k chemoterapii (Raab *et al*, 2009).

Naivní zralý B-lymfocyt opouští kostní dřeň a směřuje do lymfatické uzliny, kde svůj vývoj dokončí. Po setkání s antigenem se naivní folikulární B-lymfocyt diferenciuje na krátce žijící plazmatickou buňku, která není somaticky hypermutovaná a podléhá apoptóze. Tyto buňky se uplatňují v primární buněčné odpovědi. Po setkání naivního B-lymfocytu s antigenem může dojít k diferenciaci na centroblast. Centroblast migruje do terminálního centra lymfatické uzliny. Během vývoje centroblastu na centrocyt dochází k somatické hypermutaci a „class switch rekombinaci“, které jsou dalším zdrojem variability protilátek. Z centrocytu se dále vyvíjí paměťové B-buňky, které se uplatňují během sekundární imunitní odpovědi (Balcárková, 2009) nebo post-germinální plazmoblast, ze kterého se v dalších stádiích vyvíjí myelomová plazmatická buňka. Plazmoblast migruje zpátky do kostní dřene, ve které stromální buňky umožní pomocí IL-6 jeho diferenciaci na dlouho žijící plazmatickou buňku. Sekvence genu imunoglobulinů v plazmatických buňkách MM jsou somaticky hypermutovány a tento stav zůstává konstantní po celý klinický průběh onemocnění. Z toho vyplývá, že plazmatické buňky MM vznikají z post – GC B-lymfocytů (lymfocytů postgerminálního centra - Anderson *et Carrasco*, 2011).

Nádorové buňky MM produkují protilátku, někdy jen její část, která se nazývá monoklonální imunoglobulin nebo též paraprotein. Imunoglobuliny mají člověka chránit před infekcí, ale monoklonální imunoglobulin toho není schopen. Množství

této chorobné protilátky souvisí také s aktivitou onemocnění. Pacienti s MM mají různě velký nedostatek normálních funkčních protilátek a je u nich oslabena tvorba nových protilátek při setkání s infekcí (Adam *et al*, 2001). Vývojová řada myelomových buněk se liší od fyziologického procesu maturace plazmoblastů a plazmocytů nekontrolovatelnou proliferací a dále dlouhověkostí terminální myelomové buňky. Fyziologické plazmocyty se vyčerpají přibližně po dvou dnech produkci gamaglobulinů a podléhají apoptóze (programované buněčné smrti). Myelomové buňky jsou na rozdíl od fyziologických plazmocytů téměř nesmrtné. Maligní buňky mají velice nestabilní genom a v průběhu nemoci v něm dochází k dalším mutacím a chromozómovým změnám. Tyto změny umožňují autonomní růst, který je nezávislý na stromatu kostní dřeně. Proto přechod původní čistě kostní proliferace do mimokostního růstu je negativním prognostickým znamením (Adam *et al*, 1999).

Obrázek č. 2: Model vzniku dlouho žijících plazmatických buněk a původ buněk mnohočetného myelomu (upraveno dle: Němec *et al*, 2008).



3.2.2.1 Molekulární podstata tvorby protilátek na úrovni DNA a patogeneze MM

B buňky během svého vývoje prodělávají tři procesy modifikace DNA v *IgH* genu. Jsou to: VDJC rekombinace, somatická hypermutace a tzv. „class switch rekombinace“. Gen pro těžký řetězec imunoglobulinů se skládá z mnoha genových segmentů označovaných jako „V, D, J a C“. Genovým segmentem se v tomto případě myslí krátká nukleotidová sekvence.

Fab doména je zásadní ve schopnosti protilátky rozpoznávat určitý antigen. Schopnost B buněk rozpoznat jen určité typy antigenů je také založena i na stanovení unikátní kombinace těchto V, D a J segmentů. C segmenty kódují konstantní oblasti těžkých řetězců a rozhodují tak, do které z 5 izotypových tříd (IgM, IgD, IgG, IgA nebo IgE) bude vznikající imunoglobulin zařazen. Celý proces modifikace DNA se označuje jako tzv. VDJC rekombinace.

Druhým procesem modifikace DNA v B buňkách je tzv. somatická hypermutace, která probíhá v terminálních centrech sekundárních lymfoidních folikulů. Při somatické hypermutaci dochází k náhodným bodovým mutacím v nukleotidové sekvenci DNA kódující variabilní oblast imunoglobulinového řetězce.

V germinálním centru B buňky podstupují třetí typ modifikace. Z hlediska patogeneze MM je nejzásadnějším procesem modifikace DNA tzv. „class switch rekombinace“. Ta může proběhnout dvojím způsobem, a to legitimně (fyziologicky) a nelegitimně (patologicky). Samotná „class switch rekombinace“ se uskutečňuje mezi tzv. switch regiony. Switch regiony jsou 1-3 Kbp dlouhé sekvence DNA, které jsou tvořeny tandemovými repetitivy.

Legitimní switch rekombinace je fyziologická. Uskutečňuje se mezi dvěma switch regiony a dochází při ní k tvorbě fúzní switch sekvence, která se skládá z DNA od obou zúčastněných switch regionů. Zároveň dochází ke ztrátě všech segmentů přítomných mezi oběma switch regiony, které se rekombinace účastní. Vzniká

tzv. deleční smyčka, všechny segmenty přítomné v této smyčce jsou z genomu buňky nenávratně ztraceny.

Nelegitimní switch rekombinace je patologickou rekombinací. Uskutečňuje se mezi jedním samostatným switch regionem (na jedné straně) a jinou molekulou DNA, nikoli však jiným switch regionem. Jinou molekulou DNA může být v tomto případě kterýkoliv chromozóm, kromě chromozómu 1 (Němec *et al*, 2008). Pokračování nelegitimní switch rekombinace viz kapitola 3.4.5 Primární a sekundární IgH translokace.

3.2.3 Klinické příznaky mnohočetného myelomu (MM)

Mezi nejčastější prvotní příznaky MM patří únava, bolest kostí a opakující se infekce (Kyle *et Rajkumar*, 2004). Hyperkalcémie je přítomná u mnoha pacientů, stejně jako zhoršení funkce ledvin. Postižení kostí je typické pro dlouhé kosti (stehenní a pažní), lebku a páteř, ve které vznikají fraktury obratlů. Občas se u pacientů vyskytuje osteoporóza, která může být známkou MM. Onemocnění může začít asymptomaticky a může být diagnostikováno na základě bližšího vyšetření, a to např. při vysoké sedimentaci. Při symptomatickém MM jsou v kostní dřeni přítomny maligní plazmocyty (Hájek *et al*, 2011).

Příznaky MM můžeme rozdělit do tří skupin. První skupinou příznaků MM jsou ty, které jsou vyvolané monoklonálním imunoglobulinem. Patří sem např. myelomová nefropatie, která je způsobena převážně lehkými monoklonálními řetězci. Dále porucha srážení krve, která může způsobit vážné komplikace při operaci nebo úrazu. Monoklonální imunoglobulin nemusí narušovat srážení krve jen vlivem na krevní destičky, ale může zasahovat i do koagulační kaskády. Druhá skupina příznaků je způsobena cytokiny myelomových buněk. Do této skupiny řadíme příznaky jako je bolest kostí, časté infekce a horečky (vznikající díky neschopnosti organismu tvořit funkční gamaglobuliny), celková slabost, nevykonnost a dušnost. Poslední skupinou jsou méně časté příznaky, kam řadíme syndrom zvýšené kapilární propustnosti, kardiální příznaky při MM, plazmacelulární pleurální výpotek,

metabolické poruchy (nejčastější metabolickou poruchou je hyperkalcémie a hyperurikemie) a kožní projevy MM (Adam *et al*, 2001).

3.2.4 Diagnóza

Diagnóza MM se snadno provádí na základě typické morfologie kostní dřeně (přítomnosti více než 10% maligních plazmocytů), přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu v séru (nejčastěji IgG a IgA) nebo v moči (lehké řetězce) a typických osteolytických lézí (Hájek *et al*, 2011).

Vyšetření pacienta s podezřením na MM by měla zahrnovat screeningové testy a další testy pro potvrzení diagnózy (Bird *et al*, 2011). Mezi prvními testy, které se při podezření na MM provádí je radiografické vyšetření skeletu (zaměřené na bolestivé oblasti), sedimentace erytrocytů, kompletní krevní obraz, koncentrace celkové bílkoviny a albuminu v séru, koncentrace urey, kreatininu, elektrolytů včetně kalcia v séru, standardní gelová elektroforéza bílkovin séra, kvantitativní vyšetření normálních imunoglobulinů a vyšetření přítomnosti lehkých řetězců v moči. V případě přítomnosti klinických příznaků a pozitivitu některého z klíčových laboratorních parametrů je nutno nemocného odeslat bezprostředně na specializované hematologické či onkologické pracoviště. Rozsah vyšetření prováděných na specializovaných pracovištích umožňujících potvrzení diagnózy mnohočetného myelomu a stanovení stádia i prognózy nemoci. Mezi specializovaná vyšetření řadíme hematologické vyšetření, základní biochemická vyšetření, speciální vyšetření bílkovin, zobrazovací vyšetření (magnetická rezonance, počítačová tomografie), morfologická a další specializovaná vyšetření kostní dřeně (cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření – FISH, multiparametrická průtoková cytometrie) (Masopust *et al*, 2012).

Diagnostika MM by měla být provedena za použití kritérií, která byla navržena v roce 2003 Mezinárodní myelomovou skupinou. Kritéria se liší mezi mnohočetným myelomem a stádiem, které mnohočetnému myelomu předchází - MGUS (Bird *et al*, 2011). Kvůli možnému kontinuálnímu přechodu mezi MGUS a MM bylo nutno vytvořit kritéria, jejichž cílem je rozlišit MGUS od MM a dalších stavů. V minulosti

byla nejpoužívanější kritéria dle Durieho a Salmona (viz tabulka č. 1) z roku 1975. Rozdělení stádií na I – III odráží rozsah nádorové masy v organizmu a pokročilost onemocnění, ale nemá žádný vztah k prognóze onemocnění. V roce 2003 byla nahrazena kritérii International Myeloma Working Group – IMWG (viz tabulka č. 2). Tato kritéria již používají nejen celkový počet plazmocytů, ale vyžadují pro stanovení příslušné diagnózy i průkaz jejich klonality na základě kappa nebo lambda restrikce (Masopust *et al*, 2012).

Důležité je i odlišení asymptomatického a symptomatického stádia onemocnění. Rozdělení má zásadní praktický význam pro praxi. Při stanovení diagnózy „asymptomatický MM“ lékař jasně říká, že se nemocný nebude léčit. Označení „symptomatický MM“ naopak znamená nutnost zahájení léčby.

Tabulka č. 1: Stádia dle Durieho a Salmona a podmínky pro jejich splnění (převzato: www.myeloma.org, 2014).

stádium MM	I. stádium	II. stádium	III. stádium
koncentrace hemoglobinu	> 100 g/l	nejsou splněny podmínky I. ani III. stádia	< 85 g/l
koncentrace Ca	do 3 mmol/l		nad 3 mmol/l
kostní ložiska	normální kostní struktura nebo solitární kostní ložisko plazmocytomu		více než 3 osteolytická ložiska
koncentrace M-Ig	Relativně nízká koncentrace M-Ig: <ul style="list-style-type: none"> - M-IgG < 50 g/l - M-IgA < 30 g/l - exkrece lehkých řetězců v moči do 4 g/24 hod 		Vysoká koncentrace M-Ig: <ul style="list-style-type: none"> - M-IgG > 70 g/l - M-IgA > 50 g/l - vyloučení více než 12 g lehkých řetězců moče za 24 hodin

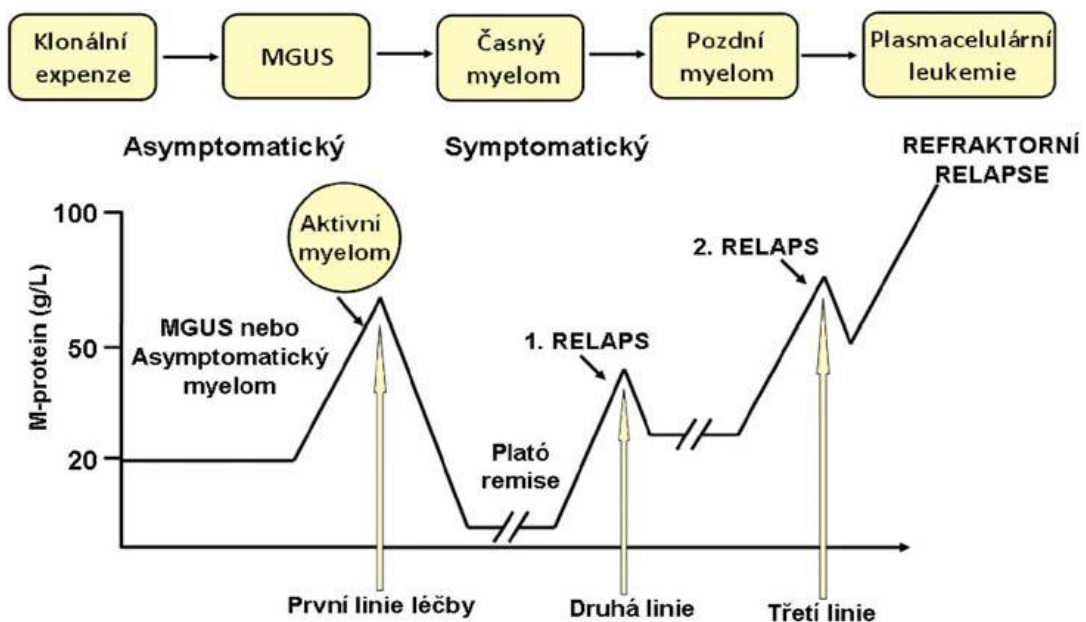
Tabulka č. 2: Mezinárodní prognostický index pro MM a podmínky pro splnění jednotlivých stádií (Greipp, 2005; Masopust *et al*, 2012).

Klinické stádium	Beta ₂ -mikroglobulin (mg/l)	Albumin (g/l)
I	< 3,5	≥ 35
II	< 3,5 nebo 3,5 – 5,5	< 35 nebo ≥ 35
III	> 5,5	

3.2.5 Léčba

V současné době neexistuje žádný důkaz, který by potvrdil, že léčba pacientů s asymptomatickým MM prodlužuje přežití ve srovnání s léčbou v době symptomatického MM. Nové klinické studie se zabývají tím, zda novější látky dokáží zpomalit progresi onemocnění (Kyle *et* Rajkumar, 2004).

Obrázek č. 3: Schéma léčby MM (převzato: Masopust *et al*, 2012).



Při léčbě je délka remisí závislá na míře agresivity nemoci, ale také na zvolené léčbě. Relaps onemocnění během kratšího intervalu než 12 měsíců je považován za vysoce nepříznivý prognostický faktor (Masopust *et al*, 2012).

V současné době existuje několik možností léčby pro pacienty s MM. Jednou z možností je autologní transplantace (ASCT), která je považována za zlatý standard pro všechny vhodné pacienty (od 60 do 70 let). V našich podmínkách je nejvíce užívaná pro věkovou hranici do 65 let, s přihlédnutím k biologickému věku pacienta. Léčba obvykle obsahuje vysokou myeloablativní dávku melfalanu 200 mg/m², nejčastěji bez další alkylační látky a bez radioterapie. Kmenové buňky jsou z periferní krve sbírány po tzv. stimulační nebo též mobilizační chemoterapii a následném podání

leukocytárních růstových faktorů. Tento typ léčby má lepší výsledky než léčba konvenční. Léčba trvá kratší dobu ve srovnání s konvenční léčbou, která probíhá 8-12 měsíců (Masopust *et al*, 2012).

Další variantou autologní transplantace je tandemová autologní transplantace. Její výsledky jsou stále diskutované. Ve 3 studiích z 5 se prokázalo, že tandemová transplantace má lepší výsledky v případě léčebné odpovědi (Masopust *et al*, 2012).

Druhou variantou transplantace je alogenní transplantace krvetvorných buněk, která má výhodu, jelikož štěp dárce není kontaminován nádorovými buňkami (Balcárková, 2009). Tento typ transplantace lze nabídnout pouze malému množství pacientů (mladším než 55 let) s HLA identickým sourozencem. Alogenní transplantace u MM nepatří ke standardní léčebné indikaci. Měla by být prováděna v rámci klinických studií. Za možné kandidáty lze považovat nemocné ve věku do 55 let s HLA identickým sourozencem stejného pohlaví (Masopust *et al*, 2012).

Při léčbě MM se využívá vysoce účinný lék thalidomid, který je indikován v primoléčbě i relapsu onemocnění. Kombinované režimy na bázi thalidomidu jsou účinnější než monoterapie. Optimální je využití režimů s kombinací alkylační látky a glukokortikoidu, případně bortezomibu. Thalidomid může být prvním lékem volby u MM s renálním selháním. Tento lék není schopen překonat negativní prognostický vliv a neměl by být lékem první volby (Masopust *et al*, 2012).

Bortezomib je vysoce účinný lék u MM, který je indikován již v primoléčbě i relapsu onemocnění. Kombinovaný režim je opět účinnější než monoterapie. Bortezomib má rychlý nástup léčebných účinků, je doporučen jako lék první volby s renálním selháním. Částečně překonává negativní prognostický vliv (Masopust *et al*, 2012).

Lenalidomid je dalším vysoce účinným lékem u MM. Je indikován k léčbě relapsu onemocnění. Obvykle se kombinuje s dexametazonem (Masopust *et al*, 2012).

Při léčbě MM se využívá i tzv. podpůrná léčba. Jednou z jejích složek je radioterapie a komplexní podpůrná léčba bisfosfonáty. Nejčastější indikace pro radioterapii je bolestivá léze. Většina pacientů dosáhne výrazné úlevy od bolesti. Radioterapie se používá i při hrozící nebo skutečné zlomenině obratlů. Při radioterapii

je třeba opatrnosti, protože to má za následek trvalé poškození kostní dřene v ozářených oblastech (Yeh *et Berenson*, 2006). Podávání bisfosfátu je doporučeno i pro nemocné s MM v asymptomatické fázi nemoci. Neoddálí přechod v symptomatický mnohočetný myelom, ale v době diagnózy a přechodu do symptomatického myelomu se u pacientů vyskytují menší projevy kostního postižení (Masopust *et al*, 2012). Bisfosfáty tlumí ve stromatu kostní dřene tvorbu interleukinu-6 a dalších cytokinů, které stimulují proliferaci myelomových buněk. Nejčastěji používaným bisfosfátem u nás je klodronat. Symptomatickým účinkem je zmenšení počtu nových osteolytických ložisek, patologických fraktur a snížená spotřeba analgetik, která je spojená s menší kostní bolestí (Adam *et al*, 2001).

3.3 MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE NEJASNÉHO VÝZNAMU **(monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS)**

Na rozdíl od jiných hematologických malignit mnohočetnému myelomu předchází stádium zvané MGUS (monoklonální gamapatie nejasného významu). Studie, která byla provedena na více než 77 000 nemocných, prokázala, že u všech pacientů, u kterých se vyvinul MM, byl již předtím diagnostikovaná MGUS (Anderson *et Carrasco*, 2011). Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je asymptomatická forma onemocnění, zvané mnohočetný myelom (MM). U MGUS nejsou přítomny lytické kostní léze, chudokrevnost, hyperkalcémie a selhání ledvin. U většiny pacientů je diagnostikováno zcela náhodně, jako nález M proteinu při diagnostice nesouvisejícího onemocnění nebo při preventivní prohlídce. MGUS je charakteristický proliferací monoklonálních plazmatických buněk z kostní dřene. V krevním séru je přítomno malé množství monoklonálního M proteinu (méně než 30 g/l), méně než 10 % klonů plazmatických buněk v kostní dřeni (Madan *et Rajkuma*, 2010) a množství monoklonálního imunoglobulinu v moči obvykle nepřesahuje 1 g za 24 hodin (Adam *et al*, 1999).

Kyle (1982) doporučil pro tuto jednotku název „monoclonal gammopathy of undetermined significance“, do češtiny přeloženo jako monoklonální gamapatie nejasného významu (Adam *et al*, 1999). V současné době je známo, že téměř všechny případy mnohočetného myelomu (MM) předcházelo nemaligní stádium onemocnění zvané MGUS (Madan *et Rajkuma*, 2010).

Při sledování souboru pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu byla stanovena následující pravděpodobnost vzniku maligního lymfoproliferativního onemocnění: 6,1 % po 5 letech, 15,4 % po 10 letech a 31,3 % po dvaceti letech (Adam *et al*, 1999). Další studie, která byla prováděna na Mayo Clinic (USA) hodnotila soubor 241 pacientů, u kterých byla stanovena diagnóza MGUS a nedocházelo k projevům onemocnění mnohočetného myelomu. Tento stav upozorňuje na riziko potenciálního maligního onemocnění (Madan *et Rajkuma*, 2010). Délka sledování byla 24-38 let. Pravděpodobnost přechodu MGUS v maligní onemocnění byla

stanovena na 16 % po 10 letech, 33 % po 20 letech a 40 % po 25 letech (Adam *et al*, 1999).

Tabulka č. 3: Kritéria MGUS, SMM a MM (převzato: Anderson *et Carrasco*, 2011).

Table 1 Diagnostic criteria for MGUS, SMM, and MM^a

MGUS
Serum M protein: 3 g per 100 ml
Bone marrow plasma cells: <10%
No clinical manifestations or other laboratory abnormalities attributable to monoclonal gammopathy
SMM
Serum M protein: ≥3 g per 100 ml
Bone marrow plasma cells: ≥10%
No clinical manifestations or other laboratory abnormalities attributable to monoclonal gammopathy
MM
Serum M protein: 3 g per 100 ml
Bone marrow plasma cells: >10%
Urine light-chain protein: >1 g per day

^aAbbreviations: MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; SMM, smoldering multiple myeloma; MM, multiple myeloma.

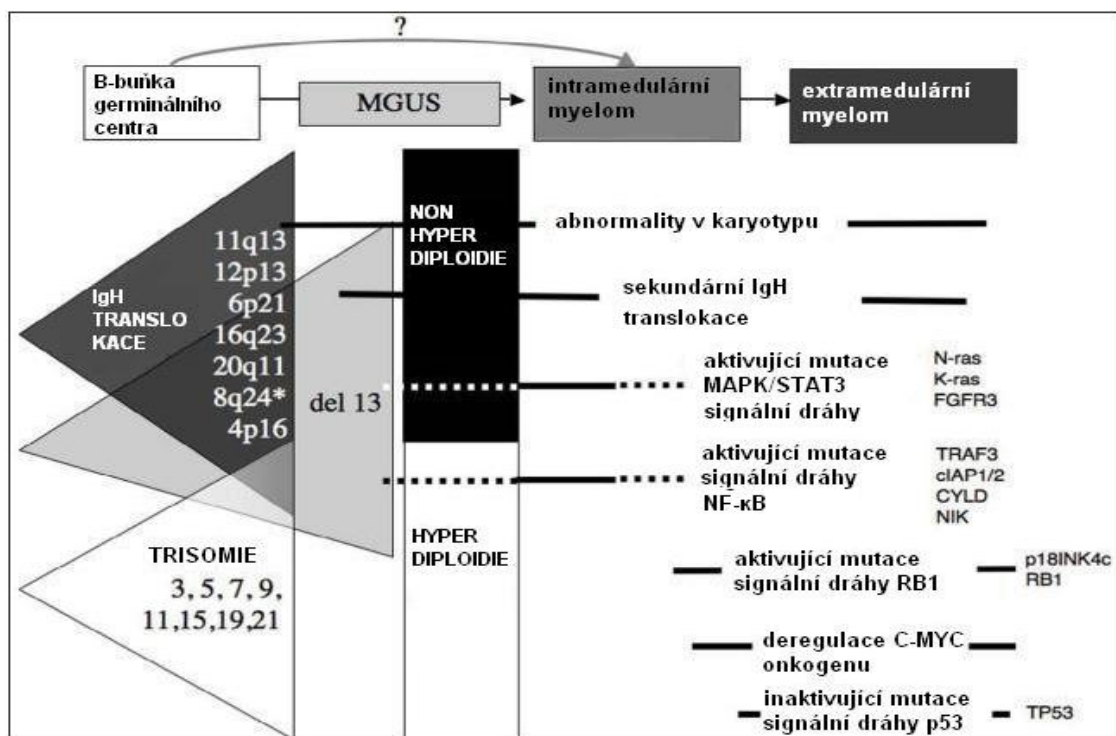
Cytogenetické změny, které jsou přítomny u mnohočetného myelomu (imunoglobulinové translokace, aneuploidie, abnormality chromozómu 13) jsou také přítomny v MGUS. Téměř u všech pacientů s MGUS se vyskytují primární translokace (v 45 % případů) nebo hyperploidie (asi u 40-50 % případů). Primární translokace se vztahují k počátku patogenetických událostí, které zahrnují těžký řetězec imunoglobulinového (*IgH*) genu na chromozómu 14q32, zatímco sekundární translokace jsou spojeny s progresí onemocnění. Primární translokace jsou většinou spojeny s chybami při VDJ rekombinaci. Jsou pozorovány přibližně u 60 % pacientů s MM a 45 % pacientů s MGUS. Třemi nejběžnějšími translokacemi *IgH* jsou t(11;14) v 25 %, t(4;14) v 9 % a t(14;16) v 5 % MGUS pacientů. Tyto translokace způsobují deregulaci řady onkogenů, které jsou přítomny na partnerském chromozómu. Přibližně 40-50 % pacientů, u kterých se nevyskytuje *IgH* translokace, se vyskytuje hyperdiploidie (obvykle jednoho nebo více chromozómů, s výjimkou chromozómu 13). Delece chromozómu 13 znamená pro pacienty špatnou prognózu. Ztráta tumor supresorového genu *RBI* na chromozómu 13 souvisí s progresí onemocnění MGUS.

Delece chromozómu 17p je spojena s kratším přežitím u MM a u MGUS se vyskytuje vzácně (Madan *et* Rajkuma, 2010).

3.4 Chromozómové a genové změny u MM

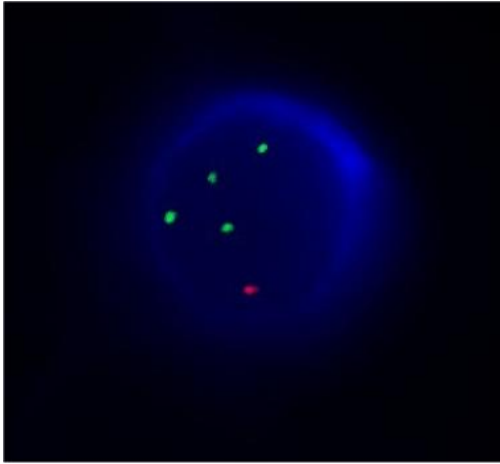
U MM se vyskytují primární a sekundární genetické změny. Primární genetické změny jsou přítomny již ve stádiu MGUS a řadíme mezi ně translokace genu *IgH*, trizomii chromozómů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 a delecí chromozómu 13 (pojem delecce chromozómu 13 v práci znamená delecí oblasti 13q14, která zahrnuje gen *RBI* a byla určena metodou FISH nebo FICTION). Sekundární genetické změny jsou často spojeny s progresí onemocnění. Mezi sekundární genetické změny řadíme delecí genu *TP53* a nadpočetné kopie oblasti 1q21. Mnohočetný myelom se geneticky dělí do dvou podtypů. Hyperdiploidní MM (h-MM) a non-hyperdiploidní MM (nh-MM). Non-hyperdiploidní typ MM je charakterizován přestavbou těžkého řetězce imunoglobulinů a obecně je spojován s více agresivním typem onemocnění a kratším přežitím pacientů. Zatímco pro hyperdiploidní typ je charakteristická trizomie, má příznivější prognózu, tato forma je častější u mužů, starších osob a je spojována s vyšším výskytem kostní formy onemocnění (www.myeloma.org, 2014).

Obrázek č. 4: Vývoj genetických změn spojených s MM (převzato: Chng *et al*, 2007).



3.4.1 Aneuploidie

Obrázek č. 5: Ukázka tetrazomie chromozómu 15 (zelená fluorescence).



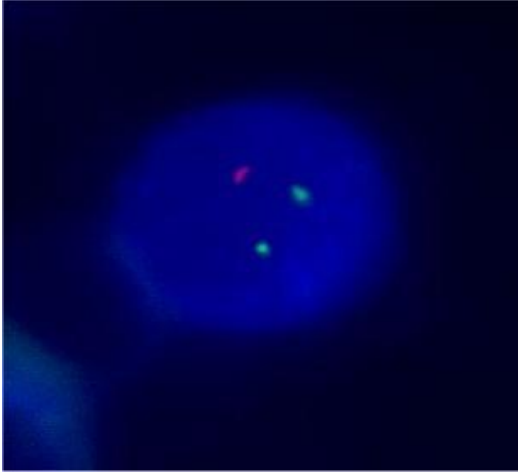
K detekci chromozómu se používají centromerické sondy. V našem případě na obrázku č. 5 vidíme centromeru chromozóm 15 (tetrazomii), vizualizovaný sondou CEP 15 (značenou zelenou barvou) od firmy Abbott Molecular. Detailní popis sondy viz kapitola 4.3.2 Metoda FICTION.

Aneuploidie (početní chromozómové změny) je častým nálezem u MM (Chng, 2010). Analýza chromozomálních změn poskytuje cennou prognostickou informaci. Pacienti s normálním karyotypem mají výrazně delší medián přežití (na rozdíl od pacientů, kteří mají abnormální cytogenetické vyšetření) (Liebisch *et* Döhner, 2006). Nejčastější trizomie se vyskytují u chromozómů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21. Naopak nejčastější monozomie se vyskytují u chromozómů 13, 14, 16 a 22. Pacienti mohou být rozděleni do kategorií na základě ploidií (Chng, 2010).

- Hypodiploidie (v karyotypu přítomno méně než 44 chromozómů)
- Pseudodiploidie (od 45 do 46 chromozómů)
- Téměř tetraploidie (75 a více chromozómů)
- Hyperdiploidie (od 47 do 74 chromozómů)

3.4.2 Abnormality chromozómu 13

Obrázek č. 6: Ukázka delece genu *RB1* (červené spektrum).

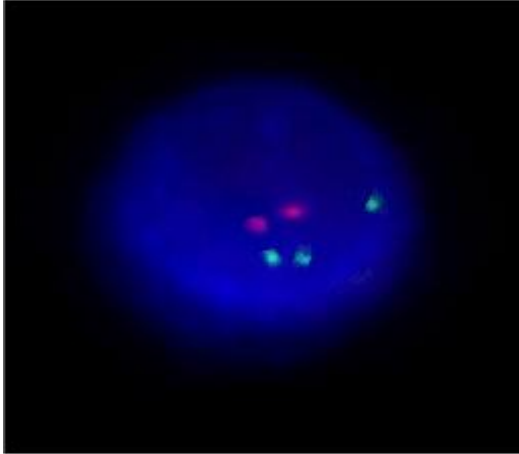


K detekci delece genu *RB1* se používá sonda LSI 13 (*RB1*) od firmy Abbott Molecular (značená červeným fluorochromem). Detailní popis této sondy viz kapitola 4.3.2 Metoda FICTION.

Delece oblasti chromozómů 13 se vyskytuje v 50 % případů MM a 40-50 % případů MGUS. Tato delece je přítomna ve většině nádorových buněk, což naznačuje, že se jedná o primární událost v patogenezi. Ve většině případů se jedná o ztrátu chromozómu 13, což způsobí monozomii, ale v některých případech dojde k deleci oblasti 13q14. V oblasti 13q14 se nachází gen *RB1* (retinoblastový gen), který je deletován. Haploinsuficience pro gen *RB1* může být možným mechanismem pro vznik této delece. 13q14 lokus obsahuje kromě *RB1* genu i geny kódující mikro RNA (miRNA). Studie ukazují, že miRNA-15 a miRNA-16a, lokalizované na 13q14, mají funkční význam u MM (Chng, 2010). Delece chromozómu 13 je většinou spojena s kratším přežitím pacientů a sníženou reakcí na léčbu (Terpos *et al*, 2006).

3.4.3 Abnormality chromozómu 1

Obrázek č. 7: Ukázka nadpočetné kopie oblasti 1q21 (zelené spektrum).



Pro detekci chromozómu 1 (oblasti 1q21 a oblasti 1p36) se používá sonda od firmy Kreatech [ON MM 1q21/SRD (1p36)]. Detailní popis této sondy viz kapitola 4.3.2 Metoda FICTION.

Aberace chromozómu 1 je nejčastější strukturální aberací u MM, která většinou zahrnuje delecí na krátkém rameni (1p) a amplifikaci dlouhého ramene (1q). Delece krátkého ramene (1p) jsou převážně intersticiální delece, které jsou definovány jako variantní intersticiální delece oblasti 1p13~1p31. Delece krátkého ramene chromozómu 1 (1p) se vykytuje u 7-40 % pacientů s MM. Oblast 1p32 je deletována u 15 % pacientů s MM, což vede ke snížení exprese genu *CDKN2C*. *CDKN2C* je cyklin-dependentní kinázový inhibitor a funguje jako regulátor buněčného růstu a řídí průběh buněčného cyklu v G1 fázi. Pacienti s delecí mají horší prognózu než pacienti bez delece (Nahi *et al*, 2010). Oblast 1p12 je další běžně deletovanou oblastí na chromozómu 1p, vyskytuje se na ní gen *FAM46C* (Kuehl *et Bergsagel*, 2012). Nahi *et al* (2010) udává, že delece této oblasti není spojena se špatnou prognózou pacienta, zatímco Kuehl *et Bergsagel* (2012) udává spojení se špatnou prognózou.

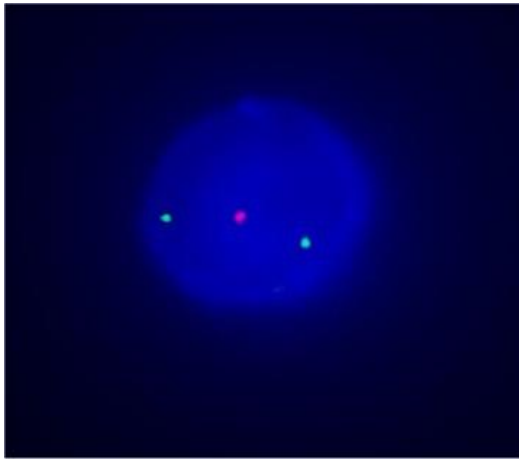
Zmnožení dlouhého ramene chromozómu 1 (1q) bylo poprvé zaznamenáno konvenční cytogenetikou (Sawyer, 2011). Abnormality 1q jsou většinou spojeny s pokročilou fází onemocnění, jeho progresí a stejně tak s kratším přežitím pacientů (Liebisch *et Döhner*, 2006).

Zmnožení genetického materiálu 1q se může vyskytovat jako isochromozóm, duplikace (zahrnutý do vzniku nebalancovaných derivovaných chromozómů), segmentární duplikace nebo jumping translokace (Balcárková, 2009; Sawyer, 2011). Zmnožení kopií oblasti 1q21 je diagnostikována u 40 % nově diagnostikovaných

pacientů a 70 % pacientů s relapsem. Oblast kolem 1q21 obsahuje velké množství genů zahrnuté do patogeneze MM, které jsou deregulovány právě zmnožením této oblasti (Sawyer, 2011). V této oblasti se rovněž nachází gen *CKSBI*, který se podílí na kontrole buněčného cyklu (Liebisch *et Döhner*, 2006).

3.4.4 Delece *TP53* na chromozómu 17

Obrázek č. 8: Ukázka delece genu *TP53* (červené spektrum).



Pro detekci genu *TP53* se používá sonda kombinovaná s centromerickou sondou pro chromozóm 17 (LSI *TP53/c17*) od firmy Abbott Molecular.

Delece oblasti 17p13 vede pravděpodobně ke ztrátě heterozygosity genu *TP53*. Delece chromozómu 17 je detekována buď konvenční cytogenetickou metodou nebo

metodou FISH. Pacienti s delecí *TP53* dosahují kratšího přežití, bez ohledu na konvenční chemoterapii nebo vysokodávkovou chemoterapii s ASCT. U pacientů s delecí p53 se objevila i rezistence na chemoterapii. Ztráta genu *TP53* je negativním prognostickým faktorem u MM (Terpos *et al*, 2006).

Inaktivace tumor supresorového genu *TP53* (monoalelická mutace nebo mutace spojená s progresí onemocnění) se vyskytuje u mnoha malignit. Delece *TP53* se vyskytuje u 5-10 % nově diagnostikovaných pacientů, ale funkční ztráta genu je přítomna až u 40 % pacientů s pokročilým MM. V tomto případě je buněčná linie myelomových buněk postižena ve více než 60 % buněk, takže p53 můžeme brát jako marker nádorové progrese (Liebisch *et Döhner*, 2006). Důležité je zjištění, zda se jedná o monoalelickou delecí 17p nebo jestli je mutace *TP53* důsledkem haploinsuficience (Kuehl *et Bergsagel*, 2012).

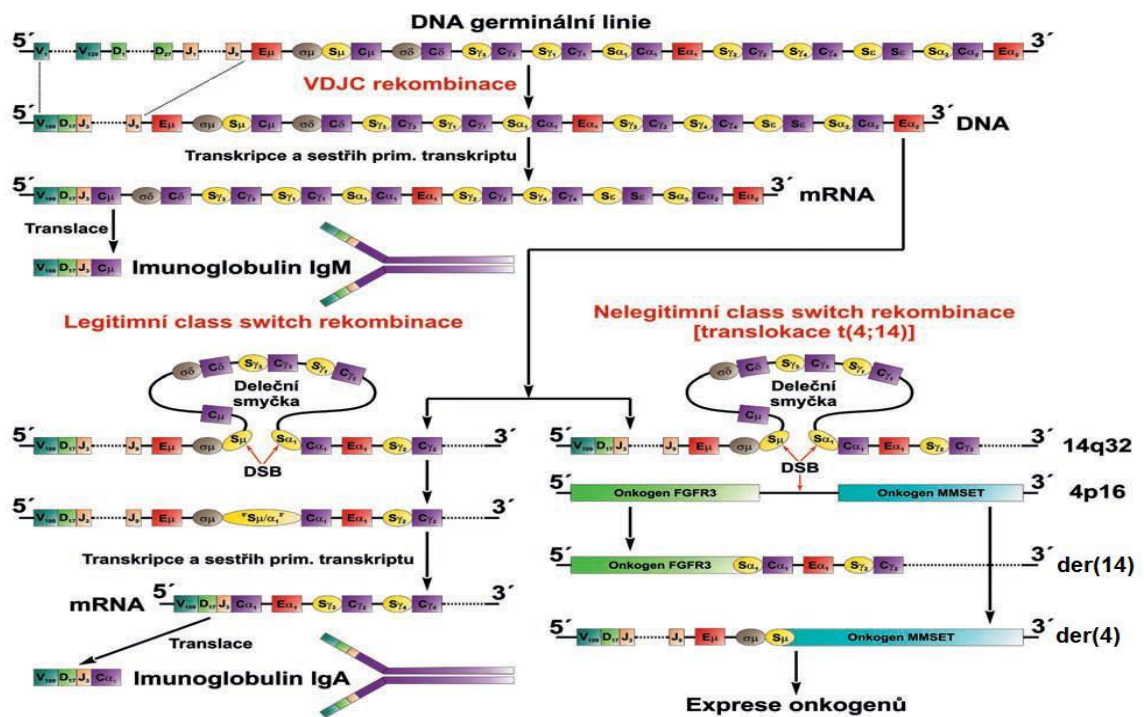
Protein p53 hraje důležitou roli v buněčném cyklu (Nahi *et al*, 2010). Je transkripčním faktorem řady genů, které kontrolují růst buněk, stárnutí buněčných populací, opravy DNA, apoptózu a angiogenezi (Mičková *et al*, 2014). Normální buňky vykazují nízkou expresi proteinu p53. Aktivace p53 vyvolá zástavu buněčného cyklu a následnou apoptózu (Nahi *et al*, 2010).

3.4.5 Primární a sekundární IgH translokace

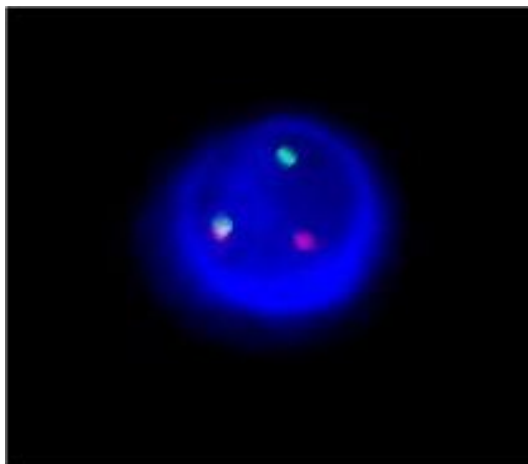
Již v kapitole 3.2.2.1 Molekulární podstata tvorby protilátek na úrovni DNA a patogeneze MM jsme se setkali se třemi procesy modifikace DNA v *IgH* genu. Na začátku této kapitoly se ještě znovu vrátíme k legitimním a nelegitimním class switch rekombinacím.

Legitimní class switch rekombinace je fyziologickým procesem. Při fyziologické delecí V_H se nenašel žádný funkční gen, který by se tohoto procesu účastnil (Wlodarska *et al*, 2007). Nelegitimní class switch rekombinace je patologickým procesem. Tohoto procesu se neúčastní 2 samostatné switch regiony, ale pouze jeden a další molekula DNA (jiný chromozóm). Nejprve vznikne deleční smyčka, poté dojde k dvouřetězcovým zlomům DNA. Volné konce DNA jsou vysoce reaktivní a nespojují se vzájemně, ale spojují se s jiným chromozómem, který před tím prodělal také dvou řetězcový zlom DNA. Mechanismus obou typů switch rekombinace je znázorněn na obrázku č. 9. Tímto mechanismem tedy vznikají chromozómové translokace. Lokus *IgH* kromě segmentů DNA obsahuje nejméně 3 zesilovače transkripce (enhancers), které regulují transkripci *IgH* genu ve všech vývojových stádiích B buněk. Prvním zesilovačem je E_μ a další dva jsou E_{α_1} a E_{α_2} . Dojde-li k nelegitimní rekombinaci, dostávají se vedle sebe segmenty části *IgH* genu obsahující zesilovač transkripce a onkogeny na jiném chromozómu účastnícím se nelegitimní switch rekombinace (např. gen *CCND1*, *FGFR3*,...). U onkogenů (vlivem přítomnosti zesilovačů transkripce v jejich blízkosti) dochází většinou k zvýšení exprese (Němec *et al*, 2008).

Obrázek č. 9: Molekulární mechanismus legitimní a nelegitimní class switch rekombinace (upraveno dle: Němec *et al*, 2008).



Obrázek č. 10: Ukázka typického obrazu pro translokaci *IgH*.



Pro detekci translokace *IgH* se používá sonda ON IGH (14q32) Break od firmy Kreatech. Detailní popis sondy viz kapitola 4.3.2 Metoda FICTION.

K primární translokaci dochází již v časných stádiích patogeneze, sekundární translokace zahrnuje např. gen *Myc* umístěný v oblasti 8q24 (Liebisch *et*

Döhner, 2006). Touto translokací dochází k zvýšené expresi *c-Myc*, která může být zodpovědná za přechod onemocnění z fáze MGUS do MM (Bergsagel *et* Chesi, 2013). Sekundární translokace jsou konstrukčně složité a souvisí s progresí onemocnění. Pro detekci translokací se používá metoda FISH s DNA sondou, která zahrnuje *IgH* lokus v oblasti 14q32. Přestavby *IgH* jsou detekovány u většiny nemocných s MM.

V tabulce č. 4 je uvedena incidence pěti nejdůležitějších primárních translokací a postižených onkogenů (Liebisch *et* Döhner, 2006).

Tabulka č. 4: Přehled primárních translokací.

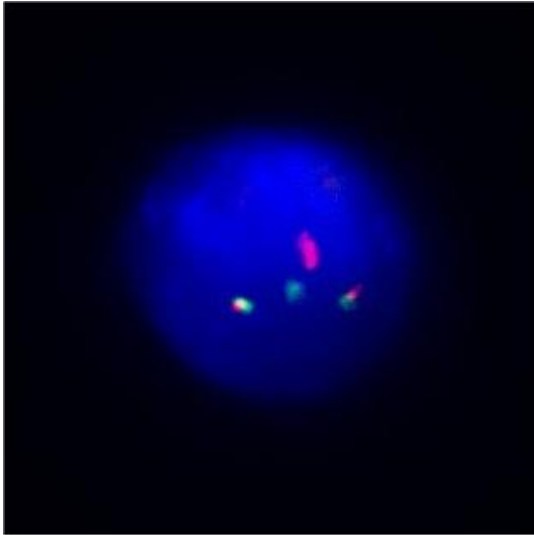
Lokus	Incidence	Onkogen zapojený do translokace	Funkce onkogenu
11q13	15-20 %	<i>Cyklin D1</i>	Regulace buněčného cyklu
4p16.3	15-20 %	<i>FGFR3</i> a <i>MMSET</i>	Regulace růstu a diferenciacie buněk
16q23	2-10 %	<i>c-maf</i>	bZIP transkripční faktor
6p21	3-5 %	<i>Cyklin D3</i>	Regulace buněčného cyklu
20q11	2 %	<i>mamb</i>	bZIP transkripční faktor

Hlavními skupinami onkogenů, které se zapojují do primární translokace, jsou cyklin D (*CCND*), *MAF* a Wolf-Hirschhorn obsahující (*MMSET/FGFR3*) geny. V některých vzácných případech mohou mít nádory translokaci vyvolanou dvěma primárními translokačními skupinami. Translokace zahrnující *CCND* reguluje expresi genu *CCND*; translokace *MAF* reguluje expresi *MAF* transkripčního faktoru, který způsobuje zvýšenou expresi řady genů, včetně *CCND2* a adhezních molekul, díky kterým se zvýší schopnost nádorové buňky interagovat s mikroprostředím (Kuehl *et* Bergsagel, 2012).

Primární translokace se vyskytují zhruba stejně často u MGUS a MM (~40-60 %). Sekundární *IgH* translokace chybí u pacientů s MGUS a doutnajícím mnohočetným MM. Incidence *Igλ* translokace je častější, v HMCLs (human myeloma cell lines) je v rozsahu 20 %, zatímco přestavby *Igκ* jsou poměrně vzácné (Liebisch *et* Döhner, 2006). Translokace, které zahrnují gen *IgH* jsou zjištěny u více než 50 % nově diagnostikovaných pacientů. Nejběžnější *IgH* translokace je t(4;14) a t(11;14). Vyskytují se asi u 30 % pacientů. Translokace t(14;16) se vyskytuje asi u 5 % pacientů. Méně častými translokacemi jsou t(6;14), t(8;14) a t(14;20) (Nahi *et al*, 2010).

3.4.5.1 Translokace t(11;14)

Obrázek č. 11: Ukázka typického obrazu pro translokaci t(11;14), ale i t(4;14) a t(14;16).



Pro detekci translokace t(11;14) se používá sonda ON MYEOV/IGH t(11;14) Fusion, od firmy Kreatech. Detailní popis sondy viz. kapitola 4.3.2 Metoda FICTION.

Pomocí metody FISH, je identifikovaná translokace t(11;14) asi u 15-20 % pacientů s MGUS a u 15-30 % pacientů s MM (Liebisch *et Döhner*, 2006). Tato translokace zahrnuje chromozomální

oblasti 11q13 a 14q32 (Terpos *et al*, 2006) a je nejčastější translokací u MM.

Při translokaci dochází k fúzi regionu genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (*IgH*) na chromozómu 14 a nekódující části genu *BCL-1* (*CCND1*) na chromozómu 11 (Walker *et al*, 2012). V blízkosti genu *CCND1* se nachází i gen *MYEOV*, který je lokalizován v oblasti 11q13 a může se podílet na translokaci t(11;14). Tento gen představuje domnělý onkogen, který se nachází na chromozómu 11 (Janssen *et al*, 2000). Při translokaci t(11;14) jsou zlomy rozptýleny v rozmezí 360 kb, v oblasti mezi *CCND1* a *MYEOV* (Kreatech Diagnostics, 2014 - www.kreatech.com).

Je známo, že cyklin D fosforyluje RB1 protein, a tak hraje důležitou roli v buněčném cyklu (při přechodu z G do S fáze). Společně s RB proteinem a p16^{INK4A} regulují G1 fázi (Terpos *et al*, 2006). Úroveň exprese cyklinu D1, D2 a D3 v MM a v MGUS je výrazně vyšší než v normálních plazmatických buňkách (Hideshima *et al*, 2004).

3.4.5.2 Translokace t(4;14)

Translokace t(4;14) se vyskytuje asi u 20 % pacientů s MM (Ronchetti *et al*, 2001). Tito pacienti mají nepříznivou prognózu, která je částečně zmírněna použitím nových léků (jako je bortezomib a lenalidomid). V preklinických studiích se provádí testy inhibitorů *FGFR3*, které se ukazují být slibné pro pacienty s touto translokací a vedly k zahájení klinických zkoušek, které pomohou určit klinickou prospěšnost těchto inhibitorů (Kalff *et Spencer*, 2012).

Translokace t(4;14) vede k deregulaci 2 genů, které jsou umístěny v oblasti 4p16.3 (fibroblastový růstový faktor pro receptor 3 – *FGFR3* a transkripční faktor - *WHSC1/MMSET*) (Ronchetti *et al*, 2001). Translokace onkogenů v této oblasti může vést k jejich zvýšené expresi, což vede k propuknutí onemocnění, jeho progresi a terapeutické rezistenci (Kalff *et Spencer*, 2012). Při translokaci vzniká v oblasti 4p16.3 místo zlomu asi 50-120 kb centromericky od *FGFR3* a v 5' oblasti transkripčního faktoru *WHSC1/MMSET*, což vede k nadměrné expresi 2 genů a tvorbě *IGH/MMSET*. Přítomnost mutací v buněčných liniích MM naznačuje, že může hrát roli v nádorové progresi u pacientů s MM a s translokací t(4;14) (Ronchetti *et al*, 2001).

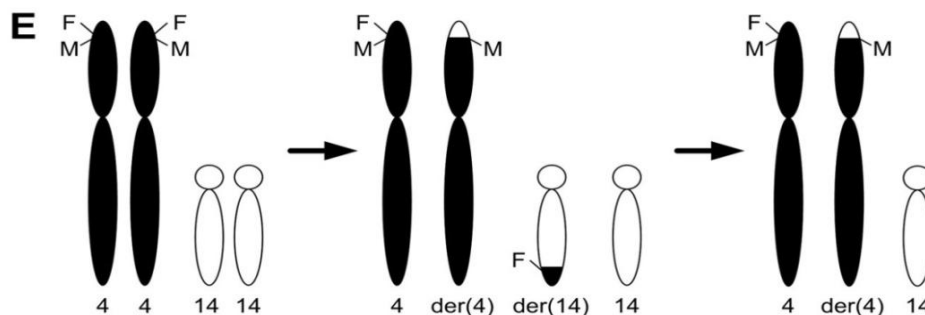
Fibroblastový růstový faktor pro receptor 3 (*FGFR3*) patří do skupiny transmembránových receptorů tyrosin kinázy. Podílejí se na regulaci buněčného cyklu a diferenciaci buněk v mnoha typech tkání. *FGFR3* obsahuje tři glykosylované extracelulární imunoglobulinové domény, transmembránovou doménu a odštěpenou tyrozin kinázovou doménu (Ronchetti *et al*, 2001). Aktivace ligandu způsobí fosforylaci v kinázové doméně, která vyvolá aktivaci dalších receptorů a přenos signálu do jádra buňky (Balcárková, 2009; Ronchetti *et al*, 2001). Nadměrná exprese proteinu *FGFR3* se vyskytuje přibližně u 70 % pacientů s t(4;14), *MMSET* je nadměrně exprimován ve všech případech (Kalff *et Spencer*, 2012). Nadměrná exprese genu *MMSET* na derivovaném chromozómu 4 je způsobena přítomností zesilovače transkripce E μ (Němec *et al*, 2008).

MMSET je chromatin remodelační faktor, který je nadměrně exprimován v řadě tumorů s translokací t(4;14) (Kuehl *et Bergsagel*, 2012), zatímco asi v 25 %

dojde ke ztrátě derivovaného chromozómu 14, což je spojeno se ztrátou exprese *FGFR3* (Fonseca *et al*, 2009). Během progresu onemocnění se může vyskytnout *FGFR3* aktivační mutace, která potvrzuje roli *FGFR3* v patogenezi MM. Aktivovaný mutant *FGFR3* může být onkogenní. V poslední době se ukázalo, že přirozeně se vyskytující *FGFR3* (který byl nalezen ve většině t(4;14) tumorů), může také přispět k onkogenezi B-buněk. Zbývá určit, zda gen *FGFR3* je rozhodující v časně patogenezi a stává se postradatelným během progresu t(4;14) MM (Kuehl *et Bergsagel*, 2012).

WHSC1/MMSET gen kóduje izoformy (*MMSET I*, *MMSET II* a *RE-IIBP*), které jsou zapojeny do regulace transkripce. Přibližně u jedné třetiny MM, u kterých se vyskytuje t(4;14), se neprojevuje gen *FGFR3*, což naznačuje, že *MMSET* hraje více důležitou roli jako cílový translokační gen. Biologická role genu *MMSET* je většinou neznámá, ale bylo navrženo zapojení genu do regulace transkripce na základě přítomnosti specifických domén (nalezených v proteinech), o kterých je známo, že působí jako korepresory nebo koaktivátory v transkripčních mechanismech (Todoerti *et al*, 2005). Zbývá ještě určit, jak *MMSET* přispívá k patogenezi MM. *MMSET* je histon methyltransferáza pro H4K20. Pokud je nadměrně exprimován, vede to k celkovému zvýšení H3K36 methylace a snížení H3K27 methylace, což by mohlo vysvětlit některé z mnoha změn v genové expresi spojené s t(4;14). V poslední době bylo zjištěno, že *MMSET* hraje úlohu v DNA opravách (Kuehl *et Bergsagel*, 2012). Možností pro léčbu jsou tedy inhibitory receptorů tyrosin kináz (Nahi *et al*, 2010).

Obrázek č. 12: Translokace t(4;14) a uložení genů *FGFR3* a *MMSET* (Walker *et al*, 2010).



Translokace t(4;14) byla prvním příkladem *IgH* translokací, která současně mění regulaci 2 genů s onkogenním potenciálem. Po translokaci je gen *FGFR3* lokalizovaný na derivovaném chromozómu 14 a *MMSET* na derivovaném chromozómu 4 (Kalff *et Spencer*, 2012).

3.4.5.3 Translokace t(14;16)

Translokace t(14;16) se vyskytuje asi u 5 % pacientů (Fonseca *et al*, 2003). Konvenční cytogenetika není schopna identifikovat tuto translokaci díky telomerickému umístění obou lokusů. Zahrnuje chromozomální oblasti 14q32 a 16q23. Výsledkem translokace je rozsáhlá exprese genu *c-MAF* a změně regulace nově charakterizovaným genem (*WWOX*). *C-MAF* je transkripční faktor, který se podílí na buněčné diferenciaci, proliferaci a na reakci IL-6. *WWOX* je předpokládaný tumor supresorový gen u karcinomu prsu, ale jeho role v MM musí být ještě dořešena (Terpos *et al*, 2006).

3.4.5.4 Translokace t(6;14)

Existují 2 různé vzory, podle kterých probíhá t(6;14), a to t(6;14)(p21;q32) a t(6;14)(p25;q32). Translokace t(6;14)(p21;q32) byla původně identifikována konvenční cytogenetikou v nádorových buněčných liniích. Tato translokace je přítomna zhruba u 3-4 % MM. Translokace zahrnuje chromozomální oblasti 6p21 a 14q32. Výsledkem translokace je špatná regulace genu pro Cyklin D3. *Cyklin D3* je regulátorem buněčného cyklu a kandidátní onkogen, který se nachází v oblasti 6p21 (Terpos *et al*, 2006).

Translokace t(6;14)(p25;q32) byla popsána v myelomových buněčných liniích. Chromozomální oblasti podílející se na translokaci jsou 6p25 a 14q32. Tato

translokace vede k nadměrné expresi *MUM/IRF4*, interferonu (*IRF*). Role těchto translokací není příliš jasná (Terpos *et al.*, 2006).

3.5 Klinický význam genetických změn

V současné době cytogenetické vyšetření poskytuje jednu z nejdůležitějších informací o prognóze pacientů. Studie prováděné během uplynulých let prokázaly, že přítomnost specifických chromozómových aberací u pacientů s MM představují rozhodující prognostický faktor, jak při léčbě autologní transplantací, tak při užití vysokodávkové chemoterapie. Intenzivně se sleduje význam cytogenetických změn při léčbě některými typy léků, např. imunomodulačními léky nebo inhibitory proteazomu (Masopust *et al*, 2012).

Na rozdíl od většiny hematologických malignit se u MM často jedná o složité komplexní změny karyotypu. Jejich prognostický význam je postupně upřesňován. Nepříznivým prognostickým faktorem je delece chromozómu 13 (může být prokázána i konvenční cytogenetickou analýzou) současně s dalšími nepříznivými změnami jako je *IgH* translokace (4p16.3 – *FGFR3/MMSET* nebo 16q23 – *MAF*) a delece lokusu 17p13 – *TP53* (Kalff *et Spencer*, 2012). Delece dlouhého ramene chromozómu 13 v kombinaci s delecí 17p13 a translokací t(4;14) je považována za špatný prognostický ukazatel. Při ztrátách na 13q pravděpodobně dochází k inaktivaci kandidátního tumor-supresorového genu (Kuglík *et al*, 2006). Dále bylo zjištěno, že průkaz translokace t(4;14), t(14;16), t(14;20), t(8;14), delece *TP53*, zmnožení kopií oblasti 1q21, delece 12p a hypodiploidie vyšetřené metodou FISH významně snižují medián celkového přežití a slouží k vyčlenění vysoce rizikových nemocných s agresivním průběhem a s krátkým celkovým přežitím, vyžadujícím intenzivní a individuálně pojatou léčbu. Naopak nález translokace t(11;14) nebo hyperdiploidie jsou spojeny s relativně příznivým prognostickým výhledem (Masopust *et al*, 2012). Pacienti s non-hyperdiploidii mají horší prognózu v porovnání s pacienty s hyperdiploidii (Kalff *et Spencer*, 2012).

Dle Rajkumara (2012) lze nemocné s aktivní formou mnohočetného myelomu rozdělit do tří prognosticky odlišných skupin. Toto zařazení se odvíjí od chromozómových a genetických změn, kterými jsou pacienti postiženi. Pacienti s následujícími změnami [delece 17p, t(14;16) a t(14;20)] se řadí do skupiny „high-risk“. Pacienti s t(4;14), delecí chromozómu 13 a hypodiploidii (<46) jsou řazeni

do skupiny „intermediate-risk“ a všechny ostatní změny jsou řazeny do skupiny „standard-risk“ viz tabulka č. 5.

Tabulka č. 5: Rozdělení pacientů do 3 prognostických skupin, dle chromozómových a genových změn (Rajkumar, 2012).

Prognóza	Standard-risk	Intermediate-risk	High-risk
Chromozómové a genové aberace	hyperdiploidie	t(4;14)	delece 17 p
	t(11;14)	delece chromozómu 13	t(14;16)
	t(6;14)	Hypodiploidie	t(14;20)

Pacienti, kteří jsou řazeni do skupiny „standard risk“ dosahují mediánu celkového přežití 6–7 let, zatímco pacienti s „high risk“ dosahují mediánu celkového přežití 2–3 roky, a to i přes tandemovou transplantaci (ASCT). Přežití pacientů s MM se výrazně zlepšilo v posledních deseti letech, díky používání thalidomidu, bortezomibu a lenalidomidu (Rajkumar, 2012).

Studie prokázaly, že léčba lenalidomem dokáže překonat negativní vliv t(4;14), ale nedokáže překonat vliv delece *TP53* a amplifikaci 1q21. Inhibitor proteazomu bortezomib je účinný u pacientů s delecí *RBI*. Byl prokázán vliv na prodloužení přežití pro nově diagnostikované pacienty s t(4;14), ale neměl vliv u pacientů s delecí *TP53* a pravděpodobně ani se ziskem 1q21. Obecně platí, že u nemocných s nízkým rizikem by léčba měla být intenzivní, jelikož se zde může dosáhnout nejlepších výsledků (Masopust *et al*, 2012).

Prognóza u MM závisí také na věku pacienta, jeho celkovém zdravotním stavu, fázi a agresivitě onemocnění a jeho reakci na léčbu. Pro rozdělení stádií mnohočetného myelomu používáme rozdělení dle Durieho a Salmona (viz tabulka č. 1) nebo dle Mezinárodního prognostického indexu pro mnohočetný myelom (viz tabulka č. 2) viz kapitola 3.2.4 Diagnóza (Rajkumar, 2012).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Kultivace buněk kostní dřeně (KD) pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření

Biologický materiál

Pro cytogenetické vyšetření nemocných s mnohočetným myelomem se používají buňky kostní dřeně (KD). Při vyšetření, která jsem prováděla, jsem používala jako biologický materiál KD.

Od každého pacienta jsou vždy odebrány 2 vzorky do dvou 3ml odběrových zkumavek, ve kterých se nachází heparin. Do každé zkumavky se odebírá 1-2 ml vzorku. Poté je vzorek přečištěn od heparinu – přenesením cca 1 ml vzorku z odběrové zkumavky do zkumavky s 15 ml RPMI-1640 média. Vzorek je promíchán a zcentrifugován (1000 rpm při 37 °C, 10 minut). Po centrifugaci se médium odsaje a supernatant je přenesen do 2 kultivačních médií.

Přístroje a pomůcky

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

Spotřební materiál

Plastové kultivační nádoby 40 ml (Nunclon TM Δ Surface); centrifugační zkumavky 15 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); Pasteurovy pipety (10 ml) (Biosigma, Benátky, Itálie); sterilní injekční jehly (B. Braun, Melsungen, Německo)

Reagencie

Kolcemid; telecí sérum; Giemsovo barvivo (vše Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); heparin (Zentiva, Praha, ČR); BM médium (Bone marrow karyotyping medium) (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael); RPMI – 1640 médium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Pracovní postup

Pro každého pacienta se při odběru KD připravují 2 kultivace. Jedna je označována jako K a druhá jako K24col. Kultivace probíhá po dobu 24 hodin. První vzorek (s označením K24col) je kultivován *in vitro* v kultivačním médiu při teplotě 37 °C. Do tohoto vzorku je kolcemid přidán ihned po smísení média se vzorkem. Oba vzorky jsou inkubovány při 37 °C po dobu cca 24 hod. Následující den se do kultivace K přidají 2 kapky kolcemidu, a to 30 minut před ukončením kultivace, aby došlo k zastavení dělicích se buněk v metafázi. Poté jsou zpracovány oba dva vzorky – viz kapitola 4.2 Zpracování materiálu pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření. Cílem kultivace je získání co největší množství dělicích se buněk pro následující cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření.

Po zpracování materiálu následuje cytogenetické barvení Giemsovým barvivem a tentýž den se hodnotí výsledek kultivace vyhodnocením počtu mitóz na preparátu. Pokud není nalezen dostatečný počet mitóz (alespoň 5 mitóz na 1

preparátu), přidáme do média pro 24-hodinovou kultivaci 2 kapky kolcemidu, abychom zvýšili počet mitóz ve vzorku.

Kontrola kvality

Kvalita kultivace je hodnocena podle počtu nalezených mitóz a cytogenetické barvení Giemsovým barvivem. Při úspěšné kultivaci jsou nalezeny hodnotitelné mitózy, při neúspěšné kultivaci nejsou nalezeny hodnotitelné mitózy, ale pouze interfázní buňky, tato kultura je však vhodná pro interfázní FISH. Pokud dojde k neúspěšnému odběru, ve vzorku nejsou nalezeny ani mitózy ani interfázní buňky a nelze tedy provést cytogenetické ani molekulární vyšetření, je nutné provést odběr znovu.

4.2 Zpracování materiálu pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření

Buňky kostní dřeně jsou podrobeny krátkodobé kultivaci, při níž se cytogenetickými metodami získávají i buňky, které procházejí buněčným dělením. Ve fázi buněčného dělení, označované jako *metafáze*, je genetická informace uspořádaná do dvouchromatidových chromozómů, které lze po obarvení hodnotit ve světelném mikroskopu. U každého nemocného musí být při standardním cytogenetickém vyšetření vyhodnoceno nejméně 30 metafází, z 15-20 metafází se sestaví karyotyp, kterým se rozumí vyhodnocení mikrofotografie nebo digitální fotografie chromozómů a jejich uspořádání podle mezinárodně platné nomenklatury, označené jako ISCN 2005 (Jarošová *et al*, 2007).

Nezbytným krokem celého postupu při zpracování a přípravě materiálu je využití schopnosti působení kolchicinu na funkci dělicího vřeténka, tj. zastavení procesu buněčného dělení v metafázi. Následuje přidání hypotonického roztoku (0,075

M KCl na 10-20 minut), který umožní nabobtnání buňky, zvětšení jejího objemu a rozložení chromozómů v ekvatoriální rovině. Proces fixace zahrnuje 3-4x opakované přidávání fixačního roztoku (methanol : kyselina octová – 3 : 1). Nakapáním buněčné suspenze na předem odmaštěné a důkladně omyté podložní sklo získáme cytogetické preparáty vhodné pro další použití (Kuglík *et al*, 2008).

Přístroje a pomůcky

Inkubátor 37 °C Function Line (Heraeus Holding, Hanau, Německo); mraznička; lednička (obojí Labnet International, Edison, NJ, USA); centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA); třepačka Heidolph Real top (Heidolph, Schwabach, Německo); laboratorní sklo

Spotřební materiál

Pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie); plastové zkumavky Falcon 15, 50 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; TPP®, Trasadingen, Švýcarsko)

Reagencie

Chlorid draselný (lékárna FNOL); methanol; kyselina octová ledová (obojí Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Pracovní postup

Zpracování materiálu pro cytogenetická vyšetření provádí laborantky dle pracovního postupu.

Připraví se fixační roztok (Carnoye) smísením methanolu a kyseliny octové v poměru 3 : 1. Obsah kultivačních nádob se přelije do řádně označených 15ml zkumavek. Ty se centrifugují po dobu 10 minut při 1000 rpm a 37 °C. Poté se odstraní supernatant a přidá se 10 ml 0,075M roztoku KCl vytemperovaného na 37 °C. Inkubace materiálu se provádí po dobu 25 minut ve 37 °C. Poté se přidají 3 kapky fixačního roztoku Carnoye, obsah se promíchá a provede se centrifugace po dobu 10 minut při 1000 rpm a 37 °C. Po centrifugaci se odstraní supernatant a přidá se 10 ml fixačního roztoku Carnoye vychlazeného v mrazničce (-20 °C). První mililitr se přidává pomalu po kapkách a obsah zkumavky promícháme pomocí vortexu. Inkubace materiálu trvá po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následně provedeme centrifugaci po dobu 10 minut při 1000 rpm a 4 °C. Poté odstraníme supernatant a přidáme 10 ml fixačního roztoku Carnoye, promícháme pomocí vortexu. Zopakujeme centrifugaci a odstraníme supernatant. Výsledná buněčná suspenze musí mít mléčné opaleskující zbarvení. Takto zpracovaná suspenze buněk je uchována v ledničce k dalšímu použití po dobu několika týdnů až měsíců.

Vyhodnocení výsledků

Buněčnou suspenzi nakapeme na podložní sklo, obarvíme pomocí roztoku Giemsy a zkontrolujeme, zda se na preparátu nacházejí mitózy.

4.3 MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETICKÉ METODY

Základní metodou molekulární cytogenetiky je hybridizace *in situ*, která umožňuje zviditelnit sekvence nukleových kyselin přímo na mikroskopických preparátech obsahujících fixované a morfologicky zachované chromozómy nebo interfázní jádra.

Molekulární hybridizace *in situ* je založena na použití značené jednořetězcové hybridizační sondy, tj. krátkého úseku DNA. Tato sonda se v důsledku komplementarity bází může po denaturaci vázat k cílové sekvenci DNA buněk nacházejících se na mikroskopickém skle a umožnit tak detekci defektních genů či chromozómů v genomu nádorových buněk. Studované fragmenty DNA jsou přibližně velké 200 – 300 kb. Na základě konjugace DNA sondy s fluorochromem můžeme potom místa hybridizace detekovat prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Fluorescenční signály jsou snímány CCD kamerou napojenou na počítač se speciálními programy.

Výhodou metody FISH je, že při použití vhodných DNA sond umožňují detekci početních i strukturních chromozomových abnormalit, a to nejen v mitózách, ale i v nedělících se interfázních jádrech (Kuglík *et al*, 2008).

- METODA FISH - FISH (fluorescenční *in-situ* hybridizace) pracuje na principu schopnosti sondy (jednořetězcové DNA) navázat se na komplementární úsek vyšetřované DNA pacienta – interfázní jádra nebo mitózy. Vyšetření FISH se provádí na plné kostní dřeni (procento hodnocených buněk neodpovídá tedy jen procentu plazmatických buněk – jako u metody FICTION).
- METODA FICTION - Spočívá ve značení plazmatických buněk pomocí protilátek proti lehkým řetězcům kappa/lambda. Protilátky jsou specificky navázány na plazmatické buňky. Hodnotíme pouze buňky specificky značené, tzn. pouze plazmatické buňky.

- METODA mFISH – Při metodě mFISH se používá 24 rozdílných DNA sond, které jsou značeny pěti spektrálně odlišnými fluorochromy a jejich vzájemnou kombinací. Díky tomu je možné označit každý chromozomový pár jinou barvou (Beránková, 2007). Tato metoda je úspěšná při studiu komplexních změn karyotypu. Umožňuje odhalit různé kryptické translokace a inzerce, které nelze odhalit klasickými metodami.

4.3.1 Molekulárně cytogenetické vyšetření FISH s lokusově specifickými (LSI) a centromerickými sondami (CEP)

Biologický materiál

Buněčná suspenze KD (K24 nebo N) od 9 pacientů (5 žen a 4 mužů). Vyšetření FISH bylo provedeno k rozlišení dvou genů (*FGFR3* a *MMSET*), umístěných na chromozómu 4 a vstupující do translokace t(4;14).

Přístroje a pomůcky

Mraznička; lednička; centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA); pH metr Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA); skleněné kopolny (25-30 ml); pipety (Gilson, Middleton, WI, USA); vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International); hybridizační komůrka Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK); plotýnka Medax (Nagel, Kiel, Německo); vortex Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo); stolní centrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA); světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japonsko); fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus, Tokyo, Japonsko); CCD kamera; software ISIS (obojí MetaSystems, Altlussheim, Německo); počítač

Spotřební materiál

Plastové uzavíratelné falkony 15 ml a 50 ml Falcon (TPP®, Trasadingen, Švýcarsko); plastové Eppendorfký 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo); Pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie); skla SuperFrost (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); krycí skla (18x18 mm, 22x22 mm, 24x24 mm) (Menzel-Gläser, Braunschweig, Německo); špičky (Gilson, Middleton, WI, USA); rubber cement (Marabu, Tamm, Německo); parafilm (Bemis Company, Neenah, WI, USA); imerzní olej (Olympus, Tokyo, Japonsko)

Reagencie

Deionizovaná H₂O (vyrábí si HOK); methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR); kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice, ČR); 20xSSC (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA); Tween20 (Serva, Heidelberg, Německo); ultrapure formamid (Qbiogene, Montreal, QC, Kanada); 70%, 80%, 90% a 96% etanol (Fagron, Nieuwerkerk a/d IJssel, Nizozemí); fluorescenčně značené sondy [MD Wolf-Hirschhorn WHSC1 (4p16) / SE4 (Kreatech); XCE 4 green (MetaSystems)] (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA; Kreatech, Amsterdam, Nizozemí); BAC sonda (RP11-241P10); DAPI; NP40 (obojí Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

Pracovní postup

Příprava preparátu

Před nakapáním vzorku na sklo musíme promýt biologický materiál pomocí Carnoy (kyselina octová: methanol). Vzorek nejprve centrifugujeme při 1000 otáčkách/10 minut. Poté odsajeme supernatant pomocí vývěvy. Zkumavku opět doplníme čerstvým fixačním roztokem a opět vzorek zcentrifugujeme při 1000 otáčkách/10 minut. Po centrifugaci znovu odsajeme supernatant a k usazené buněčné suspenzi přikapeme několik kapek fixačního roztoku, až dojde k mléčnému zbarvení roztoku. Preparát připravíme nakapáním 2-3 kapek buněčné suspenze na podložní sklo, které popíšeme iniciály pacienta, nadýchneme ho a připravený preparát poté necháme volně uschnout. Pod světelným mikroskopem zkontrolujeme množství buněk na preparátu. V případě nedostatku buněk a mitóz na podložním skle dokapeme další kapky buněčné suspenze. V případě nadbytku buněk na preparátu naředíme buněčnou suspenzi větším množstvím fixačního roztoku a nakapeme nový preparát.

Do 50ml plastové falkony připravíme roztok 2xSSC (naředěním zásobního roztoku 20xSSC s injekční vodou). Připravený roztok přelijeme do koplíny, do které vložíme připravený preparát a inkubujeme ho po dobu 20 minut. Poté provedeme odvodnění skla promýváním ve vzestupné řadě ledových alkoholů (uchovávaných v -20 °C), preparáty inkubujeme po dobu 2 minut v 70%, 80%, 90% a 96% ethanolu. Sklo přeneseme na plotýnku vytemperovanou na 45 °C a necháme ho uschnout. Po úplném vysušení skla provedeme denaturaci v denaturačním roztoku vytemperovaném na 73 °C. Poté provedeme odvodnění skla ve vzestupné řadě ledových alkoholů. Sklo inkubujeme po dobu 2 minut. Sklo přeneseme na plotýnku vytemperovanou na 45 °C a necháme ho uschnout.

Příprava sond

Pro metodu FISH jsme připravili sondy dle návodu výrobce - viz tabulka č. 6.

Tabulka č. 6: Ředění použitých sond od firmy BlueGnome a MetaSystems.

Název sondy	4p16.3/CE4 (BlueGnome/MetaSystems)	
	RP11-241P10 (4p16.3) – BlueGnome	XCE 4 - Metasystems
Reagencie – ředěná sonda [μ]	-	5
Reagencie – pufr LSI [μ]	5	-
Reagencie – sonda [μ]	0,5	-
Výsledný objem [μ]	5,5	5

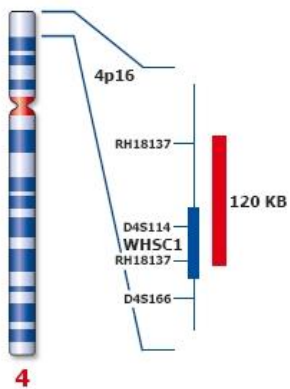
Denaturace sondy RP11-241P10 od firmy BlueGnome probíhá prvních 5 minut v termoblocku při 75 °C. Na dalších 5 minut sondu vložíme do ledu. Poté sondu vložíme do vyhřáté lázně na 37 °C. Sondu XCE 4 od firmy MetaSystems denaturujeme 5 minut při 73 °C. Po denuraci obě dvě sondy smícháme dohromady. MD Wolf-Hirschhorn WHSC1 (4p16) / SE4 sonda od firmy Kreatech je předem naředěna. Pro přípravu jednoho vzorku použijeme 8 μl předem naředěné sondy a denaturujeme ji při 90 °C po dobu 10 minut.

Použité sondy

- FIRMA KREATECH

MD Wolf-Hirschhorn WHSC1 (4p16) / SE4

Obrázek č. 13: Ideogram chromozómu 4 a vizualizace oblasti, na kterou se sonda váže (Kreatech Diagnostics, 2014 – www.kreatech.com).

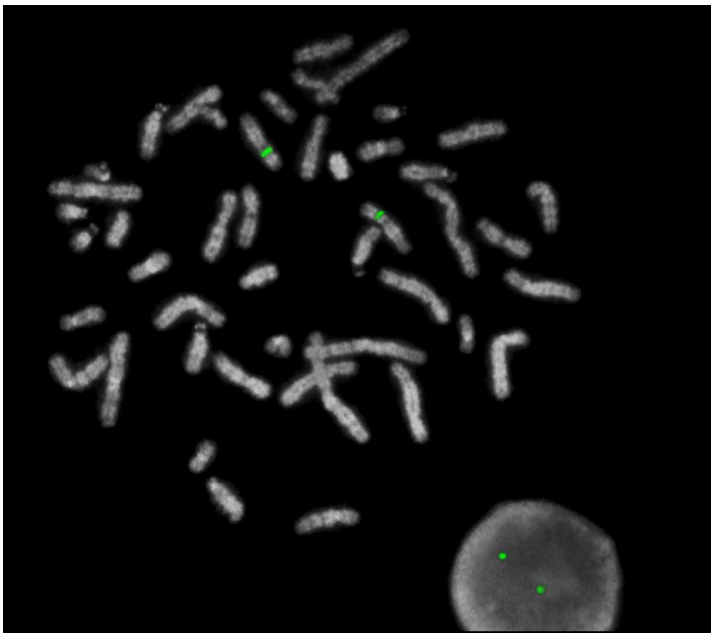


Sonda MD Wolf-Hirschhorn WHSC1 (4p16) / SE4 je specifickou sondou pro lokus 4p16.3. Sonda je optimalizovaná pro detekci počtu kopií Wolf-Hirschhorn v oblasti 4p16. Sonda detekuje oblast o velikosti 120 KB, která obsahuje gen *WHSC1*. Je značena červenou barvou.

- FIRMA METASYSTEMS

XCE 4

Obrázek č. 14: Ukázka navázání sondy XCE4 (MetaSystems USA Website, 2014 - www.metasystems-international.com).



XCE sondy hybridizují na oblasti lidské vysoce repetitivní sekvence (nazývané satelitní DNA), které jsou umístěny na centromerických oblastech chromozómů. XCE sondy poskytují ostré a jasné signály, které umožňují rychlou a přesnou identifikaci a stanovení počtu lidských chromozómů v metafázi a interfázních buňkách (MetaSystems USA Website, 2014 - www.metasystems-international.com).

- FIRMA BlueGnome

Sonda RP11-241P10 (4p16.3) je BAC sonda pokrývající oblast (4p16.3). Jedná se o komerční sondu, jejíž značení je možné podle potřeby vybrat. Pracovali jsme se sondou značenou červeným fluorochromem.

Hybridizace

Zdenaturovanou sondu napipetujeme na denaturovaný preparát a překryjeme krycím sklíčkem. Okraje krycího sklíčka oblepíme rubber-cementem, který zabraňuje vysychání sondy během hybridizace a sklo vložíme do hybridizační komůrky s 37 °C na 24 hodin.

Po skončení hybridizace sloupneme rubber-cement a odmyjeme zbytek nenavázané sondy v mycích roztocích. 0,4xSSC/0,3% NP40 ve vodní lázni při teplotě 73 °C po dobu 2 minut a 2xSSC/0,1% NP40 při laboratorní teplotě po dobu 2 minut. Po omytí skla preparát zamontujeme a podbarvíme interfázní jádra a mitózy na skle. Na sklo pipetujeme 10 µl DAPI a překryjeme krycím sklíčkem.

Hodnocení

Preparát hodnotíme ve fluorescenčním mikroskopu za použití příslušných fluorescenčních filtrů. Hodnotíme vždy minimálně 300 jader interfázních buněk a obraz snímáme za pomoci CCD kamery a ukládáme v softwaru ISIS (MetaSystems). Hodnocení a popis výsledků probíhá podle platných pravidel cytogenetické nomenklatury ISCN 2013. Výsledek podléhá kontrole vedoucího laboratoře.

4.3.2 Metoda FICTION

Biologický materiál

Buněčná suspenze (K nebo K24col) 45 pacientů – s nově diagnostikovaným MM nebo opakované kontrolní vyšetření.

Přístroje a pomůcky

Mraznička; lednička; centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA); pH metr Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA); skleněné kopoliny 25–30 ml; pipety (Gilson, Middleton, WI, USA); vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, Německo); inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK); inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK); plotýnka Medax (Nagel, Kiel, Německo); třepačka Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo); stolní centrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA); světelný mikroskop Olympus BX41; fluorescenční lampa U-RFL-T (obojí Olympus, Tokyo, Japonsko); CCD kamera (Metasystems, Altlussheim, Německo); počítač; software ISIS (Metasystems, Altlussheim, Německo)

Spotřební materiál

Plastové Eppendorfy 1,5 a 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo); Pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie); podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); krycí skla (18x18 mm, 22x22 mm, 24x24 mm) (Menzel-Gläser, Braunschweig, Německo); špičky (Gilson, Middleton, WI, USA); rubber cement

(Marabu, Tamm, Německo); 15ml plastové zkumavky (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Reagencie

Amca Anti-Human kappa-chain; Amca Anti-Human lambda-chain; Amca Anti-goat IgG (Vector Laboratories, Burlingame, USA); 10PBS pufr (lékárna FNOL); 0,1 M kyselina citronová (Lach-Ner, Neratovice, ČR); 0,1 M citronan sodný; 10 mM citrátový pufr (Lach-Ner, ČR); dH₂O (vyrábí si HOK); methanol; kyselina octová (obojí Lach-Ner, Neratovice, ČR); 20xSSC (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA); 70%, 80%, 90% a 96% etanol (Fagron, Nieuwerkerk a/d IJssel, Nizozemí); fluorescenčně značené sondy [14q32 – ON/IgH (Kreatech); 1q21/1p36 (Kreatech); LSI TP53/CEP 17 (Abbott); LSI 13 (RB1) 13q14 (Abbott), CEP 15 (Abbott); LSI IGH/FGFR3 – t(4;14) (Abbott); ON MYEOV/IGH – t(11;14) (Kreatech); MAF/IGH – t(14;16) (Kreatech)] (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA; Kreatech, Amsterdam, Nizozemí); antifade (Kreatech, Amsterdam, Nizozemí); NP40 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

Příprava roztoků:

- 10 mM citrátového pufru: citrátový pufr připravíme smísením – cca 9 ml 0,1 M kyseliny citronové + cca 41 ml 0,1 M citronanu sodného + cca 450 ml destilované vody.
- Příprava 0,1 M kyseliny citronové – cca 2,101 g kyseliny citronové + cca 100 ml destilované vody
- Příprava 0,1 M citronanu sodného – cca 4,941 g citronanu sodného + cca 100 ml destilované vody

- 1xPBS pufru: cca 5 ml 10xPBS + cca 45 ml destilované vody
- Ředění protilátek pomocí 1xPBS:
 - Amca Anti-Human kappa-chain 1 : 10
 - Amca Anti-Human lambda-chain 1 : 10
 - Amca Anti-goat IgG 1 : 20
- Fixační roztok: metanol : kyselina octová (v poměru 3 : 1)

Pracovní postup

Příprava biologického materiálu

Buněčnou suspenzi KD ve fixačním roztoku stočíme v centrifuze při cca 1000 ot/10 min. Poté odstraníme supernatant a suspenzi převrstvíme cca 10 ml 96% ethanolu. Roztok protřepeme a inkubujeme cca 15 min při pokojové teplotě. Poté vzorek opět zcentrifugujeme při cca 1000 ot/10 min a opakujeme předchozí krok. Po 15 min inkubace vzorek opět zcentrifugujeme. Po centrifugaci odsajeme supernatant a buněčnou suspenzi doplníme malým množstvím cca 1 ml 96% ethanolu (při větším množství vzorku musíme použít i větší množství ethanolu). Po ukončení vyšetření pacienta metodou FICTION převedeme buněčnou suspenzi z ethanolu zpátky do fixačního roztoku (opačným postupem).

Příprava preparátu:

Preparát připravíme nakapáním 2-3 kapek buněčné suspenze na podložní sklo, které popíšeme číslem pacienta a poté ho necháme volně uschnout. Pod světelným mikroskopem zkontrolujeme množství buněk. V případě nedostatečné hustoty buněk na skle, přikapeme další kapky buněčné suspenze dle potřeby. V případě nadbytku buněk na preparátu naředíme buněčnou suspenzi 96% etanolem a nakapeme nový preparát.

Do vodní lázně, která je vyhřátá na 95 °C vložíme koplínu s roztokem 10mM citrátového pufru a po jejím vytemperování do ní vložíme připravený preparát. Nakapané sklo inkubujeme cca 10 min. Poté vyjmeme koplínku se sklem z vodní lázně a necháme ji chládnout při pokojové teplotě cca 30 minut. Mezi tím si připravíme roztok 1xPBS pufru. Nakapané sklo opláchneme 2x po cca 2 minutách v 1xPBS pufru. Na vlhké sklo nanese cca 60 µl naředěné Amca Anti-Human kappa chain nebo Amca Anti-Human lambda-chain, překryjeme sklo parafilmem a inkubujeme cca 1 hodinu při cca 37 °C ve vlhké komůrce ve vodní lázni. Opatrně odstraníme parafilm a 2x po cca 2 minutách připravený preparát opláchneme v 1xPBS pufru. Poté nanese cca 60 µl naředěné Amca Anti-goat IgG a inkubujeme cca 1 hodinu při cca 37 °C ve vlhké komůrce ve vodní lázni. Poté opatrně odstraníme parafilm a 2x po cca 2 minutách opláchneme v 1xPBS pufru. Provedeme odvodnění skla promytím v vzestupné řadě ledových alkoholů (uchovaných při cca -20 °C). Skla inkubujeme po dobu cca 2 minut v 70%, 80%, 90% a 96% etanolu. Sklo přeneseme na plotýnku vytemperovanou na cca 45 °C a necháme uschnout.

Příprava sondy

Pacienti s diagnózou MM nebo MGUS, jsou metodou FICTION vyšetřeni rutinně panelem sond. Tento panel obsahuje fluorescenčně značené sondy pro detekci změn genu *IgH*, *RBI*, *TP53*, centromerické sondy pro určení početních změn

chromozómů 15 a 17 a sondu pro změny oblasti 1q21/1p36. Při zjištění přestavby genu *IgH* vyšetřujeme u pacientů dalšími sondami tyto translokace – t(4;14); t(11;14) a t(14;16).

Při vyšetření metodou FISH nebo FICTION používáme sondy od firmy Kreatech a Abbott Molecular. Sondy připravujeme dle doporučení firmy (dle příbalového letáku). Jsou dodávány buď naředěné nebo neředěné. Neředěné sondy (od firmy Abbott Molecular) musíme před použitím naředit následujícím způsobem (viz tabulka č. 7). Sondy od firmy Kreatech jsou dodávány naředěné. Používá se 8 µl.

Tabulka č. 7: Ředění sond (LSI, CEP) od firmy Abbott Molecular.

Název sondy	LSI TP53/c17; LSI IGH/FGFR3	LSI 13q14/CEP 15	
		LSI 13 (RB1) 13q14	CEP 15
Reagencie – hybridizační pufr [µl]	7	3,5	3,5
Reagencie – injekční H ₂ O [µl]	2	1	1
Reagencie – sonda [µl]	0,8	0,4	0,4
Výsledný objem [µl]	9,8	4,9	4,9

Sondy a pufrы jsou skladovány v mrazáku. Před jejich použitím je nutné je rozmrazit, zvortexovat a poté zcentrifugovat. Sondy si naředíme a připravíme k následné denaturaci. Sondy od firmy Abbott Molecular denaturujeme 5 minut při 73 °C a sondy od firmy Kreatech denaturujeme 10 minut při 90 °C. Po denaturaci sond (LSI 13 a CEP 15) sondy smícháme dohromady.

PANEL PRO VYŠETŘENÍ MM

Tabulka č. 8: Základní panel pro vyšetření MM.

NÁZEV SONDY	NÁLEZ
LSI ON/IGH (14q32) Break	Normální nález x translokace IgH
LSI TP53/CEP17	Normální nález x delece <i>TP53</i> ; normální nález x trizomie, tetrazomie, pentazomie chromozómu 17
LSI RB1/CEP 15	Normální nález x delece <i>RBI</i> ; normální nález x trizomie, tetrazomie, pentazomie chromozómu 15
LSI 1q21/1p36	Normální nález x změny počtu kopií v oblasti 1q21 a 1p36

Při potvrzení translokace IgH se dále hledá translokační partner – viz. tabulka č. 9.

Tabulka č. 9: Panel pro nález translokačního partnera.

NÁZEV SONDY	NÁLEZ
LSI IGH/FGFR3	Normální nález x translokace t(4;14)
LSI MYEOV/IGH	Normální nález x translokace t(11;14)
LSI MAF/IGH	Normální nález x translokace t(14;16)

Tabulka č. 10 Panel pro stanovení vysoce rizikových nemocných s MM.

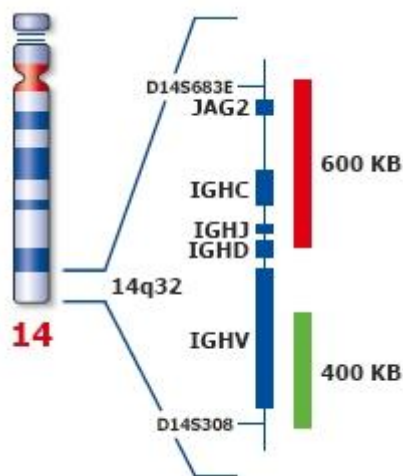
NÁZEV SONDY	NÁLEZ
LSI IGH/FGFR3	Normální nález x translokace t(4;14)
LSI MAF/IGH	Normální nález x translokace t(14;16)
LSI TP53/CEP17	Normální nález x delece <i>TP53</i>
LSI 1q21/1p36	Normální nález x zmnožení oblasti 1q21

Použité sondy

- FIRMA KREATECH

ON IGH (14q32) Break

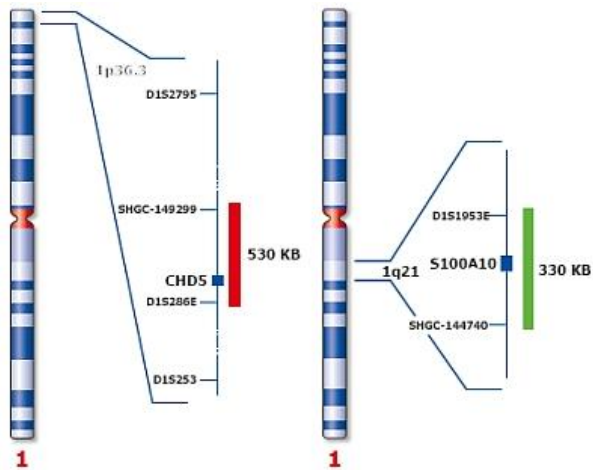
Obrázek č. 15: Ideogram chromozómu 14 a vizualizace oblasti, na kterou se váže sonda 14q32 (Kreatech Diagnostics, 2014 – www.kreatech.com).



LSI sonda 14q32 je konstruovaná pro detekci translokace zahrnující gen *IgH* v oblasti 14q32. Zelené emisní spektrum detekuje oblast o velikosti 400 KB a červené emisní spektrum detekuje oblast o velikosti 600 KB. V případě normálního nálezu a v přítomnosti obou chromozómů v mikroskopu pozorujeme 2 fúze (2F) - jak na chromozómech tak na interfázních jádrech. Při translokaci *IgH*, pozorujeme obraz jedné fúze, jeden červený a jeden zelený signál (1F1R1G). Obraz s jednou fúzí a jedním červeným signálem (1F1R) pozorujeme často, jedná-li se o fyziologickou delecii 5' konce genu *IgH*, která je značena zeleným fluorochromem, ale tento nálezn neznamená jednoznačně vyloučení přítomnosti translokace (Kreatech Diagnostics, 2014 - www.kreatech.com).

ON MM 1q21/SRD (1p36)

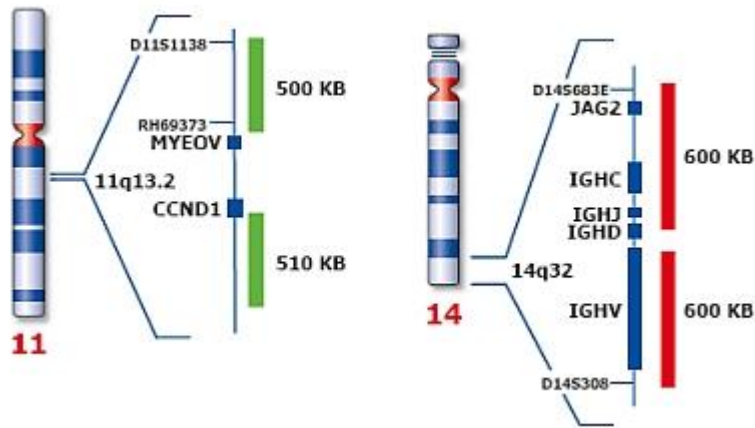
Obrázek č. 16: Ideogram chromozómu 1 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda 1q21/1p36 (Kreatech Diagnostics, 2014 - www.kreatech.com).



LSI sonda 1q21/1p36 je konstruována pro detekci počtu kopií na 1q v oblasti 1q21 a na 1p v oblasti 1p36. Zelené emisní spektrum zahrnuje oblast o velikosti 330 KB, obsahuje gen *S100A10* a lokusy D1S1953E, SHGC-144740. Červené emisní spektrum zahrnuje oblast o velikosti 530 KB, obsahuje gen *CHD5* a 4 lokusy (D1S2795, SHGC-149299, D1S286E a D1S253). Normální nález vidíme v mikroskopu jako 2 zelené a 2 červené signály (2G2R). Větší množství signálů svědčí o zmnožení nebo amplifikaci určité oblasti, naopak 1 červený signál poukazuje na delecí 1p (Kreatech Diagnostics, 2014 - www.kreatech.com).

ON MYEOV/IGH t(11;14) Fusion

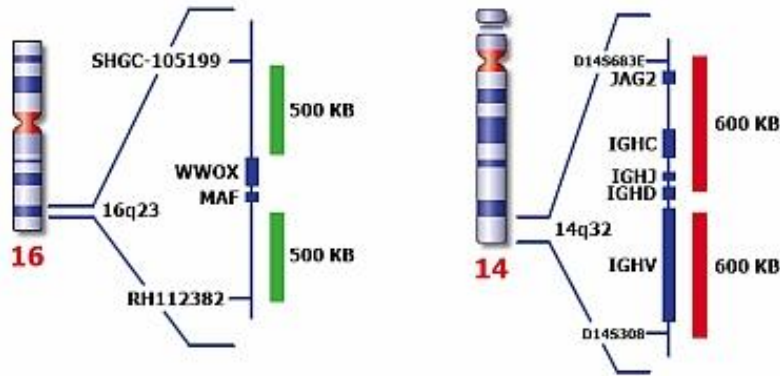
Obrázek č. 17: Ideogram chromozómů 11, 14 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda ON MYEOV/IGH (Kreatech Diagnostics, 2014 - www.kreatech.com).



LSI sonda ON MYEOV/IGH je konstruována pro detekci translokace t(11;14). Zelené emisní spektrum obsahuje 2 části o velikosti 500 KB a 510 KB. Část o velikosti 500 KB obsahuje lokusy (D11S1138, RH69373). Zlomy jsou pozorovány v oblasti o velikosti 360 KB mezi geny *MYEOV* a *CCND1*. Červené emisní spektrum obsahuje také 2 části, obě o velikost 600 KB. Jedna oblast obsahuje geny (*JAG2*, *IGHC*, *IGHI* a část genu *IGHD*) a lokus (D14S683E). Druhá oblast zahrnuje gen *IGHV* a lokus D14S308. Při translokaci zůstává jeden chromozóm 11 normální (1G signál), zatímco druhý chromozóm 11 je přestavěný, kdy část o velikosti 500 KB zůstává přítomna na chromozómu 11 a druhá část o velikosti 510 KB je translokována na chromozóm 14. Z chromozómu 14 je translokovaná 5' oblast genu *IgH* o velikosti 600 KB na chromozóm 11. Tím dojde k fúzi obou genů, které v mikroskopu vidíme jako 2 fúze (2F), jeden normální signál pro *IgH* normálního chromozómu 14 a jeden signál pro normální oblast 11q13.2 (1R1G). Běžným obrazem translokace je tedy obraz, kde vidíme dvě fúze, jeden signál červený a jeden zelený (2F1R1G). Normálním nálezem jsou 2R2G signály (Kreatech Diagnostics, 2014 - www.kreatech.com).

ON MAF/IGH t(14;16) Fusion

Obrázek č. 18: Ideogram chromozómů 14, 16 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda MAF/IGH (Kreatech Diagnostics, 2014 - www.kreatech.com).

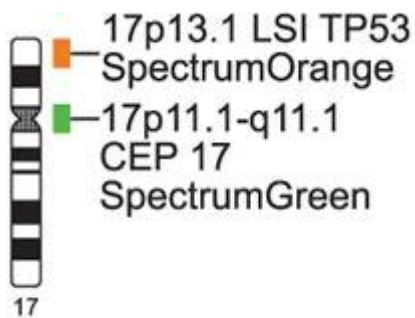


LSI sonda MAF/IGH je konstruována jako dvoubarevná fúzní sonda. Zelené emisní spektrum obsahuje 2 části o velikosti 500 KB. Červené emisní spektrum se skládá ze 2 částí o velikosti 600 KB. První červené emisní spektrum obsahuje několik genů (*JAG2*, *IGHC*, *IGHI* a část genu *IGHD*) a lokus D14S683E. Druhé červené emisní spektrum obsahuje *IGHV* a lokus D14S308. Běžným obrazem translokace t(14;16) jsou 2F1R1G stejně jak je popsána translokace t(11;14). Normálním obrazem jsou 2R2G signály (Kreatech Diagnostics, 2014 - www.kreatech.com).

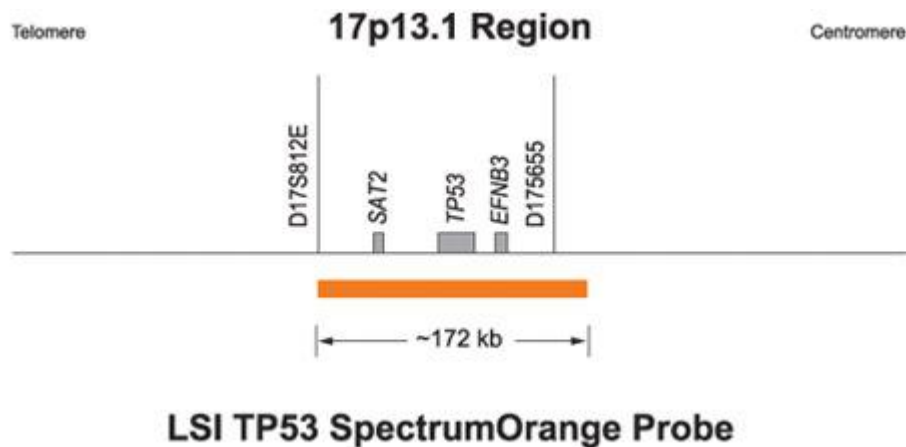
- FIRMA ABBOTT MOLECULAR

LSI TP53 / CEP 17

Obrázek č. 19: Ideogram chromozómu 17 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda LSI TP53 / CEP 17 (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).



Obrázek č. 20: Vizualizace oblasti 17p13.1, na kterou se váže sonda LSI TP53 (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).

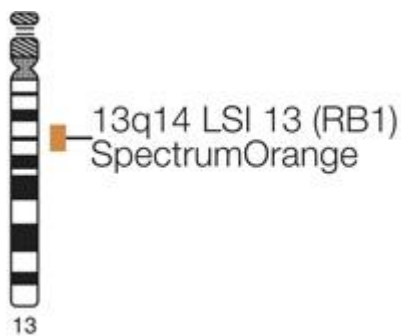


Sonda LSI TP53 / CEP 17 je konstruována pro detekci genu *TP53* (možnou delecí genu) a centromerické oblasti chromozómu 17. Oranžové emisní spektrum obsahuje několik genů (*SAT2*, *TP53* a *EFNB3*), zároveň obsahuje 2 lokusy (*D17S812E* a *D175655*). Zelené emisní spektrum označuje oblast centromery 17. Normálním

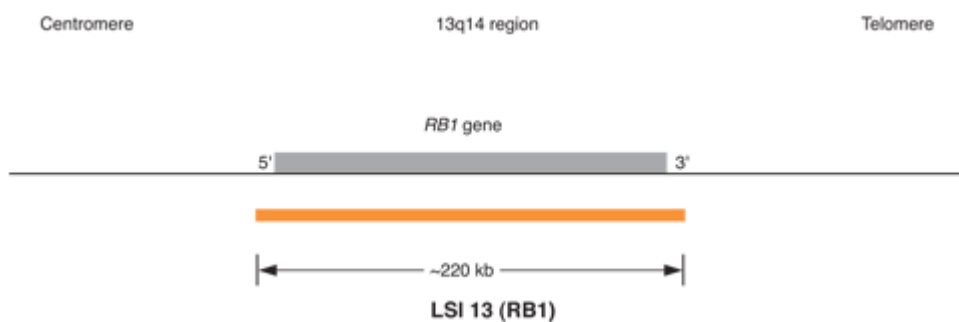
obrazem v mikroskopu jsou 2R2G signály. Deleci genu *TP53* vidíme v mikroskopu jako 1R2G signály (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).

LSI 13 (RB1) 13q14

Obrázek č. 21: Ideogram chromozómu 13 a vizualizace oblasti, na kterou se váže sonda LSI 13 (RB1) 13q14 (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).



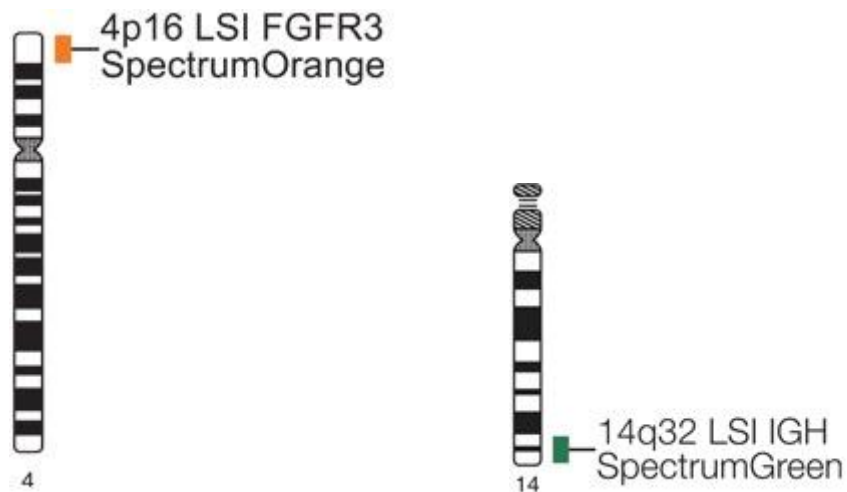
Obrázek č. 22: Vizualizace oblasti 13q14, na kterou se váže sonda LSI 13 (RB1) 13q14 (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).



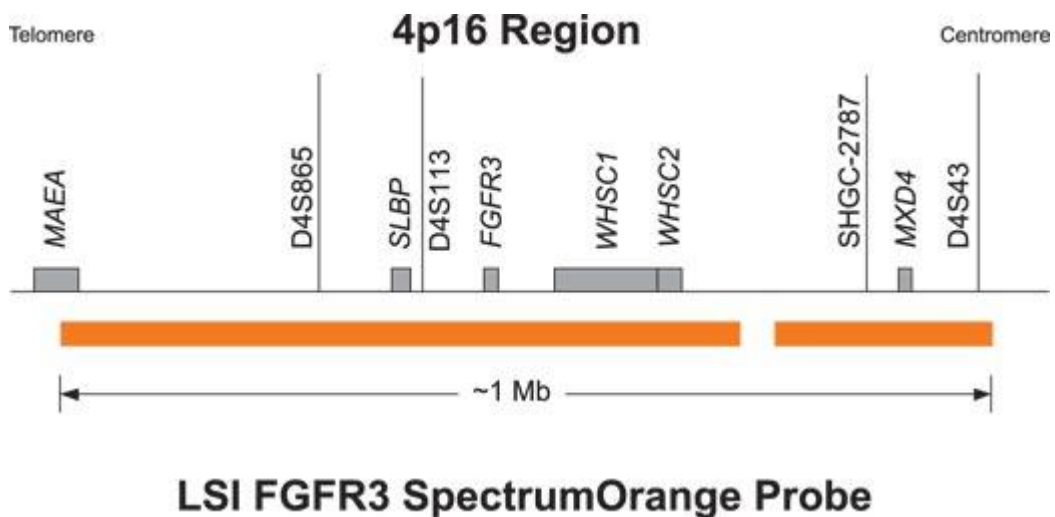
Sonda LSI 13 (RB1) 13q14 je konstruována pro detekci genu *RB1*, který leží v oblasti 13q14. Oranžové spektrum obsahuje gen *RB1*. Tato sonda se používá v kombinaci s centromerickými sondami (v našem případě sondou pro detekci centromery 15 nebo 9). V kombinaci s CEP 15 nebo CEP 9, které jsou značeny zelenou barvou, v mikroskopu vidíme jako normální obraz 2R2G signály. V případě delece *RB1* vidíme 1R2G (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).

Vysis IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit

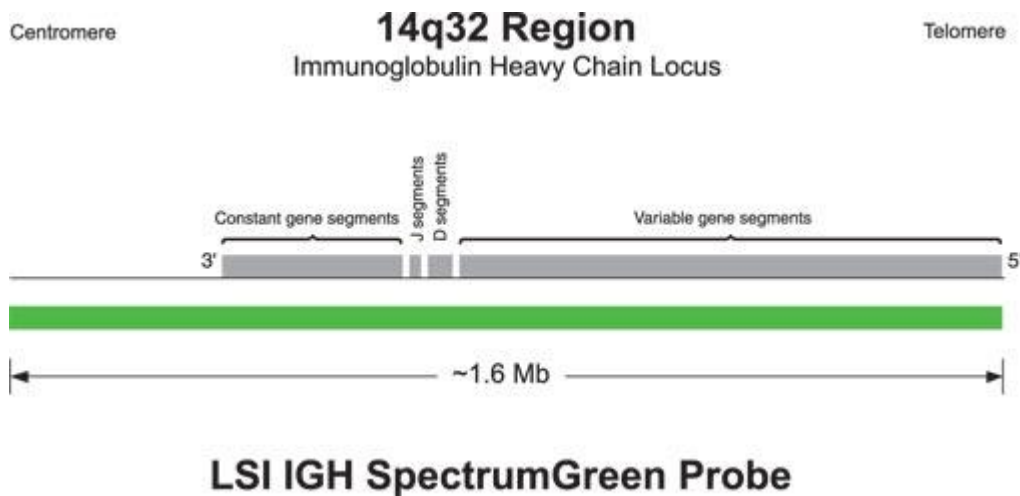
Obrázek č. 23: Ideogram chromozómů 4, 14 a vizualizace oblastí, na které se váže sonda IGH/FGFR3 (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).



Obrázek č. 24: Vizualizace oblasti 4p16, na kterou se váže sonda pro detekci genu FGFR3 (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).



Obrázek č. 25: Vizualizace oblasti 14q32, na kterou se váže sonda pro detekci lokusu těžkého imunoglobulinového řetězce (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).



Sonda IGH/FGFR3 je konstruovaná pro detekci translokace t(4;14). Oranžově značená část sondy pokrývá oblast o velikosti 1 MB, která je rozdělena na 3 části. Jedna část zahrnuje několik genů, mezi kterými jsou obsaženy geny *FGFR3*, *WHSC1* a *WHSC2* (*MMSET*). V teoretické části - viz. kapitola 3.4.5.2 jsem se již zmínila o funkci těchto genů. Oba dva tyto geny jsou zapojeny v translokaci t(4;14). Při použití této sondy nemůžeme rozlišit, který gen je do translokace zahrnut. Pro odlišení těchto genů v translokaci jsme vybrali následující sondy [MD Wolf-Hirschhorn *WHSC1* (4p16)/SE4 – Kreatech; RP11-241P10 (4p16.3)/XCE4 (BAC Clone BlueGnome/MetaSystems)], se kterými jsem provedla vyšetření pomocí metody FISH. Oblast 14q32 je značena zelenou barvou a sonda pokrývá oblast o velikosti 1,6 MB. Při běžném obrazu translokace v mikroskopu vidíme 2F1G1R signály. Při normálním nálezu vidíme 2G2R signály (Abbott Molecular, 2014 - www.abbottmolecular.com).

Hybridizace

Zdenaturovanou sondu napipetujeme na připravený preparát a překryjeme krycím sklíčkem o velikosti (22x22). Okraje krycího sklíčka oblepíme rubber-

cementem, který zabrání vyschnutí sondy během hybridizace a sklo vložíme do hybridizační komůrky s 37 °C po dobu 24 hodin.

Druhý den odstraníme rubber-cement, krycí sklíčko a poté musíme odmyt zbytek nenavázané sondy pomocí inkubace skla v mycích roztocích (0,4xSSC/0,3% NP40) ve vodní lázni při teplotě 73 °C po dobu 2 minut a (2xSSC/0,1% NP40) při laboratorní teplotě po dobu 2 minut. Po odmytí skla preparát zamontujeme pomocí Antifade. Na sklo napipetujeme cca 10 µl Antifade a překryjeme ho krycím sklíčkem o velikosti (24x24).

Hodnocení

Preparát hodnotíme ve fluorescenčním mikroskopu za použití příslušných fluorescenčních filtrů. Hodnotíme 100 plazmatických buněk, které jsou obarveny modře, díky účinkům specifických protilátek Amca Anti-Human kappa-chain nebo Amca Anti-Human lambda-chain. Obraz snímáme pomocí CD kamery a ukládáme je v softwaru ISIS (MetaSystems). Hodnocení a popis výsledku probíhá podle platných pravidel cytogenetické nomenklatury ISCN 2013. Výsledek podléhá kontrole vedoucího laboratoře.

4.3.3 Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH)

Příprava roztoků

- 20xSSC: navážíme 132 g 20xSSC, rozpustíme v 500 ml deionizované H₂O a pH upravíme na 7,0. Roztok uchováváme při laboratorní teplotě.
- 1N NaOH: 40 g NaOH rozpustíme v 1 l deionizované H₂O
- 0,07 N NaOH: 14 ml 1 N NaOH + 186 ml deionizované vody

- 2xSSC: 50 ml 20xSSC + 450 ml neionizované vody, pH 7,0 – 7,5
- 0,1xSSC: 2,5 ml 20xSSC + 497,5 ml deionizované vody

Příprava preparátu

Preparát připravíme nakapáním 2-3 kapek buněčné suspenze na podložní sklo, které si předtím popíšeme iniciály pacienta. Nakapaný preparát necháme volně uschnout. Pod světelným mikroskopem zkontrolujeme množství mitóz na preparátu a v případě jejich nedostatku na sklo přikapeme další kapky buněčné suspenze dle potřeby. V případě nadbytku buněk a mitóz na preparátu, naředíme buněčnou suspenzi fixačním roztokem Carnoye a nakapeme nový preparát. Suché sklo inkubujeme cca 20 minut v termostatu při cca 37 °C. Před skončením inkubační doby si připravíme roztoky do skleněných koplínek a vytemperujeme je v lázni (0,07 N NaOH – laboratorní teplota; 2xSSC – cca 4 °C a cca 70 °C; 0,1xSSC – cca 4 °C a laboratorní teplota). Sklo vyjmeme z termostatu a provedeme odvodnění skla promytím ve vzestupné řadě ledových alkoholů (uchovávané při -20 °C), inkubace trvá po dobu cca 1 minuty v 70%, 80%, 90% a 96% ethanolu. Sklo přeneseme do koplíčky s 0,1xSSC na cca 1 minutu při laboratorní teplotě. Inkubaci skla ve 2xSSC provedeme ve vodní lázni při cca 70 °C po dobu cca 30 minut. Po uplynulé době vyjmeme koplíčku z lázně a chladíme ji cca 20 minut ve vodní lázni při cca 37 °C. Sklo přeneseme do 0,1xSSC při laboratorní teplotě cca 1 minutu. Sklo denaturujeme v roztoku 0,07N NaOH po dobu cca 1 minuty při laboratorní teplotě. Sklo přeneseme do 0,1xSSC na cca 1 minutu při cca 4 °C a poté do 0,2xSSC na cca 1 minutu při 4 °C. Poté provedeme odvodnění skla promytím ve vzestupné řadě ledových alkoholů (uchovávaných při -20 °C). Inkubace trvá cca 1 minutu v 70%, 80%, 90% a 96% ethanolu. Sklo přeneseme na plotýnku vytemperovanou na 45 °C a necháme ho uschnout.

Příprava sond

Na krycí sklo o velikosti 22x22 mm použijeme cca 8 μ l sondy (24XCyteDNAProbe – MetaSystems), kterou odpipetujeme do 0,2 ml ependorfky. Sondy denaturujeme v termocycleru (program MFISH) při teplotě 75 °C po dobu 5 minut, ve druhém kroku sondu zchladíme na 10 °C na 30 sekund. Na konec se sonda uchovává 30 minut při 37 °C.

Hybridizace

Na denaturovaný preparát napipetujeme denaturovanou sondu a překryjeme ji krycím sklíčkem. Okraje krycího sklíčka oblepíme rubber-cementem, který zabraňuje vysychání sondy během hybridizace. Hybridizaci provádíme 48-72 hodin při cca 37 °C. Zbytek nenavázané sondy je po ukončení hybridizace třeba odmyt v mycích roztocích (0,4xSSC ve vodní lázni při teplotě cca 72 °C po dobu cca 2 minuty; 2xSSC/0,05% Tween20 při laboratorní teplotě po dobu cca 30 sekund). Po omytí skla preparát zamontujeme a podbarvíme interfázní jádra a mitózy na skle. Na sklo pipetujeme cca 10 μ l DAPI a překryjeme ho krycím sklíčkem 24x24 mm.

Hodnocení

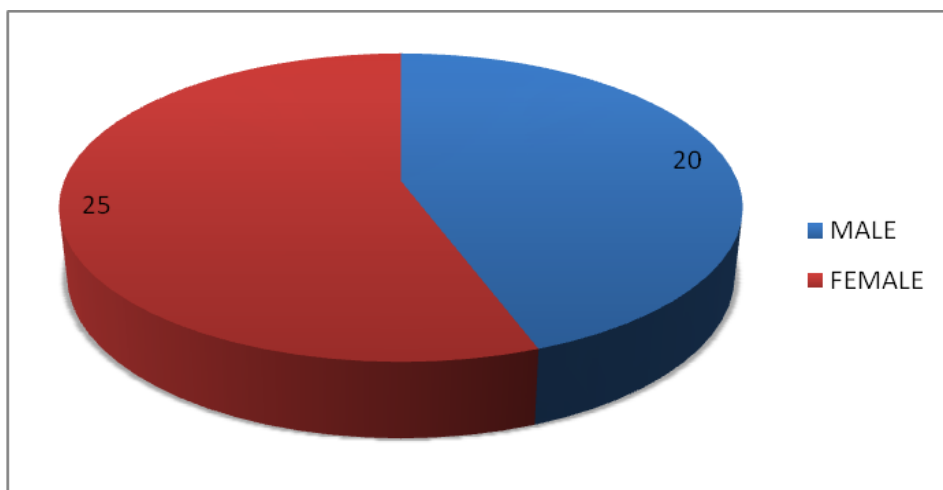
Preparát hodnotíme ve fluorescenčním mikroskopu za použití příslušných fluorescenčních filtrů, mitózy buď vyhledáváme manuálně nebo pomocí automatického vyhledávače metafází Metafer4. Reprezentativní počet mitóz je snímán za pomoci CCD kamery a ukládán v systému ISIS (MetaSystems). Nasnímané metafáze zkaryotypujeme a hodnotíme za pomoci programu M-FISH (MetaSystems). Hodnocení a popis výsledku probíhá podle platných pravidel cytogenetické nomenklatury ISCN 2013. Výsledek podléhá kontrole vedoucího laboratoře.

5 SOUBOR ANALYZOVANÝCH NEMOCNÝCH

Praktická část diplomové práce je zaměřena na studium genových změn souvisejících s translokací genu pro těžký řetězec imunoglobulinu s důrazem na variantní nálezy metodou FICTION u translokace t(4;14), t(11;14) a t(14;16).

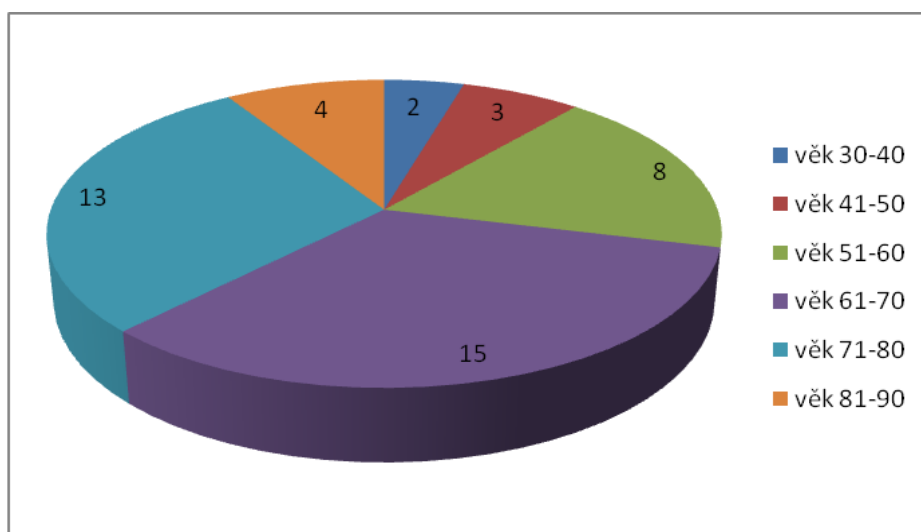
Analyzovaný soubor nemocných tvořilo 45 pacientů, které jsem vyšetřila v období od června roku 2012 do října roku 2013. Soubor tvořilo 25 žen a 20 mužů (graf č. 1).

Graf č. 1: Poměr pohlaví v analyzovaném souboru.



Věk v době diagnózy se pohyboval od 34 do 88 let s mediánem věku 65 let (graf č. 2).

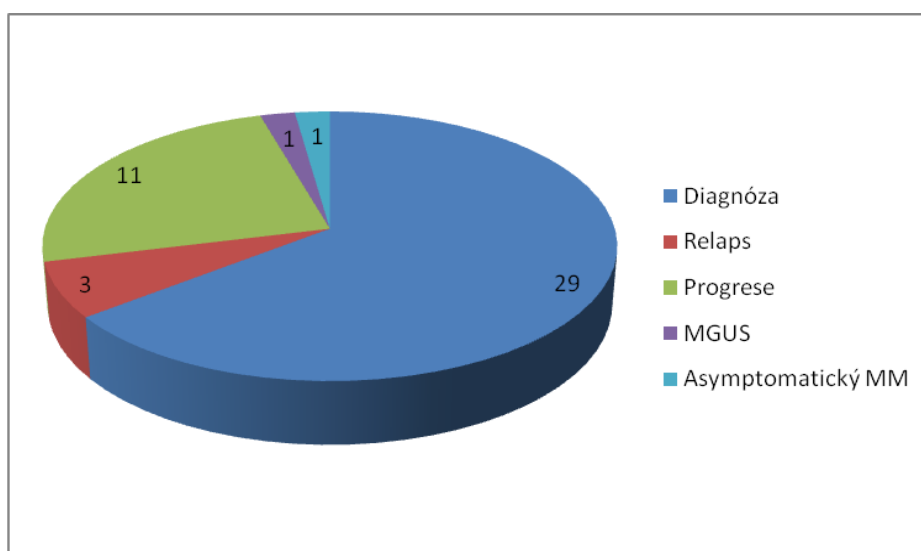
Graf č. 2: Věk v době diagnózy pacientů v analyzovaném souboru.



Tito pacienti byli sledováni na III. interní klinice FN a LF UP v Olomouci a vyšetřeni v Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoři HOK FN Olomouc.

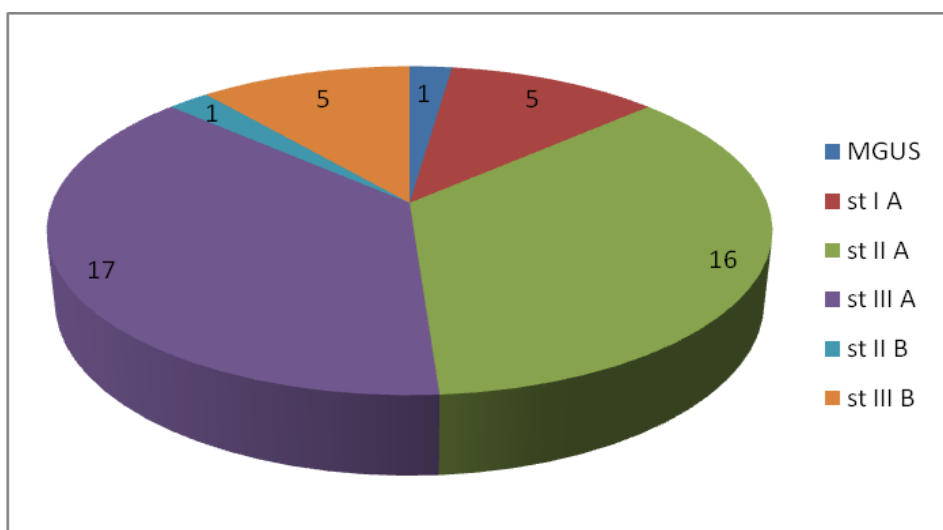
Do souboru byli zařazeni nově diagnostikovaní pacienti (29), pacienti v relapsu (3) nebo progresi MM (11), pacient s MGUS (1) a pacient s asymptomatickým MM (1) (graf č. 3).

Graf č. 3: Poměr zastoupení jednotlivých fází onemocnění v analyzovaném souboru pacientů.



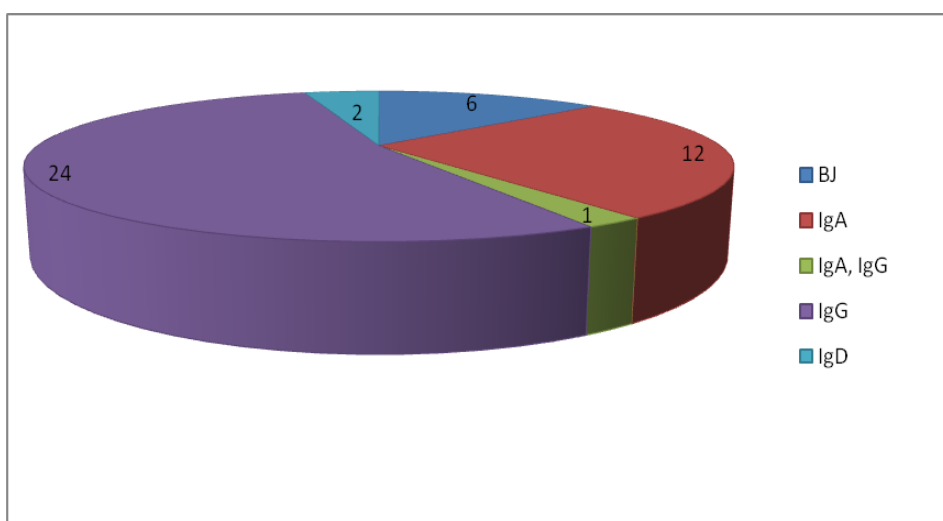
Stádia pacientů byla hodnocena podle Durie a Salmona (graf č. 4).

Graf č. 4: Poměr stádií onemocnění MM dle klasifikace Durie a Salmona.



Nejčastějším typem MM byl IgG (24/53,3 %) (graf č. 5).

Graf č. 5: Poměr typů MM.



U všech pacientů byla vyšetřena KD. Procento plazmatických buněk bylo určeno morfologicky z nátěru KD. Medián zastoupení plazmatických buněk v KD byl 30,4 %.

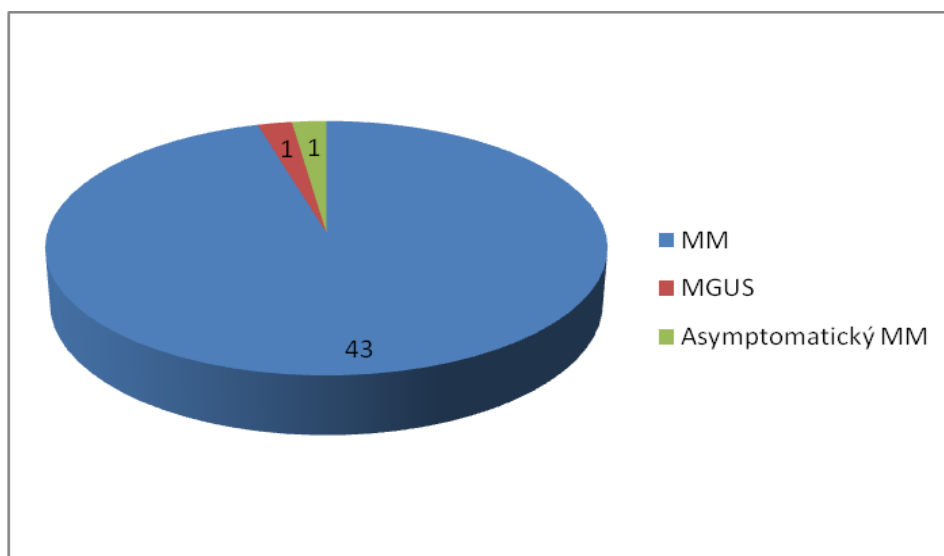
5.1 Detailní analýza pacientů s MGUS a asymptomatickým MM

V souboru jsem hodnotila 1 pacienta s MGUS a jednoho pacienta s asymptomatickým MM. Klasickou cytogenetickou analýzou se u těchto pacientů nenašly žádné změny v karyotypu. Metodou FICTION byla u obou nemocných nalezena přestavba genu *IgH*. U nemocného se MGUS se nepodařilo nalézt translokačního partnera. Vyloučeny byly geny *CCND1*, *FGFR3* a *c-MAF*. U pacienta s asymptomatickým MM byla potvrzena translokace t(11;14).

5.2 Detailní analýza pacientů s MM

Celkově bylo vyšetřeno 43 pacientů s MM (graf č. 6). Pacienti byli vyšetřeni klasickou cytogenetikou a metodou FICTION dle základního panelu pro vyšetření MM (viz kapitola 4.3.2 Metoda FICTION, tabulka č. 8, 9).

Graf č. 6: Poměr zastoupení jednotlivých diagnóz v analyzovaném souboru pacientů.



Klasická cytogenetická analýza

U 5/43 (11,6 %) pacientů byly nalezeny změny pomocí klasické cytogenetické analýzy, z toho u dvou pacientů se jednalo o komplexní karyotyp (tabulka č. 11).

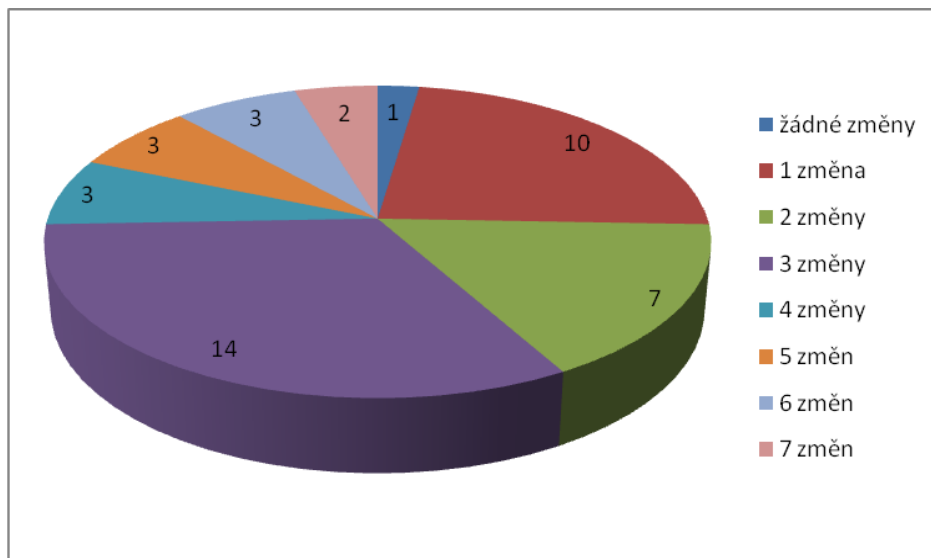
Tabulka č. 11: Změny karyotypu zjištěné pomocí klasické cytogenetické analýzy.

Pacient číslo:	Změny	Komplexní karyotyp
1	45,X,-Y[10]/ 46,XY[22]	-
2	46,XX,der(4),der(16)[6]/46,XX[1]	-
3	-	44,XY, ?add(1q),der(2),-2, der(3), add(11p),13,add(14q),-15,-16,-17, -19,+4mar[cp4]/46,XY[9]
4	45,X,-Y[5] / 46,XY[24]	-
5	-	45-49,XX,der(1),+der(1),der(2), ?+6,?der(11), 15,+2mar[cp7]/ 46,XX[13]

Metoda FICTION

Metodou FICTION bylo vyšetřeno všech 43 pacientů s MM. U 42 pacientů byly touto metodou nalezeny genetické změny. Počet nalezených změn je znázorněn v grafu č. 7. Tyto změny byly hodnoceny pouze v interfázních jádrech.

Graf č. 7: Poměr zastoupení početních změn nalezených pomocí metody FICTION u pacientů s MM.



Pouze u jednoho pacienta nebyly nalezeny žádné změny. U 10 pacientů byla nalezena pouze 1 změna – u 6 pacientů se jednalo o přestavbu genu *IgH*, u 3 pacientů byly nalezeny početní změny chromozómu 15 a u jednoho početní změny oblasti 1q21.

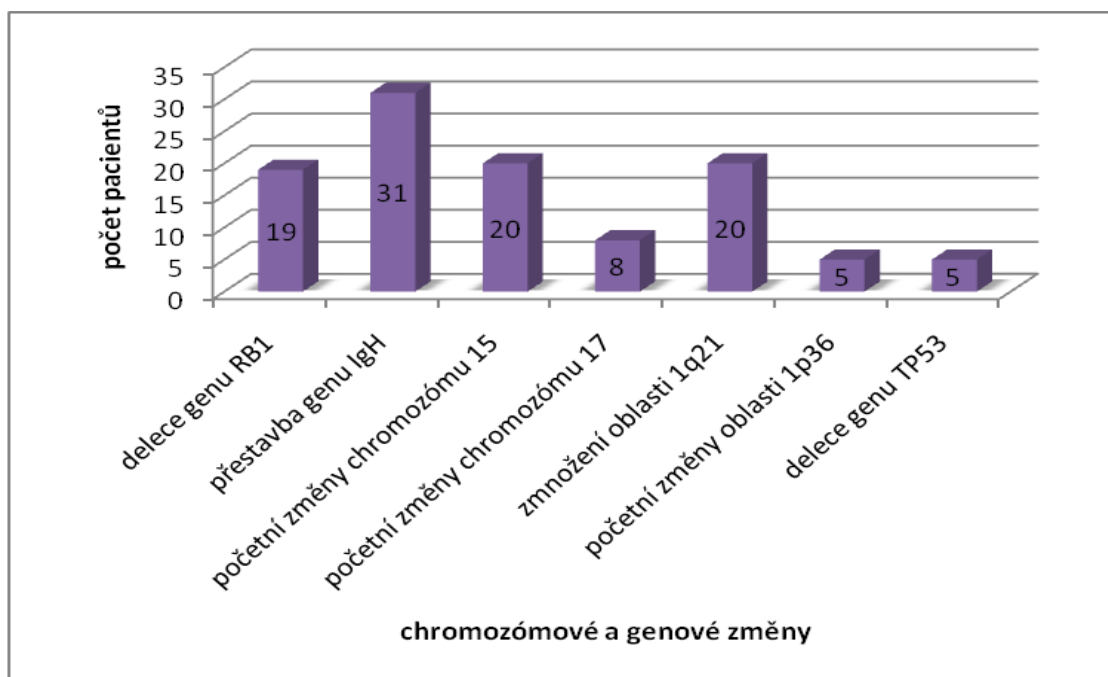
U 7 pacientů byly nalezeny 2 změny. U 3 pacientů se vyskytovala přestavba genu *IgH* společně s delecí *RBI*. U jednoho pacienta se vyskytovala také přestavba genu *IgH* společně s trizomií chromozómu 15 a u druhého pacienta přestavba *IgH* s amplifikací oblasti 1q21. V jednom případě se vyskytla delece genu *RBI*, společně s trizomií chromozómu 15. U posledního pacienta byly nalezeny pouze početní změny, a to trizomie chromozómu 15 a 17.

U 14 pacientů se vyskytovaly 3 genetické změny. U 7 pacientů se jednalo o přestavbu genu *IgH*, společně s delecí *RB1* a amplifikací oblasti 1q21. U dalších 7 pacientů byly chromozómové změny náhodně kombinovány.

U dalších pacientů, u kterých bylo nalezeno 4 – 7 změn (strukturních nebo početních), nelze určit jejich společný výskyt. Výskyt 3 a více změn hodnotíme jako nález komplexních změn a ty se v souboru vyskytovaly u 25 nemocných.

Celkový výskyt genetických a chromozómových změn u pacientů s MM je shrnut v grafu č. 8.

Graf č. 8: Zastoupení genetických a chromozómových změn u pacientů s MM.



Přestavba genu *IgH* byla detekována u 31 pacientů. Konkrétní zastoupení přestaveb *IgH* je zobrazeno v grafu č. 9. Z těchto 31 pacientů mělo 16 pacientů společně s touto přestavbou delecí genu *RB1*, 10 pacientů mělo početní změny chromozómů 15, 4 pacienti měli přestavbu genu *IgH* společně s tetrazomií chromozómu 17. Trizomie chromozómu 17 se vyskytovala společně s přestavbou genu *IgH* u jednoho pacienta.

Početní změny chromozómů 15 a 17 se vyskytovaly v různých kombinacích. U 9 pacientů byla detekována pouze trizomie chromozómu 15, v kombinaci s tetrazomií chromozómu 15 se vyskytovala u 8 pacientů a v kombinaci s tetrazomií a pentazomií chromozómu 15 pouze u 2 pacientů. Kombinace tetrazomie a pentazomie chromozómu 15 byla nalezena pouze u 1 pacienta. Trizomie chromozómu 17 se vyskytovala u 3 pacientů, společně s tetrazomií chromozómu 17 byla detekována u 1 pacienta. Samostatná tetrazomie chromozómu 17 se vyskytovala u 4 pacientů.

Početní změny chromozómu 15 se vyskytovaly společně s přestavbou genu *IgH* u 10 pacientů. Trizomie chromozómu 17 se vyskytovala společně s přestavbou genu *IgH* u 2 pacientů, tetrazomie chromozómu 17 byla prokázána společně s přestavbou genu *IgH* u 4 pacientů.

Zmnožení oblasti 1q21 byla detekována u 20 pacientů, společně se změnou počtu kopií 1p36 se vyskytovala u 5 pacientů. Zmnožení oblasti 1q21 se vyskytovala společně s přestavbou genu *IgH* u 15 pacientů.

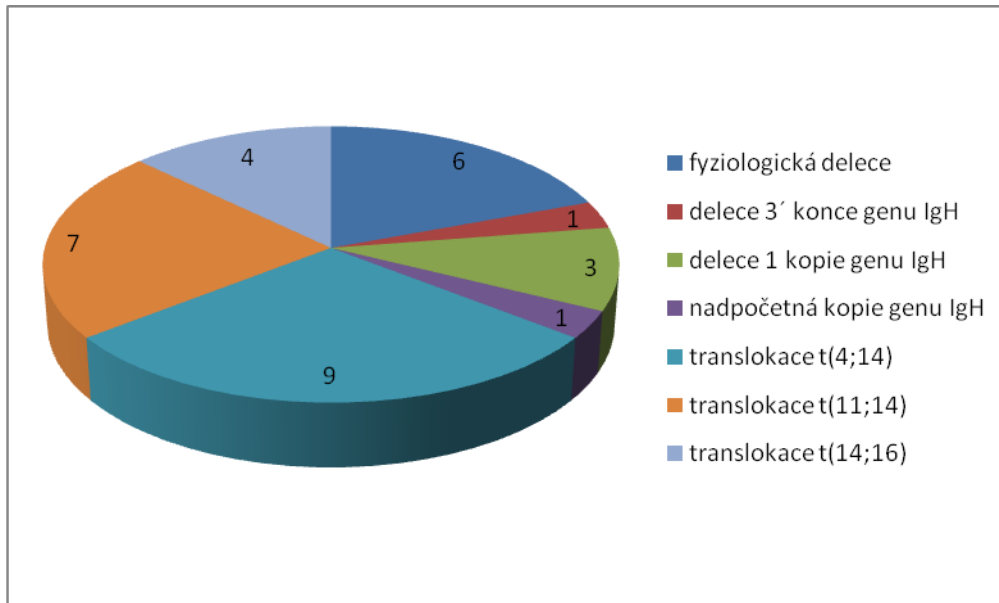
U 5 pacientů byla detekována delece genu *TP53*. U 4 pacientů se delece genu *TP53* vyskytovala společně s přestavbou genu *IgH*.

10 pacientů s MM bylo vyšetřeno opakovaně, a to v diagnóze a poté v době relapsu nebo progresu onemocnění. U většiny pacientů se v době progresu zvyšoval počet kopií oblasti 1q21 (ze 3 → na 4 a více), zároveň se zvyšovalo procento plazmatických buněk s danou změnou. Pouze u 1 pacienta došlo ke klonálnímu vývoji a byla nalezena trizomie společně s tetrazomií chromozómu 17 a 5-6 kopií chromozómu 15, které nebyly nalezeny v době diagnózy.

5.2.1 Přestavba genu *IgH* u pacientů s MM

Přestavba genu *IgH* byla detekována u 31 pacientů s MM. Poměr zastoupení jednotlivých typů přestavby genu *IgH* je zobrazen v grafu č. 9.

Graf č. 9: Poměr zastoupení jednotlivých typů přestavby genu *IgH*.



U 6 pacientů byla detekována delece 5' konce *IgH* genu (fyziologická delece). V mikroskopu vidíme klasický obraz pro fyziologickou delecí 1F1R [pro vyloučení translokace jsem vždy provedla kontrolu nasazením sondy pro translokaci t(4;14)]. U jednoho pacienta byla detekována delece 3' konce *IgH* genu (1F1G), u 3 pacientů byla detekována delece jedné kopie genu *IgH* (1F). U 1 pacienta byla detekována nadpočetná kopie genu *IgH*.

U 9 pacientů byla prokázána translokace t(4;14), translokace t(11;14) byla prokázána u 7 pacientů a t(14;16) byla detekována u 4 pacientů.

5.2.1.1 Translokace t(4;14) u pacientů s MM

Translokace t(4;14) byla prokázána u 9 pacientů (klinická data těchto pacientů viz tabulka č. 12), u kterých se dále provedla detailní analýza genu *FGFR3* a *MMSET*.

Tabulka č. 12: Klinická data pacientů s translokací t(4;14).

Pacient číslo	Pohlaví M/F	Věk v období dg.	Stádium onemocnění	% plazmatických buněk	Typ MM	IgK/L
1	M	48	st II A	18,8	IgG	K
2	F	61	st III B	16	BJ	L
3	F	82	st II A	23,6	IgA	K
4	M	65	st III B	33	BJ	L
5	M	61	st II A	14,4	IgG	K
6	F	66	st III A	38,6	IgG	L
7	M	58	st II A	96,4	IgA	K
8	F	72	st II A	33	IgG	L
9	F	52	st III A	72,8	IgG	K

V tabulce č. 13 jsou zobrazeny výsledky analýzy metodou FICTION. V tabulce č. 14 jsou výsledky analýzy genů *FGFR3* a *MMSET*. V tabulce jsou uvedeny různé varianty signálů, které byly detekovány u pacientů a jejich procentuální zastoupení. U pacientů 5, 6, 7 a 8 jsem našla více klonů plazmatických buněk s odlišným procentuálním zastoupením.

Detailní analýza genu *FGFR3* a *MMSET* ukázala, že u pacientů s translokací t(4;14) můžeme metodou FICTON často pozorovat variantní nálezy signálů, které naznačují přítomnost dalších subklonálních populací s početními změnami chromozómů vstupujících do translokace.

Potencionální umístění genů *FGFR3* a *MMSET* je zobrazeno ve schématech t(4;14) u jednotlivých pacientů.

Tabulka č. 13: Variantní nálezy přestavby genu *IgH* a translokaci t(4;14).

PACIENT ČÍSLO:	PŘESTAVBA GENU <i>IgH</i> (METODA FICTION)	TRANSLOKACE t(4;14) (METODA FICTION)	VARIANTNÍ NÁLEZ FICTION
1	1F1R1G (84%)	2F1R1G (82 %)	x
2	1R1G (81%)	2F1R (78 %)	variantní
3	1F1R1G (93%)	2F1R1G (90 %)	x
4	2G1R (83%)	3F1R (74 %)	variantní
5	1F1R1G; 1F2R1G	2F1R1G (70 %); 3F1R1G (16 %)	variantní
6	1F1R1G (64 %); 1F3R2G (16 %); 1F3R1G (13 %)	2F1R1G (44 %); 4F2R2G (12 %); 4F1R1G (10 %)	variantní
7	1R2G (84 %)	3F1R (85 %); 2F1R (15 %)	variantní
8	1F1R2G; 1F1R; 1F1R1G	1F1R3G (53 %); 1F1R2G (41,6 %)	variantní
9	1F1R1G	2F1R1G (93 %)	x

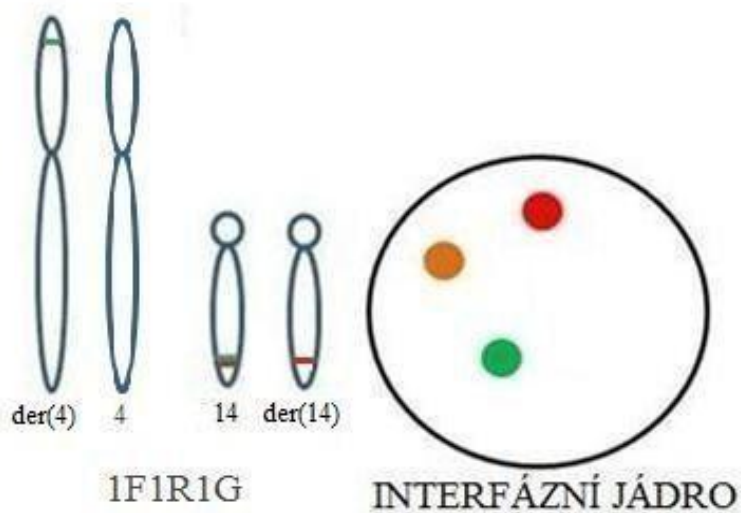
Tabulka č. 14: Výsledek analýzy genu *FGFR3* a *MMSET*.

PACIENT ČÍSLO:	FGFR3/c4 (METODA FISH)	MMSET/SE4 (METODA FISH)
1	2G2R – 100 %	2G2R – 100 %
2	2G2R – 88 %; 2G1R – 12 %	2G2R – 89 %; 2G1R – 11 %
3	2G2R – 100 %	2G2R – 100 %
4	2G2R – 83 %, 3G3R – 17 %	2G2R – 79 %; 3G3R – 21 %
5	2G2R – 82 %; 2G3R – 18 %	2G2R – 86,8 %; 2G3R – 13,2 %
6	2G2R – 82 %; 2G3R – 9 %, 2G4R – 9 %	2G2R – 91 %; 2G3R – 9 %
7	2G2R – 85 %; 1G2R – 15 %	2G2R – 85 %; 1G2R – 15 %
8	2G2R – 86 %; 2G3R – 14 %	2G2R – 87,2 %; 2G3R – 12,8 %
9	2G2R – 100 %	2G2R – 100 %

U pacienta č. 1 byl prokázán běžný obraz přestavby genu *IgH* (viz obrázek č. 26). Dále byla prokázána translokace t(4;14), u které byl detekován také běžný obraz pro translokaci (viz obr č. 27). Na obrázku č. 27 je zobrazeno potenciální uložení genu *FGFR3* a *MMSET* a jejich celkový počet, který byl potvrzen metodou FISH.

Obrázek č. 26: Běžný obraz přestavby genu *IgH* na chromozómech a v interfázním jádru.

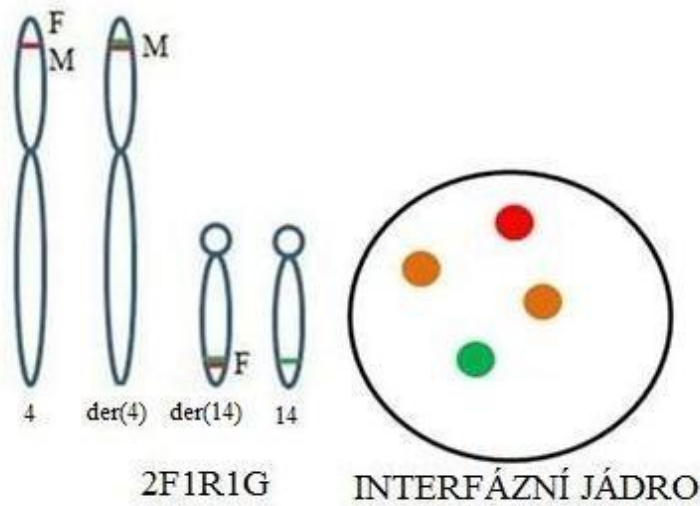
PŘESTAVBA GENU *IgH*



M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

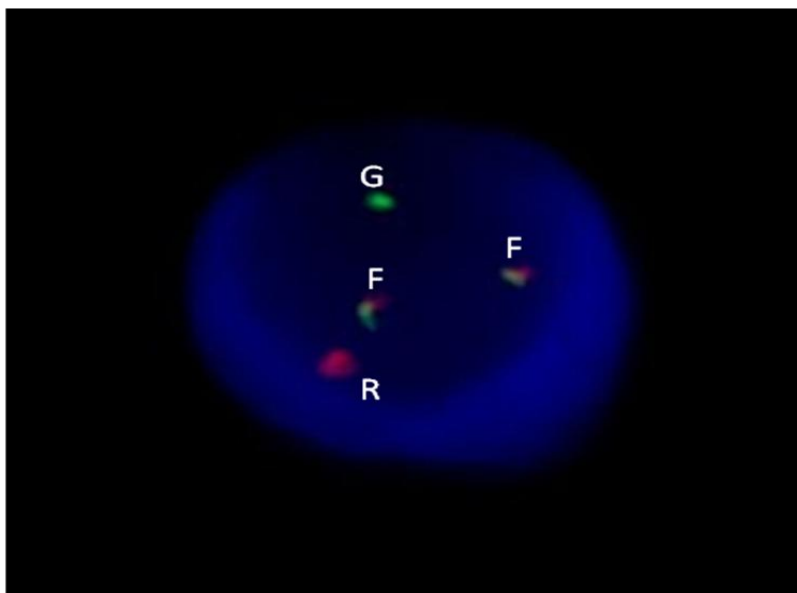
Obrázek č. 27: Běžný obraz pro translokaci t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru.

TRANSLOKACE t(4;14)



M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

Obrázek č. 28: Ukázka běžného obrazu pro translokaci t(4;14) (2F1R1G) v interfázním jádru.

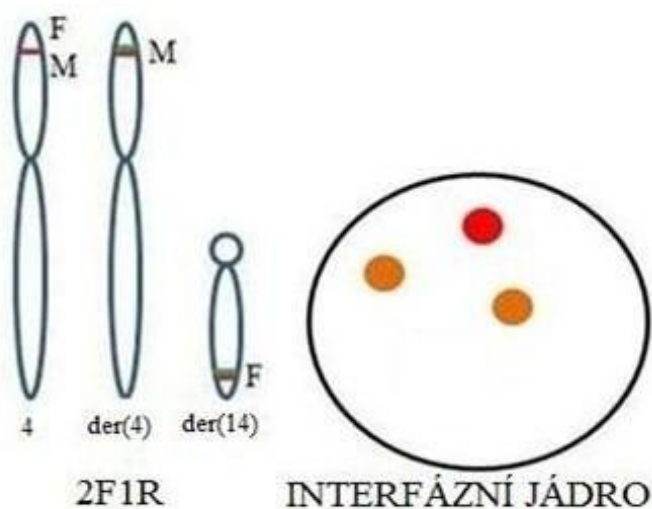


F – fúze, R – červený signál, G – zelený signál

U pacienta č. 2 byl prokázán variantní nález pro translokaci t(4;14). Při detekci genu *IgH* jsem v mikroskopu detekovala pouze obraz 1R1G. To naznačuje ztrátu nepřestavěného chromozómu 14. To se potvrdilo při detekci t(4;14), jelikož došlo ke ztrátě zeleného signálu, což znamená ztrátu chromozómu 14. Na obrázku č. 29 je zobrazena translokace t(4;14) a znázorněno potencionální umístění genu *FGFR3* a *MMSET* a jejich počet.

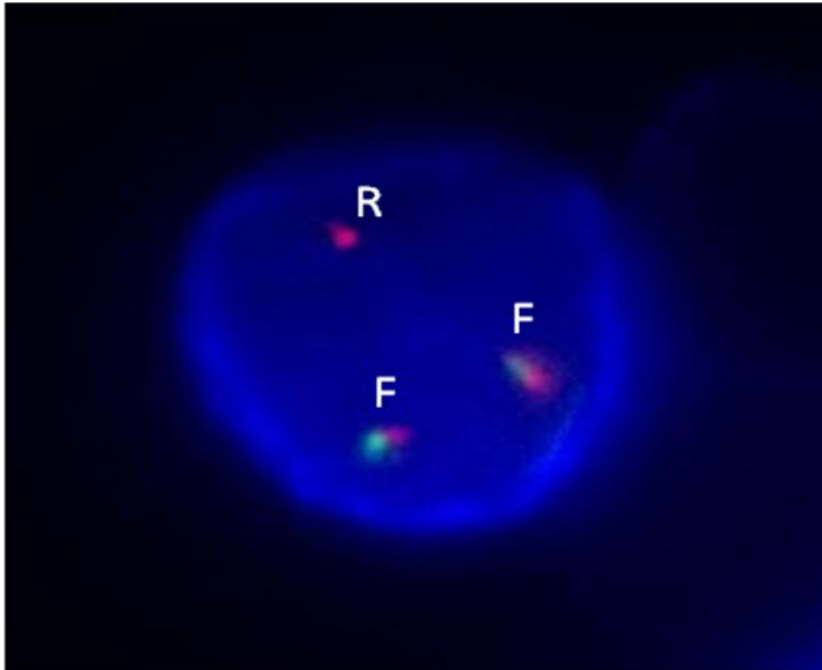
Obrázek č. 29: Schéma translokace t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru.

TRANSLOKACE t(4;14)



M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

Obrázek č. 30: Ukázka obrazu pro translokaci t(4;14) (2F1R) v interfázním jádru.

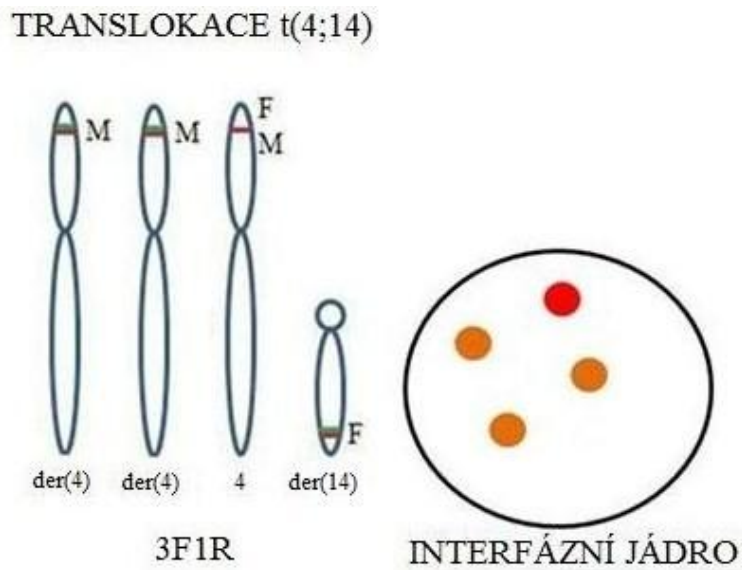


F – fúze, R – červený signál

U pacienta č. 3 byl opět prokázán běžný obraz přestavby genu *IgH* a translokace t(4;14) – viz schémata u pacienta č. 1.

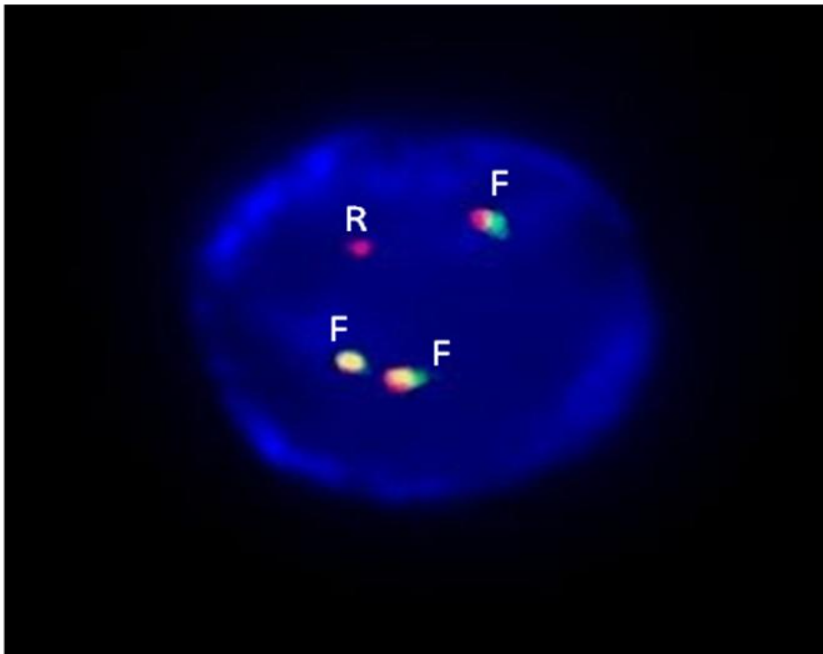
U pacienta č. 4 byl prokázán variantní nález. Při translokaci t(4;14) jsem detekovala 3F1R. Zelený signál leží na chromozómu 14, z toho vyplývá, že došlo ke ztrátě chromozómu 14 a zároveň k trizomii chromozómu 4, která byla potvrzena na mitóze (viz obrázek č. 33). V určitém klonu, pomocí metody FISH, při detekci genu *FGFR3* a *MMSET* v kombinaci s detekcí centromery 4, byly prokázány 3 zelené signály, které opět potvrzují trizomii chromozómu 4.

Obrázek č. 31: Schéma translokace t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru.



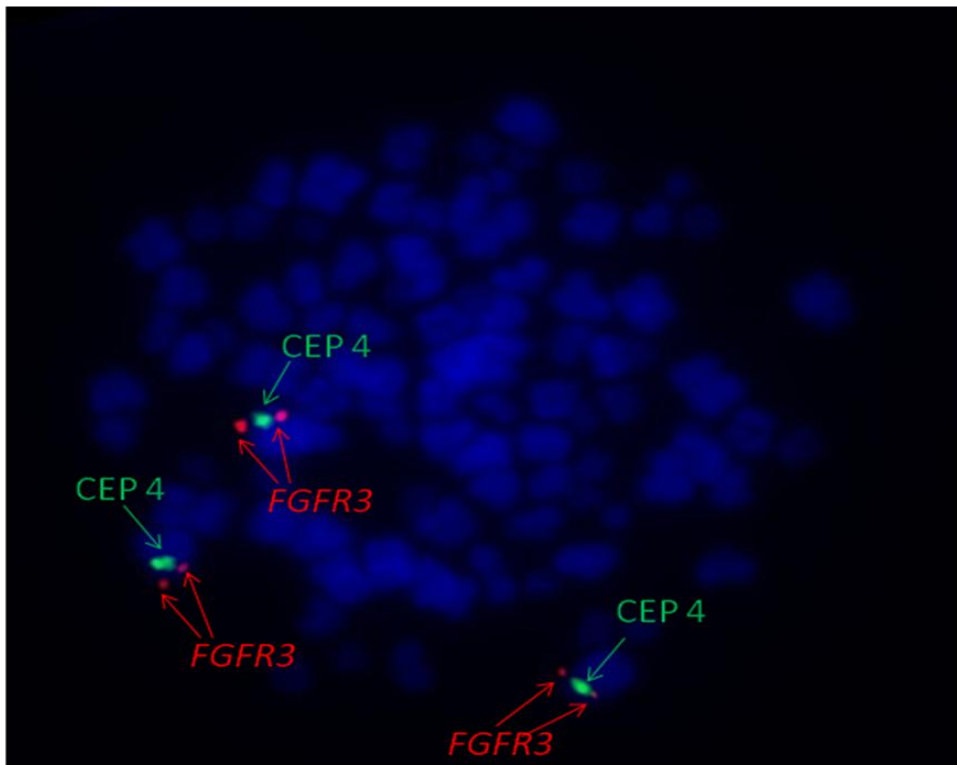
M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

Obrázek č. 32: Ukázka obrazu pro translokaci t(4;14) (3F1R) v interfázním jádru.



F – fúze, R – červený signál

Obrázek č. 33: Potvrzení trizomie chromozómu 4.

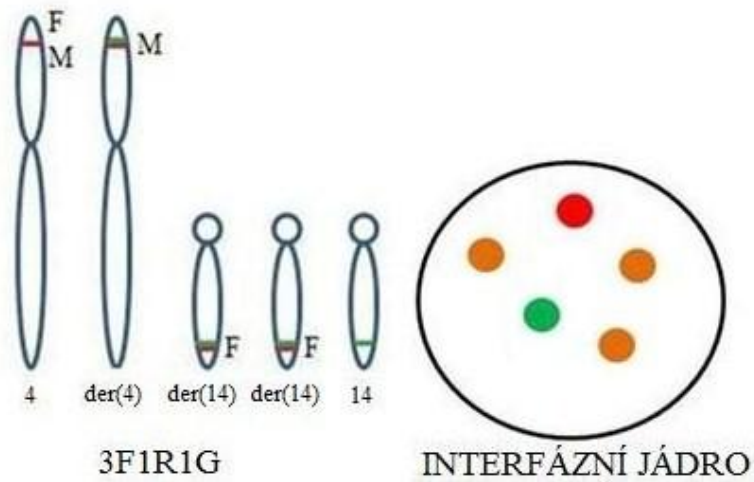


CEP 4 – označení centromery 4, *FGFR3* – označení genu *FGFR3*

U pacienta č. 5 byl opět prokázán variantní nález. Při translokaci t(4;14) byl ve větším klonu prokázán normální obraz pro translokaci (viz obrázek č. 27), v nižším zastoupení byly detekovány 3F1R1G (viz obrázek č 34). Tento nález může odpovídat trizomii derivovaného chromozómu 14, stejně jako může odpovídat i trizomii derivovaného chromozómu 4, na kterých leží fúzní signály.

Obrázek č. 34: Schéma translokace t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru.

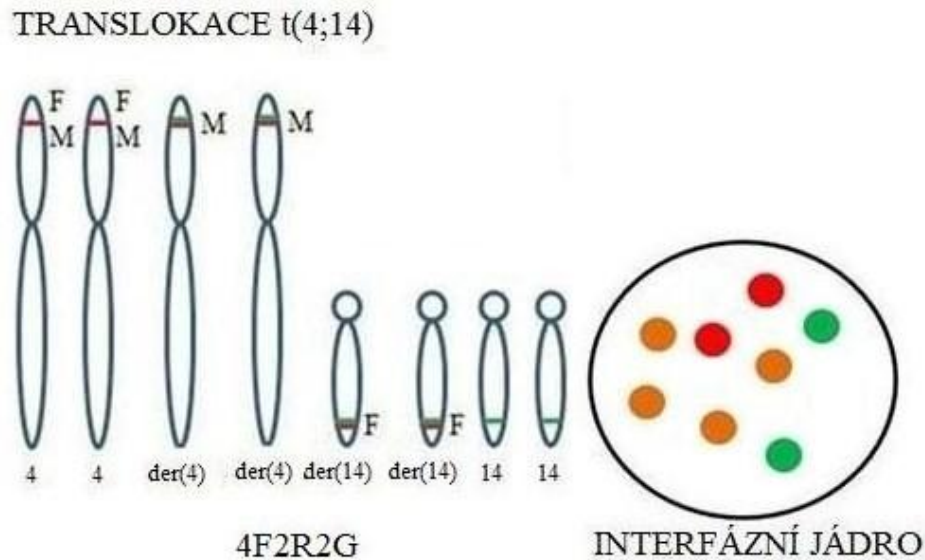
TRANSLOKACE t(4;14)



M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

U pacienta č. 6 byl prokázán variantní nález. V menším klonu byl nalezen obraz 4F2R2G (viz obrázek č. 35) – tento obraz může odpovídat tetraploidizaci, zmnožení diploidního počtu na tetraploidní.

Obrázek č. 35: Schéma translokace t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru.

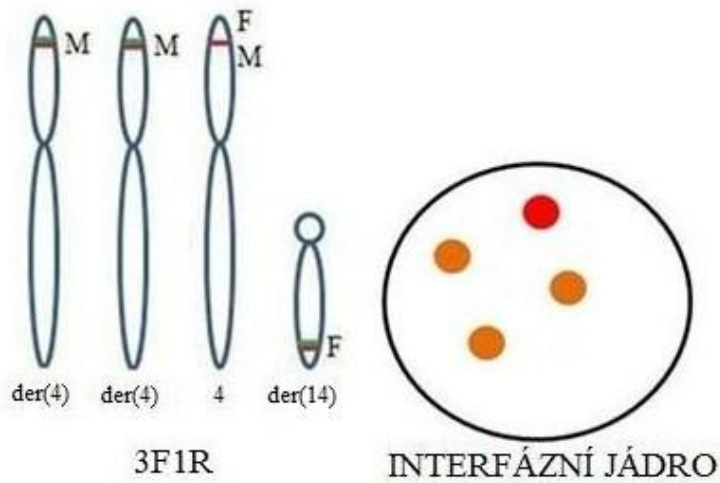


M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

U pacienta č. 7 byl také prokázán variantní nález. Při detekci translokace t(4;14) jsem našla 2 klony. Ve větším zastoupení klon (3F1R) – viz obrázek č. 36. Zelený signál leží na chromozómu 14, tudíž v tomto případě došlo k jeho ztrátě a k možné duplikaci derivovaného chromozómu 4 nebo 14. Druhý klon jsem detekovala ve výrazně menším procentuálním zastoupení (2F1R) – viz obrázek č. 37, obraz odpovídá ztrátě chromozómu 14.

Obrázek č. 36: Schéma translokace t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru.

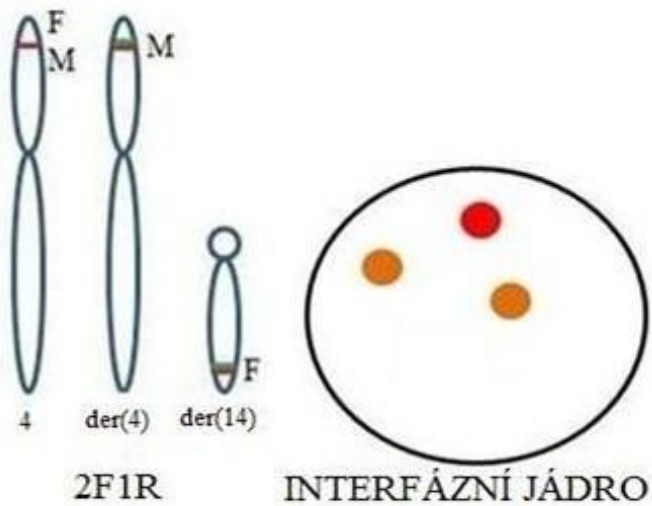
TRANSLOKACE t(4;14)



M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

Obrázek č. 37: Schéma translokace t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru.

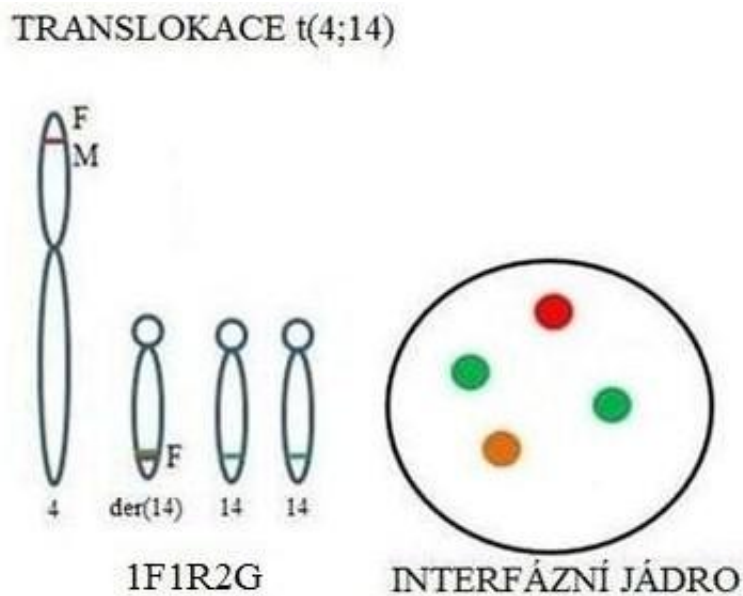
TRANSLOKACE t(4;14)



M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

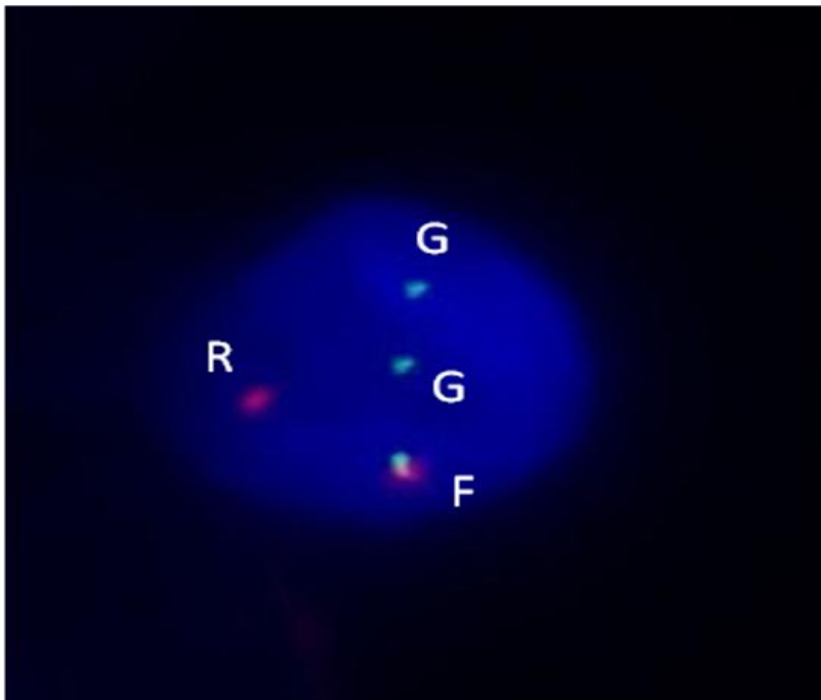
U pacienta č. 8 byl prokázán variantní nález. Při detekci translokace jsem detekovala 2 klony (1F1R3G v procentuální převaze a 1F1R2G). Zelený signál leží na chromozómu 14, tudíž v klonu 1F1R3G (viz obrázek č. 40) došlo k početní změně chromozómu 14 a pravděpodobně ke ztrátě derivovaného chromozómu 4 nebo 14. Ztráta derivovaného chromozómu 4 nebo 14 nebyla dále vyšetřována. V menším procentuálním zastoupení se vyskytoval klon 1F1R2G (viz obrázek č. 38). Klon 1F1R3G může odpovídat dalšímu klonálnímu vývoji se zmnožením chromozómu 14.

Obrázek č. 38: Schéma translokace t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru (1).



M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

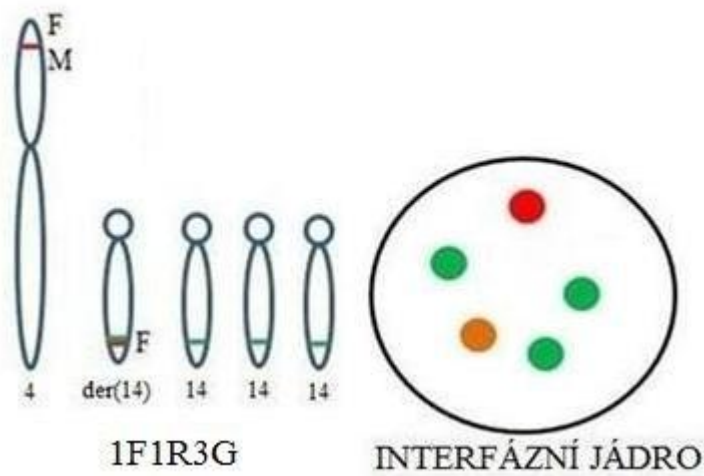
Obrázek č. 39: Ukázka obrazu pro translokaci t(4;14) (1F1R2G) v interfázním jádru.



F – fúze, R – červený signál, G – zelený signál

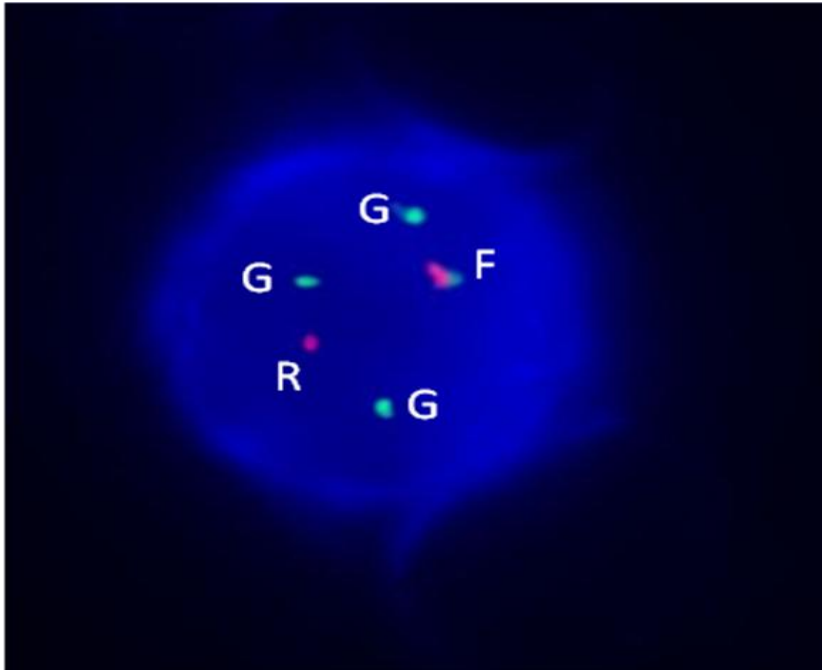
Obrázek č. 40: Schéma translokace t(4;14) na chromozómech a v interfázním jádru (2).

TRANSLOKACE t(4;14)



M – gen *MMSET* a F – gen *FGFR3*, ● červený signál, ● zelený signál, ● fúze

Obrázek č. 41: Ukázka obrazu pro translokaci t(4;14) (1F1R3G) v interfázním jádru.

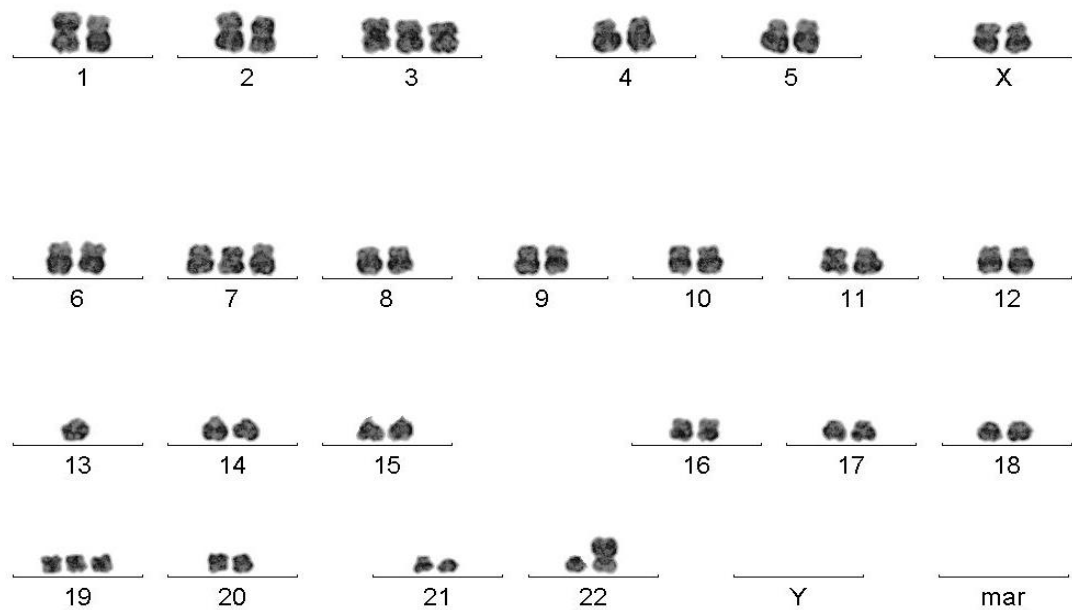


F – fúze, R – červený signál, G – zelený signál

U pacienta číslo 9 nebyl prokázán variantní nález. Nález byl stejný jako u pacienta č. 1 a 3. U přestavby genu *IgH* jsem detekovala 1F1R1G – viz obrázek č. 26 a při translokaci t(4;14) jsem našla pouze 1 klon (2F1R1G) – viz obrázek č. 27.

U tohoto pacienta byl klasickou cytogenetickou analýzou prokázán komplexní karyotyp, proto byl pacient dále vyšetřen metodou mFISH. Tento pacient byl vyšetřen jak v době diagnózy, tak v době progresu onemocnění.

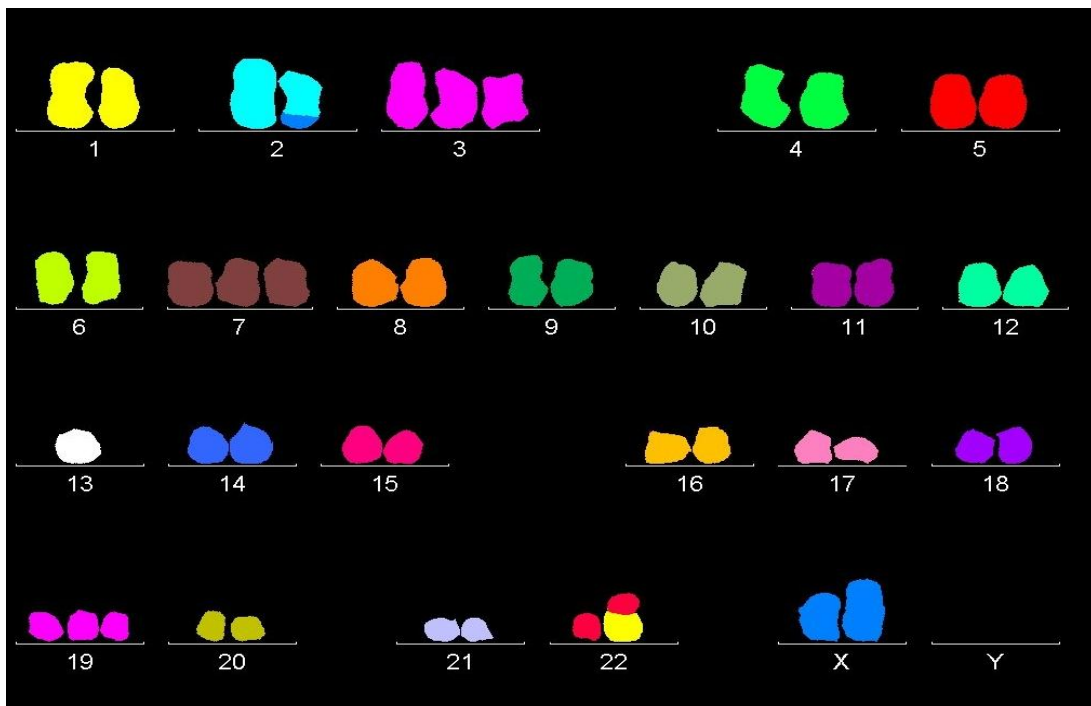
Obrázek č. 42: Karyotyp v době diagnózy



48,XX,+3,+?7,-13,+19,der(22)[10]

V tomto karyotypu byla nalezena trizomie chromozómů 3, 7 a 19, monozomie chromozómu 13 a derivovaný chromozóm 22. U pacienta bylo provedeno vyšetření metodou mFISH.

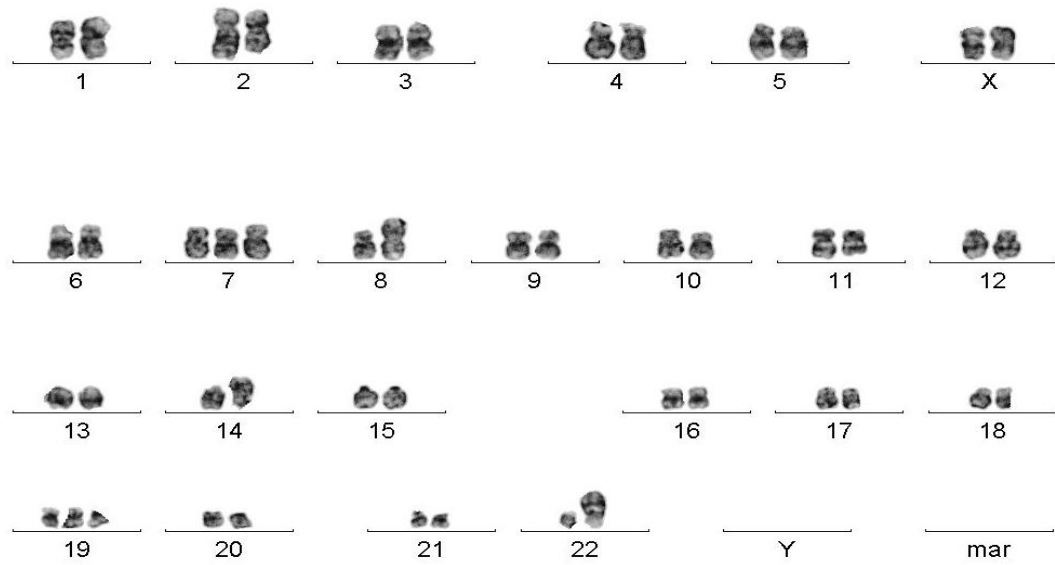
Obrázek č. 43: Výsledek vyšetření mFISH v době diagnózy pacienta



mFISH karyotyp: 48,XX,der(2)t(2;X)(q?23;q?26),+3,+7,-13,+19,
der(22)t(1;22)(q?12;?q13)

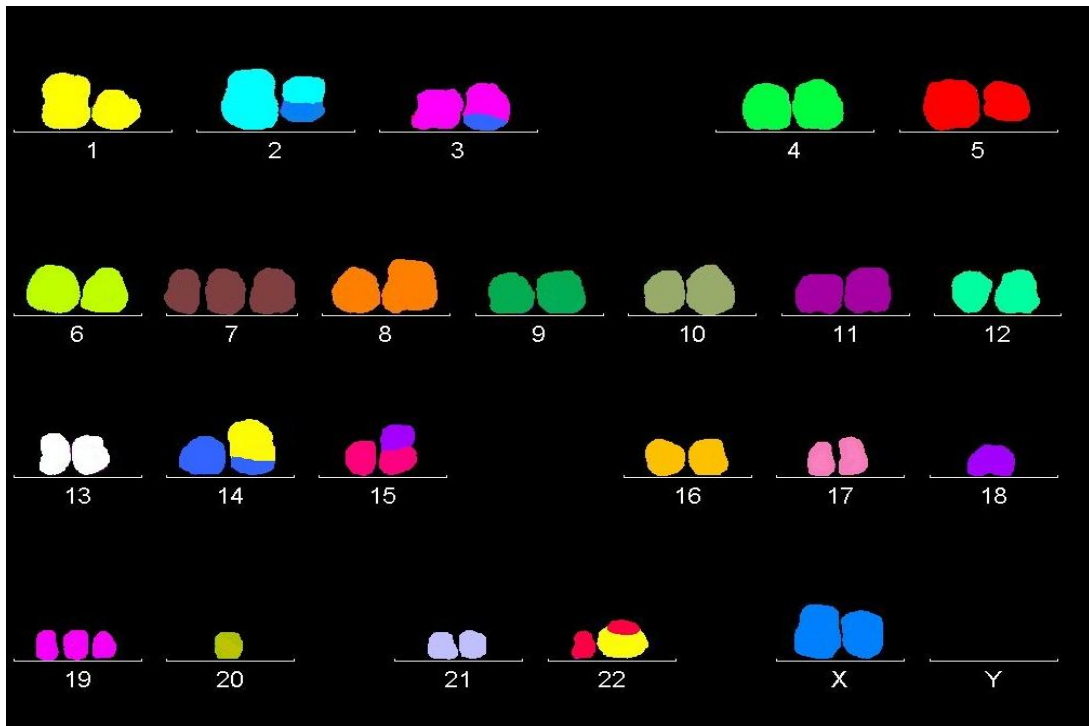
Pacienta č. 9 jsem vyšetřila v době progresu metodou FICTION a byl současně vyšetřen metodou mFISH.

Obrázek č. 44: Karyotyp v době progresu



48,XX,?der(1),der(2),?der(3),+7,der(14),+19,der(?22)[7]

Obrázek č. 45: Výsledek mFISH v době progresu (1. klon)

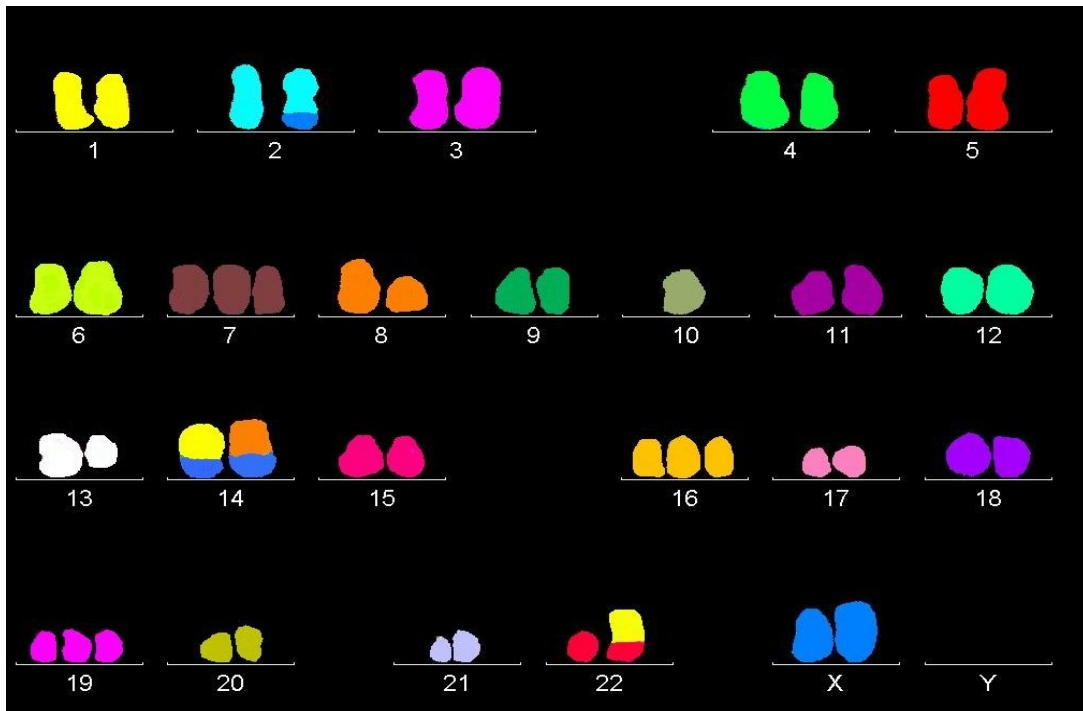


mFISH karyotyp:48,XX,der(2)t(X;2)(q?26;q?23),der(3)t(3;14)(?;?),del(5)(?q),+7,
iso(8)(q10),der(14)t(1;14)(q?11;p?13),?dic(15;18)(p?13;p?11.2),+19,
der(22)t(1;22)(q?12;q?13)

- chybění chromozómu 18 a 20 je náhodnou ztrátou a nejedná se o klonální změnu.

Metodou mFISH byl prokázán další abnormální klon s počtem 48 chromozómů, s oběma derivovanými chromozómy 14, trizomií chromozómu 16.

Obrázek č. 46: Výsledek mFISH v době progresu (2. klon).



mFISH karyotyp: 48,XX,der(2)t(X;2)(q?26;q?23),+7,-10,del(13)(q?14q?),
der(14)t(1;14)(q?11;p?13),der(14)t(8;14)(?;q?),+16,+19,der(22)t(1;22)(q?12;q?13)

Dva pacienti z vyšetřovaného souboru translokace t(4;14) byli v době vyšetření v progresi onemocnění, zbylých 7 pacientů bylo vyšetřeno v době diagnózy. Z 9 pacientů bylo vyšetřeno 5 žen a 4 muži, medián přežití byl 18,2 měsíců. Z tohoto souboru k datu 18.12.2013 žilo celkem 7 pacientů s mediánem přežití 17,8 měsíců. Dva nemocní zemřeli, jeden za 25,8 a druhý za 11,7 měsíců od data diagnózy. Vzhledem ke krátké době sledování nelze hodnotit klinický význam normálního a variantního nálezu translokace t(4;14).

5.2.1.2 Translokace t(11;14) u pacientů s MM

Translokace t(11;14) byla prokázána u 7 pacientů. V tabulce č. 15 (strana 113) je zobrazena přestavba genu *IgH* a translokace t(11;14) pro jednotlivé pacienty. V tabulce jsou uvedeny různé varianty signálů, které byly detekovány u pacientů a jejich procentuální zastoupení. U pacientů 1, 3, 4, 5 a 7 jsem našla více klonů plazmatických buněk, z toho byl jeden klon většinou ve výrazně menším procentuálním zastoupení. U všech pacientů byl prokázán variantní nález translokace.

Tabulka č. 15: Varianty přestavby genu *IgH* a translokaci t(11;14).

PACIENT ČÍSLO:	PŘESTAVBA GENU <i>IgH</i> (METODA FICTION)	TRANSLOKACE t(11;14) (METODA FICTION)	VARIANTNÍ NÁLEZ FICTION
1	1F1R1G (83 %)	1F1R2G (39 %); 1F1R1G (47 %)	variantní
2	2R1G (87%)	1F1R2G (76 %)	variantní
3	1R1G (77 %); 1F1R1G (17 %)	2F1R (79 %); 2F1R1G (21 %)	variantní
4	1F3R (70 %); 1F2R (13 %)	2F2G2R (31 %); 2F1G2R (24 %); 1F1G2R (19 %); 2F1R2G (15 %)	variantní
5	nehodnoceno	1F1R2G (91 %); 1F1R1G (9 %)	variantní
6	1F1R (87 %)	1F1R2G (85%)	variantní
7	1F1R1G (72 %); 2R2G (19 %)	2F1R1G (52 %); 2F2R1G (28 %)	variantní

Celkem 6 pacientů s translokací t(11;14) bylo vyšetřeno v době diagnózy, jedna pacientka byla vyšetřena v době refrakterní fáze onemocnění, a to 13 let od diagnózy MM. Ze 7 pacientů byli vyšetřeni 3 muži a 4 ženy. Medián přežití souboru s translokací t(11;14) byl 36,9 měsíců. Dva pacienti z tohoto souboru zemřeli. Jeden 8,9 měsíců od data diagnózy a druhý 7 měsíců od diagnózy.

5.2.1.3 Translokace t(14;16) u pacientů s MM

Translokace t(14;16) byla prokázána u 4 pacientů. V tabulce č. 16 (strana 115) je zobrazena přestavba genu *IgH* a translokace t(14;16) pro jednotlivé pacienty. V tabulce jsou uvedeny různé varianty signálů, které byly detekovány u pacientů a jejich procentuální zastoupení. V některých případech není procentuální zastoupení uvedeno, a to z důvodu špatné hybridizace sondy na genetický materiál pacientů. U všech pacientů byl prokázán variantní nález translokace.

Tabulka č. 16: Varianty přestavby genu *IgH* a translokaci t(14;16).

PACIENT ČÍSLO:	PŘESTAVBA GENU <i>IgH</i> (METODA FICTION)	TRANSLOKACE t(14;16) (METODA FICTION)	VARIANTNÍ NÁLEZ FICTION
1	2R2G (98 %)	3F1G (86 %)	variantní
2	přestavba obou kopií <i>IgH</i>	3F1R3G; 4F2G	variantní
3	1F1R1G; 2F1R1G	2F2G (85 %); 2F1G (15 %)	variantní
4	1F1R1G (52 %); 2F2R2G (22 %)	2F2G (58 %); 4F2G (19 %); 2F1G (15 %)	variantní

3 pacienti z vyšetřeného souboru s translokací t(14;16) byli vyšetřeni v době diagnózy a 1 v době progresse onemocnění. Ze 4 pacientů byli vyšetřeni 2 muži a 2 ženy. Jeden pacient z tohoto souboru t(14;16) zemřel, a to 5,6 měsíců od data diagnózy. Medián přežití souboru pacientů s translokací t(14;16) byl 28,8 měsíců.

6 DISKUZE

Mnohočetný myelom je maligní B lymfoproliferativní onemocnění (Anderson *et Carrasco*, 2011), které tvoří asi 1 % všech onkologických onemocnění, 10 % všech hematologických onemocnění (Hájek *et al*, 2011) a je druhým nejčastějším hemato-onkologickým onemocněním (Bahlis *et al*, 2006). Je charakteristický proliferací klonálních, dlouho žijících plazmatických buněk v kostní dřeni (Anderson *et Carrasco*, 2011). Mnohočetný myelom má velice rozmanité příznaky (Adam *et al*, 2001). Na rozdíl od jiných hemato-onkologických onemocnění mnohočetnému myelomu předchází stádium zvané MGUS (monoklonální gamapatie nejasného významu) (Anderson *et Carrasco*, 2011). MGUS je asymptomatická forma tohoto onemocnění (Madan *et Rajkuma*, 2010).

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na translokace genu *IgH*. Provedla jsem detailní analýzu souboru metodou FICTION, u pacientů s translokací t(4;14) jsem provedla i cytogenetickou analýzu genů *FGFR3* a *MMSET* metodou FISH. U všech pacientů bylo provedeno klasické cytogenetické vyšetření a u některých pacientů na základě klasického cytogenetického vyšetření byla provedena i metoda mFISH.

Klasickou cytogenetickou analýzou nelze rozpoznat kryptické aberace. Pokrokiem bylo zavedení metody FISH, která detekuje tyto změny pomocí lokusově specifických sond a u mnohočetného myelomu se stala průlomovou metodou metoda FICTION. U mnohočetného myelomu je velkým problémem nízká infiltrace kostní dřene nádorovými myelomovými buňkami. Abychom tyto nádorové plazmatické buňky rozpoznali mezi ostatními buňkami kostní dřene, používáme fluorescenčně značené protilátky proti lehkým řetězcům cytoplazmatických imunoglobulinů. Při pozorování v mikroskopu rozlišujeme jednotlivé nádorové buňky v kostní dřeni na základě sytě modrého zbarvení cytoplazmy a pouze v těchto buňkách vyšetřujeme chromozomální aberace. Stejně jako u jiných hemato-onkologických malignit se i u mnohočetného myelomu setkáváme se specifickými klonálními - početními i strukturními abnormalitami chromozómů, často se jedná o složité komplexní změny (Kuglík *et al*, 2008).

Cytogenetické vyšetření u mnohočetného myelomu (stejně jako u jiných hemato-onkologických onemocnění) je důležitým prognostickým faktorem. Rajkumar (2012) uvádí rozdělení pacientů do tří prognostických skupin, dle chromozomálních a genových změn.

U mnohočetného myelomu se vyskytují primární genetické změny, které se vyskytují již ve stádiu MGUS, zahrnují *IgH* translokace, trizomii chromozómů, delecii chromozómu 13. Sekundární genetické změny jsou většinou spojeny s progresí onemocnění. Mezi sekundární genetické změny patří delecce genu *TP53* a nadpočetné kopie oblasti 1q21 (Chng *et al*, 2007).

Vyšetřovaný soubor tvořilo 45 pacientů – u 43 pacientů byla potvrzena diagnóza mnohočetného myelomu, u 1 pacienta diagnóza MGUS a u 1 pacienta asymptomatická forma onemocnění. U všech pacientů byla provedena klasická cytogenetická analýza. Změny byly nalezeny pouze u 5 pacientů, z toho u 2 pacientů byl nalezen komplexní karyotyp.

Translokace t(4;14) byla nalezena u 9 (20 %) pacientů. U 3 pacientů byl pozorován běžný obraz pro translokaci t(4;14) a u dalších 6 pacientů jsme pozorovali variantní nález metodou FICTION. Tato frekvence výskytu je stejná jako uvádí práce Ronchettiho *et al* (2001) - translokace t(4;14) se vyskytuje asi u 20 % nemocných a je obvykle provázena velmi agresivním průběhem onemocnění. Medián přežití pacientů s translokací t(4;14) se pohybuje v rozmezí mezi 3-4 roky, pacienti, kteří podstoupí autologní transplantaci kmenových buněk mají medián přežití 5-7 let (Kalff *et al* Spencer, 2012). Medián přežití pacientů s translokací t(4;14) v analyzovaném souboru byl 18,2 měsíců (1 rok a 6 měsíců). V našem případě se jedná o velmi malý počet pacientů, a proto délku přežití nelze porovnávat.

Autoři Hébraud *et al* (2013) udávají, že translokace t(4;14) by měla být primární patogenní událostí, ale zjistili, že translokace t(4;14) je u některých pacientů pozorována až v progresi onemocnění. Při diagnóze translokace t(4;14) nebyla prokázána. Výskyt translokace pouze v progresi naznačuje, že translokace t(4;14) nemusí být změnou primární a tedy je otázkou, zda existují pouze subklony nesoucí translokaci t(4;14), které jsou pozorovatelné pouze v době relapsu. Autoři článku se domnívají, že progresi onemocnění může být způsobena subklony, které se částečně

liší od těch, které byly pozorovány při diagnóze. To naznačuje existenci „ancestralního“ – původního klonu, a to znamená, že všechny subklony spolu geneticky souvisí (Hébraud *et al*, 2013). Data Hébrauda *et al* (2008) ukazují, že translokace t(4;14) není primární genetickou událostí a její spojení s nepříznivou prognózou není zatím objasněno.

Naše variantní nálezy u pacientů s translokacemi t(4;14), t(11;14) a t(14;16) souvisí s nedávnými pozorováními týkající se klonální a subklonální heterogenity.

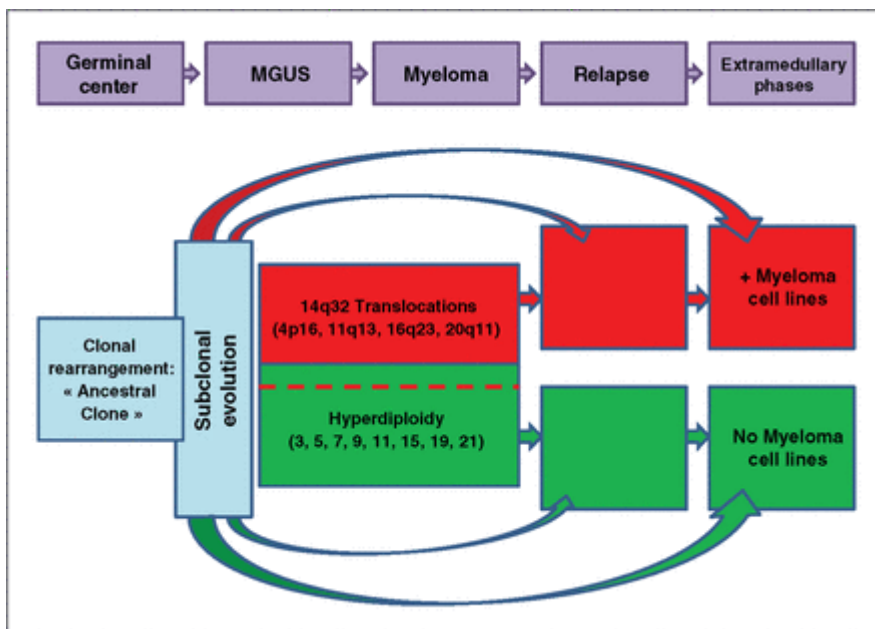
Původní představa klonálního vývoje u MM se shodovala s obecným modelem, který publikoval v roce 1976 Peter Nowell (1976). Tento model předpokládal, že všechny klony, které v průběhu onemocnění vznikají, mají navzájem lineární vztah. Tato představa je v současnosti doplněna na základě celogenomového sekvenování pozorováním, že kromě lineárního vývoje, existuje tzv. „Darwin-like“, tedy rozvětveného (branching) klonálního vývoje, kde bylo popsáno, že existuje nejen interklonální heterogenita, ale byla potvrzena i intraklonální heterogenita. Tato intraklonální heterogenita byla pozorována i u translokace t(4;14) a t(11;14) (Walker *et al*, 2012). Naše výsledky variantních nálezů u translokace t(4;14), t(11;14) a t(14;16) jsou právě ve shodě s tímto literárním pozorováním. Intraklonální heterogenita představuje u našich výsledků ztráty a zmnožení jak normálních, tak derivovaných chromozómů a variantní nálezy jsou obrazem existence heterogenity v daném klonu.

Walker *et al* (2010) udává, že na chromozómu 4 je nejčastěji deletována telomerická část krátkého ramene, a to v důsledku nevyvážené translokace t(4;14), která ruší expresi *FGFR3* na chromozómu 4. Často dochází ke ztrátě derivovaného chromozómu 14 a tím i ke ztrátě exprese *FGFR3* (Walker *et al*, 2010). V našem souboru došlo ke ztrátě normálního chromozómu 14, zmnožení chromozómu 4 a derivovaného chromozómu 14. V jednom případě došlo ke ztrátě derivovaného chromozómu 4 nebo 14.

Dva pacienti z mého vyšetřeného souboru byli v době vyšetření v progresi onemocnění. U těchto pacientů byla translokace t(4;14) prokázána již v době diagnózy a nedošlo ani k její ztrátě v průběhu onemocnění, jak pozoroval ve své práci Hébraud *et al* (2013). Ztrátu translokace pozorovali v průběhu onemocnění u 11 pacientů z 268

vyšetřených nemocných. Toto pozorování vedlo autory k návržení modelu onkogeneze u MM (obrázek č. 47).

Obrázek č. 47: Model onkogeneze mnohočetného myelomu (Hébraud *et al*, 2013).



V tomto modelu dochází ke změnám již v germinálním centru, kde vzniká „ancestrální klon“. Tento klon se vyvíjí do různých subklonů. Základem je vývoj spojený jednak s translokací zahrnující gen *IgH* a se zmnožením chromozómů vedoucí k hyperdiploidii. U pacientů, kteří mají translokaci zahrnující gen *IgH*, nejsou přítomny početní chromozómové změny. Tento model může být aplikován i u našeho vyšetřeného souboru. U 33 pacientů jsme pozorovali translokace zahrnující gen *IgH*, u 10 pacientů došlo k zisku chromozómů (většinou chromozómu 15 a 17), u 1 pacienta došlo k amplifikaci oblasti 1q21 a u 1 pacienta nebyly nalezeny žádné genetické změny.

Nejnovější studie Mirabella *et al* (2013) ukazují, že gen *FGFR3* vykazuje pouze slabou transformační aktivitu a že není hlavním onkogenním faktorem. Nadměrná exprese genu *FGFR3* se vyskytuje asi u 70 % pacientů s translokací t(4;14), nicméně gen *MMSET* je nadměrně exprimován ve všech případech. Malá část pacientů s translokací t(4;14) měla mutace v genu *FGFR3*, tyto mutace jsou ale vzácné a vyskytují se zhruba v 5 % případů. V úvahu mohou připadat i další mechanismy,

kterými je gen *FGFR3* regulován a jsou nezávislé na translokaci t(4;14). Vzácně byla pozorována amplifikace genu *FGFR3* v buněčných liniích mnohočetného myelomu. V našem analyzovaném souboru nebyla exprese genů studována, ale nepozorovali jsme změny počtu kopií metodou FISH. V menším klonu se vyskytoval nadměrný počet kopií genu *FGFR3* (u 4 pacientů), což odpovídá 44 %. Při nadměrném počtu kopií daného genu se dá předpokládat i jeho zvýšená exprese. Gen *MMSET* byl nalezen opět v menším klonu ve 3 kopiích u 4 pacientů (44 %), i zde se dá předpokládat zvýšená exprese genu. V jednom případě byla v menším klonu detekována pouze jedna kopie genu *FGFR3* a *MMSET*. U zbylých 4 pacientů byly nalezeny normální počty kopií genu *FGFR3* a *MMSET*.

Translokace t(11;14) se vyskytuje asi u 15-20 % pacientů s MM (Liebisch *et al*, 2006). V analyzovaném souboru se translokace t(11;14) vyskytovala v 15,5 %. Obecně jsou přestavby *IgH* považovány za nepříznivý prognostický faktor, nejčastější přestavbou zahrnující *IgH* lokus patří právě translokace t(11;14). Podle některých autorů je provázena delším celkovým přežitím nemocných na rozdíl od ostatních přestaveb je považovaná spíše za příznivý prognostický ukazatel (Kuglík *et al*, 2008). Autoři Walker *et al* (2010) udávají, že při translokaci t(11;14) nedochází ke ztrátě derivovaného chromozómu 14 a dochází ke složitějším chromozomálním přestavbám ve srovnání s oblastí, ve které dochází k translokaci t(4;14) (Walker *et al*, 2010). Variantní nález metodou FISH svědčí o existenci subklonů se ztrátou a zmnožením derivovaných i normálních chromozómů zahrnutých do translokace.

Translokace t(14;16) se vyskytuje asi u 5 % pacientů (Fonseca *et al*, 2003). V analyzovaném souboru se translokace t(14;16) vyskytovala v 8,9 %. Klíčová studie o prognóze translokace t(14;16) pochází z Mayo Clinic, kde byla spojena se špatnou prognózou. Další zpráva z univerzity z Arkansasu navrhla, že nadměrná exprese genu *MAF*, byla spojena s kratším přežitím, a to i léčených pacientů (Avet-Loiseau *et al*, 2011). Nepříznivá prognóza pacientů byla v našem analyzovaném souboru prokázána, medián přežití nemocných byl 28,8 měsíců.

7 Závěr

Cytogenetická analýza souboru 45 pacientů s MGUS/MM ukázala, že chromozómové změny jsou integrální součástí nádorového procesu. Genetické změny byly určeny u 44 (97,7%) nemocných. Detailní studium genových změn souvisejících s translokací genu pro těžký řetězec imunoglobulinů potvrdilo, ve shodě s literaturou, existenci inter a intraklonální heterogenity, nálezem variantních signálů při určení translokací metodou FICTION. Tyto nálezy budou součástí dalších analýz, především hodnocení klonálního vývoje a jeho klinických důsledků.

8 Seznam použitých zkratek

ASCT – autologní transplantace kostní dřeně

BAC – bacterial arteficial chromosome

CCND1 – cyklin D1

CCND3 – cyklin D3

CEP – centromerická sonda

DNA – deoxyribonukleová kyselina

F - fúze

FGFR3 - receptor fibroblastového růstového faktoru 3

FICTION - imunofluorescenční detekce myelomových buněk a následná FISH

FISH - fluorescenční *in situ* hybridizace

G – zelený signál

GC – germinální centrum

Ig - imunoglobulin

IgH - gen pro těžký řetězec imunoglobulinu

IL-6 - interleukin 6

K - kappa

KD – kostní dřeň

L - lambda

LSI – lokusově specifická sonda

mFISH - mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace

MGUS - monoklonální gamapatie nejasného významu

MM - mnohočetný myelom

MMSET - Multiple Myeloma Set Domain

R – červený signál

RB1 - retinoblastomový gen

TP53 – tumor supresorový gen p53

VDJ rekombinace - přeskupování subgenů pro těžké řetězce imunoglobulinů

9 Seznam použité literatury

Abbott Molecular. FISH Chromosome Search. Abbottmolecular.com [online]. ©2014 [cit. 2014-01-18].

Dostupné z: <http://www.abbottmolecular.com>

ADAM, Z., HÁJEK, R., MAYER, J., ŠČUDLA, V., VORLÍČEK, J. A KOLEKTIV (1999): Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Masarykova univerzita, Brno.

ADAM, Z., VORLÍČEK, J. A KOLEKTIV (2001): Hematologie II – Přehled maligních hematologických nemocí. GRADA Publishing, Praha.

ANDERSON, KC., CARRASCO, RD. (2011): Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol* 6: 249-74.

AVET-LOISEAU, H., MALARD, F, CAMPION, L, MAGRANGEAS, F, SEBBAN, C, LIOURE, B, DECAUX, O, LAMY, T, LEGROS, L, FUZIBET, JG, MICHALLET, M, CORRONT, B, LENAIN, P, HULIN, C, MATHIOT, C, ATTAL, M, FACON, T, HAROUSSEAU, JL, MINVIELLE, S, MOREAU, P; INTERGROUPE FRANCOPHONE DU MVÉLOME (2011): Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood* 117(6):2009-11.

BAHLIS, NJ., DOUGLAS, AS. (2006): Multiple myeloma. A new era for an old disease. *Oncology Exchange- VOL. 5, NO. 2.*

BALCÁRKOVÁ, J. (2009): Cytogenetické a molekulárně cytogenetické studium chromosomových změn u pacientů s mnohočetným myelomem. LF Univerzita Palackého, Olomouc.

BERÁNKOVÁ, K. (2007): Možnosti mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace při detekci chromozomových změn u dětských nádorových onemocnění. Masarykova univerzita, Brno.

BERGSAGEL P. LEIF, CHESI M. (2013): V. Molecular classification and risk stratification of myeloma. *Hematol Oncol* 31: 38-41.

BIRD, JM., OWEN, RG., D'SA, S., SNOWDEN, A., PRATT, G., ASHCROFT, J., YONG, K., COOK. G., FEYLER, S., DAVIES, F., MORGAN, G., CAVENAGH, J., LOW, E., BEHRENS, J., ON BEHALF OF THE HAEMATO-ONCOLOGY TASK FORCE OF THE BRITISH COMMITTEE FOR STANDARDS IN HAEMATOLOGY (BCSH) AND UK MYELOMA FORUM (2011): Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *British Journal of Haematology* 154: 32-75.

FABER, E. A KOLEKTIV (2012): Základy hematologické diagnostiky. LF Univerzita Palackého, Olomouc.

FONSECA R., BERGSAGEL PL., DRACH J., SHAUGHNESSY J., GUTIERREZ N., STEWART AK., MORGAN G., VAN NESS B., CHESI M., MINVIELLE S., NERI A., BARLOGIE B., KUEHL WM., LIEBISCH P., DAVIES F., CHEN-KIANG S., DURIE BGM., CARRASCO R., SEZEN O., REIMAN T., PILARSKI L., AVET-LOISEAU H. (2009): International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*23(12): 2210-2221.

FONSECA, R., BLOOD, E., RUE, M., HARRINGTON, D., OKEN, MM., KYLE. RA., DEWALD, GW., VAN NESS, B., VAN WIER, SA., HENDERSON, KG., BAILEY, RJ., GREIPP, PR. (2003): Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101 (11): 4569-75.

GREIPP, PR., SAN MIGUEL, JF., DURIE, BG. et al (2005): International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23: 3412-20.

HÁJEK, R., KREJČÍ, M., POUR, L., ADAM, Z. (2011): Multiple myeloma. *Klin Onkol* 24: S10-S13.

HÉBRAUD, B., CAILLOT, D., CORRE, J., MARIT, G., HULIN, C., LELEU, X., LODÉ, L., WETTERWALD, M., DIB, M., RODON, P., VOILLAT, L., ROYER, B., VOOG, E., FITOUSSI, O., STOPPA, AM., GARDERET, L., KOLB, B., MAIGRE, M., BOULLANGER, N., ALLANGBA, O., KARLIN, L., DAGUINDA U, N., LEGROS, L., SOHN, C., JOUBERT, MV., LENAIN, P., FACON, T., ATTAL, M., MOREAU, P., AVET-LOISEAU, H. (2013): The Trabslocation t(4;14) Can Be Present Only in Minor Subclones in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 19 (17): 4634-7.

HIDESHIMA, T., BERGSAGEL, PL., KUEHL, WM., ANDERSON, KC. (2004): Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 104: 607-618.

CHNG, WJ. (2010): Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Emerging Cancer Therapeutics* 1: 215-236.

CHNG, WJ., GLEBOV, O., BERGSAGEL, PL., KUEHL, WM. (2007): Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 20 (4): 571-96.

JANSEN, JW., VAANDRAGER, JW., HEUSER, T., JAUCH, A., KLUIN. PM., GEELLEN, E., BERGSAGEL, PL., KUEHL, WM., DREXLER, HG., OTSUKI, T., BARTRAM, CR., SCHUURING, E. (2000): Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 95 (8): 2691-8.

JAROŠOVÁ, M. et al (2007): Cytogenetika a molekulární cytogenetika v hematologii. *Onkologická péče, číslo ročníku 2/07: 9-12.*

KALFF, A., SPENCER, A. (2012): The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer Journal* 2:e89. Doi: 10.1038/bcj.2012.37.

Kreatech Diagnostics. REPEAT-FREETM POSEIDONTM FISH Probes. Kreatech.com [online]. ©2010-2014 [cit. 2014-01-21].

Dostupné z: <http://www.kreatech.com>

KUEHL, WM., BERGSAGEL, PL. (2012): Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest* 122(10): 3456-63.

KUGLÍK, P., FILKOVÁ, H., OLTOVÁ, A., HÁJEK, R. (2006): Význam a současné možnosti diagnostiky cytogenetických změn u mnohočetného myelomu. *Vnitřní lékařství* 52(2): 76-78.

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

KYLE, RA., RAJKUMAR, SV. (2004): Drug therapy Multiple Myeloma. *N Engl Med* 351: 1860-73.

LEXOVÁ, S. *et al* (2000): Hematologie pro zdravotní laboranty – 1. díl. Vydavatelství idvpz, Brno.

LIEBISCH, P., DÖHNER H. (2006): Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *European journal of cancer* 42: 1520-1529.

MADAN, S., RAJKUMAR, V. (2010): Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Emerging Cancer Therapeutics* 1: 237-260.

MASOPUST, J. (2012): Transfúze a hematologie dnes. Supplementum 1 – září – ročník 18/2012. Transfúzní oddělení, Krajská zdravotní – Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem.

MetaSystems USA Website. Metasystems-international.com [online]. ©2009-2014 [cit. 2014-02-21].

Dostupné z: <http://www.metasystems-international.com>

MIČKOVÁ, P., BALCÁRKOVÁ, J., PIKA, T., BAČOVSKÝ, J., MINAŘÍK, J., NEVIMOVÁ, K., JAROŠOVÁ, M. (2014): Delece *TP53* u nemocných s mnohočetným myelomem – molekulárně cytogenetická analýza souboru 84 nemocných. Osobní sdělení.

MIRABELLA, F., WU, P., WARDELL, CP., KAISER, MF., WALKER, BA., JOHNSON, DC., MORGAN, GJ. (2013): MMSET is the key molecular target in t(4;14) myeloma. *Blood Cancer 3:e114*. doi:10.1038/bcj.2013.9.

International Myeloma Foundation. Myeloma.org [online]. ©2012 [cit. 2014-01-27].

Dostupné z: <http://myeloma.org/Main.action>

NAHI H., SUTLU T., JANSSON M., ALICI E., GAHRTON G. (2010): Clinical impact of chromosomal aberration in multiple myeloma. *J Intern Med 269 (2): 137-47*.

NĚMEC, P., KUGLÍK, P., HÁJEK, R. (2008): Úloha chromozomových translokací při vzniku a vývoji mnohočetného myelomu. *Klin Onkol 21(2):53-8*.

NOWELL, PC. 1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science 194:23-28*

PECKA, M. (2002). Krvetvorba. In: Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba, pp. 68-154, Finidr, Český Těšín.

RAAB, MS., PODAR, K., BREITKREUTZ, I., RICHARDSON PG., ANDERSON KC. (2009): Multiple myeloma. *Lancet* 374: 324-39.

RAJKUMAR, S. VINCENT (2012): Multiple myeloma: 2012 update of diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 87 (1): 78-88.

RONCHETTI, D., GRECO, A., COMPASSO, S., COLOMBO, G., DELL'ERA, P., OTSUKI, T., NERI, L., NERI, A. (2001): Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations. *Onkogene* 20 (27): 3553-62.

SAWYER, JEFFREY R. (2011): The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genet.* 204: 3-12.

TERPOS, E., ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU, V., DIMOPOULOS M.-A. (2006): Clinical implications of chromosomal abnormalities in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma* 47 (5): 803-814.

TUDOERTI, K., RONCHETTI, D., AGNELLI, L., CASTELLANI, S., MARELLI, S., ZANELLA, A., LOMBARDI, L., NERI, A. (2005): Transcription repression activity is associated with the type I isoform of the MMSET gene involved in t(4;14) in multiple myeloma. *Br J Haematol* 131 (2): 214-8.

WALKER, BA., LEONE, PE., CHIECCHIO, L., DICKENS, NJ., JENNER, MW., BOYD, KD., JOHNSON, DC., GONZALES, D., DAGRADA, GP., PROTHEROE, RKM., KONN, ZJ., STOCKLEY, DM., GREGORY, WM., DAVIES, FE., ROSS, FM., MORGAN, GJ. (2010): A compedium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 116 (5): e56-65.

WALKER, BA., WARDELL, CP., MELCHOR, L., HULKKI, S., POTTER, NE., JOHNSON, DC., FENWICK, K., KOZAREWA, I., GONZALEZ, D., LORD, CJ., ASHWORTH, A., DAVIES, FE., MORGAN, GJ. (2012): Intracлонаl heterogeneity and distinct molecular mechanism characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. *Blood* 120(5):1077-86.

Wikipedia. Haematopoiesis. Wikipedia.org [online]. ©2014 [cit. 2013-12-10].

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

WLODARSKA, I., MATTHEWS, EVENT., POSPISILOVA, H., CATHERWOOD, MA., POULSEN, TS., VANHENTENRIJK, V., IBBOTSON, R., VANDENBERGHE, P., MORRIS TCM., ALEXANDER HD. (2007): Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflectsomatic V_H recombination events. *J Mol Diagn.* 9 (1):47-54.

YEH, HS., BERENSON, JR. (2006): Myeloma bone disease and treatment options. *European journal of cancer* 42: 1554-1563.